

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 74 · № 1 · 2019 · ЯНВАРЬ — МАРТ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

- Афони́на Е.Ю., Ташлы́кова Н.А. Влияние факторов среды на структуру планктонных сообществ минеральных озер в разные фазы водности 3
- Беляев О.А., Фарисенков С.Э. Исследование аллометрии формы и жилкования крыльев насекомых. Часть 2. Diptera 10
- Капков В.И., Васильева С.Г., Лобакова Е.С. Развитие потенциально токсичной цианобактерии *Dolichospermum flos-aquae* (*Anabaena flos-aquae*) в водоемах бореальной зоны 19
- Новоселецкий В.Н., Армеев Г.А., Шайтан К.В. Составление и анализ матриц аминокислотных замен для оптимального выравнивания последовательностей микробных родопсинов 27
- Потехина В.М., Кузьмин В.С., Абрамочкин Д.В. Внеклеточный диаденозинтетрафосфат подавляет эктопическую активность в миокардиальной ткани легочных вен у взрослых, но не у новорожденных крыс 34
- Рязанова Г.И. Стрекозы и антропогенное засоление внутренних вод. . . 42
- Макаркина М.В., Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В. ПЦР-идентификация патогенных агробактерий, выявленных на виноградниках Краснодарского края, по типу содержащихся в них Ti-плазмид 50

CONTENTS

Research articles

- Afonina E.Yu., Tashlykova N.A. Influence of environmental factors on the plankton communities structure in saline lakes at different water phases . 3
- Belyaev O.A., Farisenkov S.E. A study on allometry of wing shape and venation in insects. Part 2. Diptera 10
- Kapkov V.I., Vasilieva S.G., Lobakova E.S. Growth of toxic cyanobacteria *Dolichospermum flos-aquae* (*Anabaena flos-aquae*) in the waters of boreal zone 19
- Novoseletsky V.N., Armeev G.A., Shaitan K.V. Construction and evaluation of amino acid substitution matrices for optimal alignment of sequences of microbial rhodopsin 27
- Potekhina V.M., Kuzmin V.S., Abramochkin D.V. Extracellular diadenosine tetraphosphate suppresses ectopic proarrhythmicity in the myocardial tissue of the pulmonary veins in adult but not in neonatal rats . . . 34
- Ryazanova G.I. Odonata and the anthropogenic salinization of inland waters 42
- Makarkina M.V., Ilnitskaya E.T., Tokmakov S.V. PCR identification of pathogenic agrobacteries detected on vineyards of Krasnodar territory by the type of contained Ti plasmids. 50

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 574.52

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА СТРУКТУРУ ПЛАНКТОННЫХ СООБЩЕСТВ МИНЕРАЛЬНЫХ ОЗЕР В РАЗНЫЕ ФАЗЫ ВОДНОСТИ

Е.Ю. Афонина*, Н.А. Ташлыкова

*Институт природных ресурсов, экологии и криологии, СО РАН, Россия, 672014, г. Чита,
ул. Недорезова, д. 16а***e-mail: kataf@mail.ru*

В основу работы положены результаты многолетних исследований фито- и зоопланктона содово-соленых озер Улдза-Торейского бассейна (Юго-Восточное Забайкалье). Непостоянный уровеньный режим степных бессточных водоемов вследствие климатических флуктуаций приводит к изменению морфометрических показателей озер, а также их гидрохимического режима, и, как следствие, к трансформации планктонных сообществ. Цель настоящей работы – выявление факторов окружающей среды, определяющих структуру планктонных биоценозов минеральных озер в разные фазы водности. Согласно статистическому анализу вспомогательных моделей (Redundancy Analysis, RDA), в трансгрессивную фазу водности наиболее значимым факторам являлись общая минерализация и рН, в регрессивную – рН. Применение метода корреляционных плеяд, построенных на основе корреляционной матрицы, показало, что природные ассоциации планктоценозов в многоводный период состояли из девяти взаимосвязанных компонентов, в маловодный – из пяти. Независимо от фазы водности основным структурообразующим элементом являлись водоросли отдела Chlorophyta. Вторыми по значимости были Euglenophyta, Bacillariophyta, Cladocera – в период полной воды и Charophyta, Dinophyta, Rotifera, Copepoda – в период малой воды.

Ключевые слова: *фитопланктон, зоопланктон, фаза водности, факторы среды, минеральные озера, Улдза-Торейский бассейн*

Минеральные озера – это особый тип экосистемы, характеризующийся динамичностью и высокой уязвимостью к внешним воздействиям, особенно климатическим [1]. Изменения структурной организации сообществ гидробионтов, происходящие под влиянием меняющихся характеристик среды, позволяют использовать эти экосистемы в качестве моделей для исследования многих теоретических проблем [2]. Чередование засушливых и дождливых периодов приводит к изменению морфометрии водоемов, большим сезонным и межгодовым колебаниям солености и, как следствие, к существенным изменениям биотической составляющей экосистемы [3, 4]. Организмы, адаптированные к обитанию в минеральных озерах, сочетают широкую физиологическую толерантность к меняющейся солености с довольно сильной зависимостью от других особенностей ареала обитания [5]. В естественных условиях минеральных озер основными

лимитирующими факторами формирования планктонного сообщества как важнейшего составляющего биоценозов являются: общая минерализация воды (соленость) [6, 7], рН [8] и уровеньный режим [9, 10]. На территории Юго-Восточного Забайкалья, отличающейся повышенной аридностью и крайней континентальностью климата, расположена Онон-Борзинская система озер, в пределах которой выделяется самый крупный Улдза-Торейский бессточный бассейн. Водоемы характеризуются высокой концентрацией солей и щелочными условиями существования [11]. Уровеньный режим озер непостоянен и подвержен значительным колебаниям, подчиняющимся внутривековым циклам продолжительностью 27–35 лет и контролируемым ходом атмосферного увлажнения, при котором относительно влажные и очень холодные периоды чередуются с сухими и относительно теплыми. При наступлении влажных периодов происходит обводнение озер и наступает

стадия трансгрессии уровня режима. В регрессивную фазу водности наблюдается значительное сокращение площадей и глубин озер, вплоть до полного высыхания некоторых из них [12]. Целью настоящей работы являлось выявление факторов окружающей среды, определяющих структуру планктонных биоценозов минеральных озер в разные фазы водности.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили результаты многолетних исследований, проведенных в трансгрессивную (1999 и 2003 гг.) и регрессивную (2011, 2014, 2016 гг.) фазы водности. Обследованные водоемы – Барун-Торей, Зун-Торей, Цаган-Нур (село Буйлэсан), Баин-Цаган, Баин-Булак, Укшинда, Булун-Цаган, Кулусу-Нур, Балыктуй, Хадатуй, Нижний Мукэй, Цаган-Нур (село Урта-Хоргана), Нарым-Булак, Цаган-Нур (село Новый Дурулгуй), Ножий – значительно различаются по морфометрическим показателям. Самыми крупными являются Торейские озера. Площадь Барун-Торей в годы высокой водности достигает 550 км², максимальная глубина – 4,3 м. Сток обводняющих озеро рек Улдза и Ималка наблюдается лишь в многоводные годы. С наступлением засушливых лет русла рек пересыхают, что, наряду с уменьшением количества осадков, приводит к быстрому обмелению и уменьшению площади зеркала озера, вплоть до его полного высыхания. Площадь озера Зун-Торей составляет 285 км², максимальная глубина – 6,50 м. Озеро питается в основном за счет водостока из Барун-Торей. Площадь других водоемов в многоводный период составляет не более 12 км². Вокруг озер хорошо заметны террасы усыхания и береговые валы, которые указывают на периодические изменения климата и обводненности территории. Днища водоемов чаще всего представляют собой плоские ванны с ограниченным водосбором и имеют блюдцеобразный рельеф дна. Дно озер сложено илистыми отложениями белесого цвета, которые вместе с гидрокарбонатными солями и взвесью придают воде молочно-белый цвет [13].

Сбор планктонных проб осуществляли в период максимального прогрева воды (июль–август). Отбор материала проводили в прибрежных и глубоководных участках озера. Для изучения фитопланктона пробы отбирали из двух-трех горизонтов (поверхность, глубина прозрачности воды, придонный горизонт) при помощи батометра Паталаса. Отбор зоопланктонных проб на глубинах более 0,5 м проводили тотально (дно-поверхность) сетью Джеди (размер ячеек сита 0,064 мм). На мелководных

воду (50–100 л) процеживали через гидробиологический сачок (размер ячеек сита 0,094 мм). Сбор и обработка планктонных проб проводились согласно стандартным методам [14].

Одновременно с отбором гидробиологических проб проводили измерения абиотических параметров среды (минерализация (Total Dissolved Solids, TDS), содержание растворенного кислорода, pH, температура воды) с помощью многопараметрического портативного анализатора качества вод (GPS-AQVAMETER «Aquaread», Великобритания). Прозрачность воды определяли стандартным диском Секки.

Первичные данные подвергнуты статистической и математической обработке с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 и надстройки для программы Microsoft Excel XLSTAT (Addinsoft, США). Для изучения взаимосвязей структурных характеристик планктона и абиотических факторов среды применяли метод главных компонент (Redundancy Analysis, RDA). В качестве переменных модели взяты 62 параметра: минерализация, pH, содержание растворенного кислорода, температура воды, глубина водоема, прозрачность воды, число видов фито- и зоопланктона, общая численность и общая биомасса фито- и зоопланктона, численность и биомасса основных таксономических групп водорослей (Cyanobacteria, Bacillariophyta, Cryptophyta, Chrysophyta, Charophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Dinophyta) и беспозвоночных (Rotifera, Cladocera, Copepoda), численность массовых видов фито- и зоопланктона (по 14 видов). Для снижения размерности признакового пространства проводили нормирование базы данных [15]. Среди полученных коэффициентов парной корреляции (r) производили отсев связей с $|r|$ менее 0,5. Доверительную оценку коэффициента корреляции проводили по t -критерию Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$. На основании корреляционной матрицы построены чертежи-схемы взаимосвязи компонентов планктонного сообщества.

Результаты и обсуждение

Всего в составе фитопланктона обследованных озер обнаружено 89 таксонов водорослей рангом ниже рода, относящихся к отделам: Cyanobacteria, Bacillariophyta, Cryptophyta, Chrysophyta, Charophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Dinophyta. Наибольший вклад в формирование таксономического состава вносили зеленые водоросли, диатомовые водоросли и цианобактерии, суммарно составляющие 84,32% от общего таксономического состава. Видовое богатство зоопланктона слагалось из 63 таксонов рангом ниже рода, из которых

Rotifera — 27 видов и подвидов, Copepoda — 22 вида, Cladocera — 13 видов и Anostraca — 1 вид. К часто встречающимся видам водорослей отнесены *Oocystis borgei* J.W. Snow, *O. submarina* Lagerheim, *Lemmermania komarekii* Hindak, *Ankyra ancora* (G.M. Smith) Fott, *Schroederia robusta* Korshikov, *S. setigera* (Schröder) Lemmermann, *Cyclotella* sp., *Cocconeis placentula* Ehrenberg, *Merismopedia minima* G. Beck in G. Beck & Zahlbruckner, *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault, *Oscillatoria amphibia* C. Agardh ex

персии незначительна, и поэтому они не рассматривались.

В многоводный период первая главная компонента (RDA-ось 1), описывающая 48,49% изменчивости сообщества, в качестве параметров с наибольшими положительными весовыми нагрузками имеет структурные характеристики Bacillariophyta и Chlorophyta. Вклад второй компоненты (RDA-ось 2) в объяснение изменчивости планктонного сообщества составил 19,05%. Факторная нагрузка положительная и определяется количественными

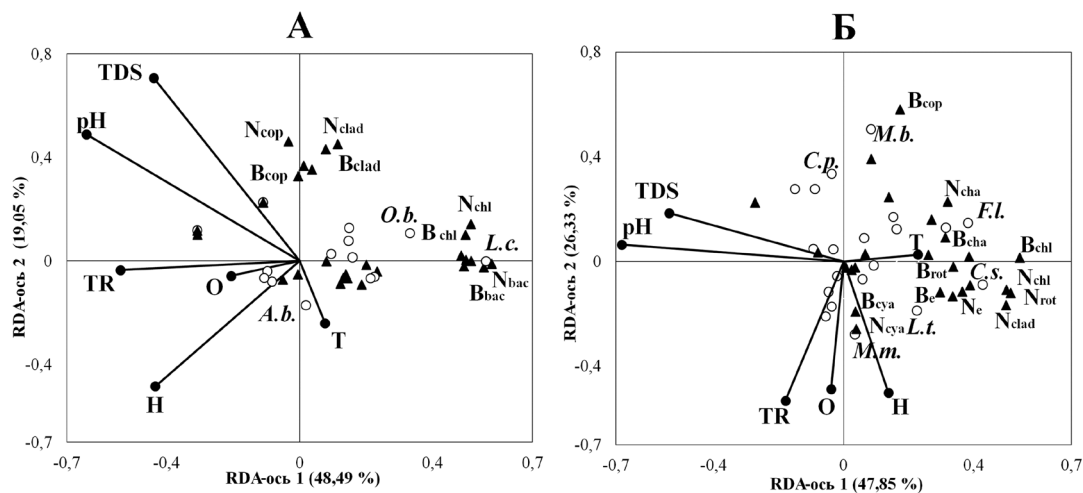


Рис. 1. Результаты RDA (Redundancy Analysis) на основе количественных показателей таксономических групп и видов фито- и зоопланктона. А — трансгрессивная фаза, Б — регрессивная фаза; TDS — минерализация, О — содержание растворенного кислорода, Т — температура воды, TR — прозрачность воды, Н — глубина водоема; N — численность, В — биомасса, chl — Chlorophyta, bac — Bacillariophyta, cha — Charophyta, e — Euglenophyta, cya — Cyanobacteria, rot — Rotifera, cop — Copepoda, clad — Cladocera, L.c. — *Lindavia comta*, O.b. — *Oocystis borgei*, C.p. — *Cocconeis placentula*, M.m. — *Merismopedia minima*, L.t. — *Lemmermannia triangularis*, F.l. — *Filinia longiseta*, M.b. — *Moina brachiata*, A.b. — *Arctodiaptomus bacillifer*, C.s. — *Cyclops strenuus*

Gomont, *Cryptomonas marsonii* Skuja, *Euglena* sp., а беспозвоночных — *Hexarthra mira* (Hudson), *Filinia longiseta* (Ehrenberg), *Daphnia magna* Straus, *Moina brachiata* (Jurine), *Diaphanasoma mongolianum* Ueno, *Arctodiaptomus neithammeri* (Mann), *A. bacillifer* (Koelbel), *Cyclops strenuus* Fischer.

Снижение атмосферного увлажнения с наступлением сухого и теплого периода способствовало понижению уровня воды в озерах и увеличению минерализации (от 0,43–2,57 г/л в 1999 г. до 58,10–81,36 г/л в 2014 г.) и pH (от 8,5–9,0 до 9,1–9,9, соответственно). Снижение теплоемкости озер вследствие роста солености стало причиной большего нагревания воды в летние месяцы (от 18,4–24 °C в 1999 г. до 21,2–28,8 °C в 2014 г.).

В результате RDA-анализа было выделено две компоненты, суммарный вклад которых в изменчивость планктонного сообщества составил 67,54% (в трансгрессивную фазу водности) и 74,18% (в регрессивную) (рис. 1). Доля остальных четырех компонент в общей дис-

показателями ракообразных (Cladocera и Copepoda). Из абиотических факторов среды наибольшее влияние на структуру планктонного биоценоза оказывают общая минерализация воды и pH. Анализ RDA на уровне видов показал, что наиболее чувствительными к воздействию факторов среди водорослей являлись *Lindavia comta* (Kützing) Nakov, Gullory, Julius, Theriot & Alverson и *Oocystis borgei*, среди беспозвоночных — *Arctodiaptomus bacillifer*.

В маловодные годы вклад первой главной компоненты (RDA-ось 1) в объяснение изменчивости экосистемы составил 47,85%. Наибольшими положительными весовыми нагрузками на первую компоненту характеризуются признаки количественных показателей Chlorophyta, Charophyta, Euglenophyta и Rotifera. На вторую компоненту (RDA-ось 2) приходилось 26,33% дисперсии. В положительном направлении она нагружена показателями биомассы Copepoda и численности Cladocera, в отрицательном — количественными показателями Cyanobacteria. Основным

абиотическим фактором, оказывающим влияние на структурную организацию планктонного сообщества, является рН. Виды водорослей *Cocconeis placentula*, *Merismopedia minima*, *Lemmermannia triangularis* (Chodat) C. Bock &

структурных характеристик гидробионтов являлась прозрачность воды. Факторная нагрузка этого показателя в оба периода водности отрицательная. Повышенное содержание взвешенных веществ в мелководных озерах, вслед-

Таблица

Корреляционная матрица некоторых количественных показателей основных таксономических групп видов фито- и зоопланктона в разные фазы водности ($p < 0,05$)

Трансгрессивная фаза											
	Cyan	Char	Chl	Din	Eug	Bac	Chr	Cryp	Rot	Cop	Clad
Cyan	1	-	-	-	0,51	-	-	-	-	-	-
Char	-	1	0,59	-	0,90	0,99	-	-	-	-	-
Chl	-	0,59	1	0,75	0,68	0,77	-	-	0,80	-	0,40
Din	-	-	0,75	1	0,90	0,99	-	-	-	-	-
Eug	0,51	0,90	0,68	0,90	1	0,87	-	-	-	-	-
Bac	-	0,99	0,77	0,99	0,87	1	-	-	-	-	-
Chr	-	-	-	-	-	-	1	0,85	-	0,82	0,81
Cryp	-	-	-	-	-	-	0,85	1	-	0,63	0,65
Rot	-	-	0,80	-	-	-	-	-	1	-	0,42
Cop	-	-	-	-	-	-	0,82	0,63	-	1	0,79
Clad	-	-	0,40	-	-	-	0,81	0,65	0,42	0,79	1

Регрессивная фаза									
	Cyan	Char	Chl	Din	Eug	Bac	Rot	Cop	Clad
Cyan	1	-	0,94	0,62	-	-	-	-	-
Char	-	1	0,78	0,58	-	-	0,92	0,44	-
Chl	0,94	0,78	1	0,50	0,61	-	0,77	0,57	-
Din	0,62	0,58	0,50	1	-	-	0,47	-	-
Eug	-	-	0,61	-	1	-	0,46	-	-
Bac	-	-	-	-	-	1	-	-	0,92
Rot	-	0,92	0,77	0,47	0,46	-	1	0,58	-
Cop	-	0,44	0,57	-	-	-	0,58	1	0,42
Clad	-	-	-	-	-	0,92	-	0,42	1

Krienitz in C. Bock et al. и беспозвоночных *Filinia longiseta*, *Moina brachiata*, *Cyclops strenuus* отнесены к видам, наиболее чувствительным к воздействию факторов среды.

В целом, и в трансгрессивную, и в регрессивную фазы водности наибольшие факторные нагрузки приходились на показатели минерализации (TDS) и рН. Это подтверждает, что соленость и рН являются основными факторами, определяющими природу биологических сообществ [6–8]. Влияние минерализации проявлялось в большей мере в маловодный период, когда водоемы мелководны и хорошо прогреваемы, что характерно и для других озер [16, 17]. Следует отметить, что еще одним важным фактором в определении

стивие ветрового взмучивания донных осадков, влияет на видовой состав фитопланктона, что проявляется в превалировании бентосных форм над истинно планктонными видами среди диатомовых водорослей и возрастании удельного веса монадных форм зеленых водорослей. В озерах с большей прозрачностью складываются более благоприятные трофические условия. Наблюдается большее разнообразие мелкоразмерных форм планктона, пригодных для питания фильтраторов и хищников [17, 18]. Влияние других факторов выявить достаточно сложно из-за подавляющего действия минерализации и рН на гидробиоценозы [19].

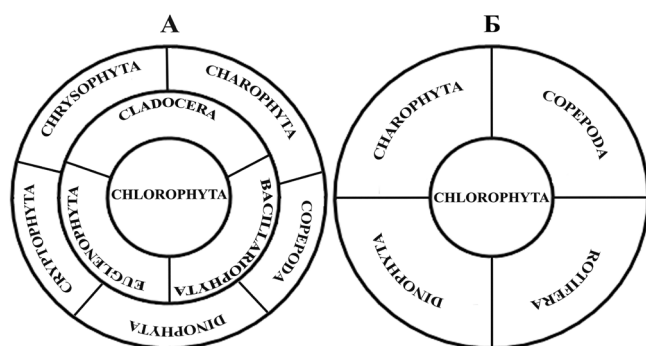


Рис. 2. Схема ассоциативного взаимоотношения компонентов планктонного сообщества минеральных озер Улдза-Торейского бассейна в разные фазы водности. А – трансгрессивная фаза, Б – регрессивная фаза

Кроме внешних факторов, влияющих на структуру планктоценозов, значительную роль играют также внутренние факторы, к которым относятся различные типы связей между организмами, образующими природные ассоциации [20, 21]. Методом корреляционного анализа (таблица) установлена схема структурной организации сообществ водорослей и беспозвоночных планктона обследованных озер в разные фазы водности (рис. 2).

В трансгрессивную фазу водности планктоценоз характеризовался большим разнообразием и состоял из девяти основных взаимосвязанных между собой компонентов, в регрессивную – из пяти. В обоих случаях главным структурообразующим элементом являлись водоросли отдела Chlorophyta. Различался состав стабильных доминантов [20]: в многоводные годы – это Bacillariophyta, Euglenophyta и Cladocera, в маловодные – Charophyta, Dinophyta, Rotifera и Copepoda. Представители криптофитовых и хризифитовых водорослей встречались только в многоводные годы в олиго- и мезогалинных водое-

мах. В маловодные годы в условиях гипергалинности в массе развивались цианобактерии (*Aphanizomenon flos-aquae*) и коловратки (*Brachionus plicatilis* Müller). Аналогичные сочетания компонентов в планктонных ассоциациях в разные периоды водности отмечаются и в других минеральных озерах [22–24].

Наличие выраженной корреляции между количественными показателями зоопланктона и количественными показателями фитопланктона может свидетельствовать о роли зеленых и золотистых водорослей, криптонад и диатомей в питании коловраток, веслоногих и ветвистоусых ракообразных (таблица). Исследования минеральных водоемов [21, 25] показали, что на численность водорослей и беспозвоночных межвидовые конкурентные взаимоотношения оказывают большое влияние.

Таким образом, структурные характеристики планктонных сообществ минеральных озер зависят от химического состава воды, в трансгрессивную фазу водности – это минерализация и pH, в регрессивную – pH. Зеленые водоросли являются главным структурообразующим элементом природных ассоциаций планктона независимо от водности. Представители Chlorophyta, Chrysophyta, Cryptophyta и Bacillariophyta могут играть существенную роль в питании Rotifera, Copepoda и Cladocera.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований СО РАН (проект № IX.137.1.1).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Williams W.D. Environmental threats to salt lakes and the likely status of inland saline ecosystems in 2025 // Environ. Conserv. 2002. Vol. 29. N 2. P. 154–167.
2. Alexe M., Șerban G., Baricz A., Andrei, A.-Ș., Cristea A., Battes K.P., Compean M., Momeu L., Muntean V., Porav S.A., Banciu H.L. Limnology and plankton diversity of salt lakes from Transylvanian Basin (Romania): A review // J. Limnol. 2018. Vol. 77. N 1. P. 17–34.
3. Golubkov S.M., Golubkov M.S., Balushkina E.V., Litvinchuk L.F., Gubelit Y.I. Biodiversity-productivity relationships in the ecosystems of salt lakes // Proc. Zool. Inst. Rus. Acad. Sci. 2006. Vol. 310. P. 67–74.
4. Shadrin N.V., Anufrieva E.V. Climate change impact on the marine lakes and their Crustaceans: The case of marine hypersaline Lake Bakalskoye (Ukraine) // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 2013. Vol. 13. N 3. P. 603–611.
5. Herbst D. Gradients of salinity stress, environmental stability and water chemistry as a templet for defining habitat types and physiological strategies in inland salt waters // Hydrobiologia. 2001. Vol. 466. N 1–3. P. 209–219.

6. Alimov A.F. Relations between biological diversity in continental waterbodies and their morphometry and water mineralization // *Inland Water Biol.* 2008. Vol. 1. N 1. P. 1–6.
7. Williams W.D. Salinity as a determinant of the structure of biological communities in salt lakes // *Hydrobiologia.* 1998. Vol. 381. N 1–3. P. 191–201.
8. Ivanova M.B., Kazantseva T.I. Effect of water pH and total dissolved solids on the species diversity of pelagic zooplankton in lakes: A statistical analysis // *Rus. J. Ecol.* 2006. Vol. 37. N 4. P. 264–270.
9. Веснина Л.В., Пермякова Г.В., Ронжина Т.О. Биота промысловых гипергалинных озер Алтайского края в трансгрессивную и регрессивную фазы водности // *Вест. КамчатГТУ.* 2012. № 21. С. 24–30.
10. Doyle W.S. Changes in lake levels, salinity and the biological community of Great Salt Lake (Utah, USA), 1847–1987 // *Hydrobiologia.* 1990. Vol. 197. N 1. P. 139–146.
11. Sklyarov E.V., Men'shagin Y.V., Danilova M.A., Sklyarova O.A. Mineralized lakes of the Transbaikalia and Northeastern Mongolia: Specific features of occurrence and ore-generating potential // *Geogr. Nat. Resour.* 2011. Vol. 32. N 4. P. 323–332.
12. Обязов В.А. Изменение климата и гидрологического режима рек и озер в Даурском экорегионе // *Проблемы адаптации к изменению климата в бассейнах рек Даурии: экологические и водохозяйственные аспекты* / Отв. ред. О.К. Кирилюк. Чита: Экспресс-издательство, 2012. С. 24–45.
13. Kuklin A.P., Tsybekmitova G.Ts., Gorlacheva E.P. State of lake ecosystems in Onon-Torei plain in 1983–2011 (Eastern Transbaikalia) // *Arid Ecosystems.* 2013. Vol. 6. N 3. P. 122–130.
14. Киселев И.А. Планктон морей и континентальных водоемов. В 2 т. Л.: Наука, 1969. Т. 1. 658 с.
15. Förster E., Rönz B. Methoden der korrelations-und regressionsanalyse. Ein leitfaden für Ökonomen. Berlin: Verlag die Wirtschaft, 1979. 245 pp.
16. Nüdli J., De Meester L., Major B., Schwenk K., Szivók I., Forry L. Salinity and depth as structuring factors of cryptic divergence in *Moina brachiata* (Crustacea: Cladocera) // *Fund. Appl. Limnol.* 2014. Vol. 184. N 1. P. 69–85.
17. Vignatti A., Cabrera G., Echaniz S. Changes in the zooplankton and limnological variables of a temporary hypo-mesosaline wetland of the central region of Argentina during its drying // *Pan-Am. J. Aquat. Sci.* 2012. Vol. 7. N 2. P. 93–106.
18. Echaniz S.A., Cabrera G.C., Aliaga P.L., Vignatti A.M. Variations in zooplankton and limnological parameters in a saline lake of La Pampa, Central Argentina, during an annual cycle // *Int. J. Ecosys.* 2013. Vol. 3. N 4. P. 72–81.
19. Litvinenko L.I., Litvinenko A.I., Boyko E.G., Kutsanov K.V. Effect of environmental factors on the structure and functioning of biocoenoses of hyperhaline water reservoirs in the South of Western Siberia // *Contemp. Probl. Ecol.* 2013. Vol. 6. N 3. P. 252–261.
20. Bukharin O.V., Nemtseva N.V., Yatsenko-Stepanova T.N. Assessment of relationships between symbionts in phytoplankton community // *Russ. J. Ecol.* 2010. Vol. 41. N 1. P. 15–19.
21. Lazareva V.I. Topical and trophic structure of midsummer zooplankton in saline rivers in the Elton Lake basin // *Arid Ecosystems.* 2017. Vol. 7. N 1. P. 59–68.
22. Afonina E.Y., Tashlykova N.A. Plankton community and the relationship with the environment in saline lakes of Onon-Torey plain, Northeastern Mongolia // *Saudi J. Biol. Sci.* 2018. Vol. 25. N 2. P. 399–408.
23. Ionescu V., Năstăsescu M., Spiridon L., Bulgăreanu V.C. The biota of Romanian saline lakes on rock salt bodies: A review // *Int. J. Salt Lake Res.* 1998. Vol. 7. N 1. P. 45–80.
24. Zhao W., Zheng M., Xu X., Liu X., Guo G., He Z. Biological and ecological features of saline lakes in northern Tibet, China // *Hydrobiologia.* 2005. Vol. 541. N 1. P. 189–203.
25. Nabivailo Yu.V., Titlyanov E.A. Competitive relationships in natural and artificial algal communities // *Russ. J. Mar. Biol.* 2006. T. 32. N 5. P. 521–531.

Поступила в редакцию
26.04.2018

Поступила после доработки
12.11.2018

Принята в печать
20.11.2018

RESEARCH ARTICLE

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE PLANKTON COMMUNITIES STRUCTURE IN SALINE LAKES AT DIFFERENT WATER PHASES

E.Yu. Afonina*, N.A. Tashlykova

*Institute of Natural Resources, Ecology and Cryology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Nedorezova str. 16a, Chita, 672014, Russia***e-mail: kataf@mail.ru*

The work is based on the results of long-term studies of phytoplankton and zooplankton in soda-saline lakes of the Uldza-Torey basin (South-Eastern Transbaikalia). The unstable level regime of steppe lakes, due to climatic fluctuations, leads to the lake morphometric and hydrochemical regime changes, and, as a consequence, to the plankton community's transformation. The aim of this work is to identify and analyze environmental factors that determine the structure of planktonic biocenoses in mineral lakes at the different water phases. According to statistical analysis of auxiliary models based on the redundancy analysis (RDA) the significance factors were mineralization and pH in the transgressive water phase, pH was in the regressive phase. The interconnection schematic drawings within the plankton community are constructed on the basis of the correlation matrix. There were nine interrelated components in the plankton natural associations in high water level period and only five components were in low water level. Algae Chlorophyta were the basic structure-forming element of plankton community regardless of the water level periods. Euglenophyta, Bacillariophyta, Cladocera were the second most significant elements in the structural organization in high water level years and Charophyta, Dinophyta, Rotifera, Copepoda were in years of low water level.

Keywords: *phytoplankton, zooplankton, water phase, environmental factors, mineral lakes, Uldza-Torey basin*

Сведения об авторах

Афони́на Екатерина Юрьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории водных экосистем Института природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН. Тел.: 8-924-513-33-74; e-mail: kataf@mail.ru

Ташлы́кова Ната́лия Алекса́ндровна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории водных экосистем Института природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН. Тел.: 8-924-275-12-27; e-mail: nattash2005@yandex.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 595.77; 591.499.6

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛОМЕТРИИ ФОРМЫ И ЖИЛКОВАНИЯ
КРЫЛЬЕВ НАСЕКОМЫХ. ЧАСТЬ 2. DIPTERA

О.А. Беляев*, С.Э. Фарисенков

Кафедра энтомологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

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

В работе исследовалось влияние размеров тела на форму крыла и расположение жилок у широкого круга семейств двукрылых насекомых (Diptera). В качестве показателей размеров тела использовались масса тела и длина торакса. Форма крыла была охарактеризована такими параметрами, как удлинение крыла и расположение геометрического центра относительно его продольной оси. Аллометрию жилкования изучали методами геометрической морфометрии. Было выявлено, что характер зависимости формы крыла от размеров тела неодинаков у короткоусых (Brachycera) и длинноусых (Nematocera) двукрылых. У Nematocera удлинение крыла возрастает с размерами тела, у Brachycera какая-либо корреляция отсутствует. Для Brachycera прослеживается смещение геометрического центра крыла в сторону его основания с увеличением размеров тела, для Nematocera какой-либо корреляции не наблюдается. Было показано, что аллометрический компонент изменчивости расположения жилок существенно варьирует между разными семействами. С увеличением размеров тела у большинства изученных Brachycera-Cyclorrhapha (Calliphoridae, Muscidae, Sarcophagidae, Sepsidae, Tachinidae) жилка r-m смещается в базальном направлении, а жилка dm-cu – в апикальном. В подотряде Brachycera-Orthorrhapha (Asilidae, Dolichopodidae, Empididae, Rhagionidae, Tabanidae) точка слияния жилки R_{2+3} с C смещается в сторону апекса. Для представителей Nematocera (Chironomidae, Limoniidae, Tipulidae) характерно перемещение точки слияния жилки CuA_2 с C в сторону основания крыла, а жилки r-m – в сторону апекса. Полученные результаты подтверждают значительное влияние размеров тела на форму крыльев Diptera. Однако характер аллометрии в разных подотрядах различен, вероятно, по причине того, что значения полетных характеристик (частоты, амплитуды взмахов), относительные размеры крыла (отношение площади крыла к массе тела) и жилкование сильно варьируют у двукрылых. Можно заключить, что в рамках отряда Diptera размер тела не является главным фактором, определяющим форму крыла.

Ключевые слова: *Diptera, размеры тела, аллометрия, геометрическая морфометрия, форма крыла, жилкование крыльев*

Явление аллометрии убедительно доказано для многих животных, в том числе насекомых [1]. Известно, что размеры тела оказывают заметное влияние на расположение элементов жилкования и форму крыла насекомых как на уровне отрядов и семейств [2, 3], так и на внутривидовом уровне [4, 5]. Подобные аллометрические изменения могут

иметь адаптивное значение для насекомых [6]. Так, например, миниатюризация приводит к редукции жилкования и развитию бахромки на крыльях [7], что, по-видимому, является адаптацией к полету при малых размерах и низких числах Рейнольдса. Зависимость расположения геометрического центра и удлинения крыла от размеров тела была

показана для некоторых Hymenoptera [3]. Исходя из этого, мы предположили наличие подобной аллометрии у Diptera. Целью работы было выявление у двукрылых зависимости формы крыла и характера жилкования от размеров тела.

Материалы и методы

Исследование проведено на 527 особях — представителях 58 родов двукрылых из 26 семейств (таблица). Используемые в работе насекомые были отловлены в период с 2010 по 2015 гг. в парках Москвы и на территории Звенигородской биологической станции имени С.Н. Скадовского.

Каждый вид в настоящем исследовании представлен одним полом, чтобы исключить возможное влияние на результаты полового диморфизма формы крыла, о наличии которого сообщают некоторые авторы [8–10]. При этом мы изучали преимущественно самцов, поскольку масса тела самок может существенно меняться в ходе репродуктивного цикла. Исключения были сделаны для кровососущих (Culicidae, Tabanidae) и паразитических двукрылых (часть Bombyliidae, Tachinidae), так как отлов самцов этих насекомых оказался затруднительным.

Массу тела (m) измеряли на аналитических весах после фиксации насекомого парами этилацетата. Если m особи оказывалась ниже порога взвешивания, то насекомых одного вида взвешивали в достаточном для измерения количестве одновременно и полученный результат делили на число особей, чтобы вычислить среднее значение. В качестве меры длины тела использовали длину торакса. По фотографиям крыльев, полученных на микроскопе с апохроматическими объективами, в программе AutoCAD 2015 (Autodesk, Inc., США) были измерены длина (l) и площадь (S) крыла, а также расстояние от апекса до точки ортогональной проекции геометрического центра крыла на его продольную ось (l_c). Удлинение крыла было рассчитано по формуле $AR = l^2/S$. Для оценки местоположения геометрического центра крыла использовали соотношение l_c/l , позволяющее выявить его расположение вдоль продольной оси крыла (рис. 1). Геометрический центр крыла рассчитан как центр масс плоской фигуры, которую образует контур крыла.

Для каждого вида были вычислены медианные значения характеристик. Необходимость использования медиан вместо средних значений измеренных характеристик продиктована относительно небольшими объемами выборок, к тому же распределения, как правило, далеки от нормальных [11]. Чтобы выя-

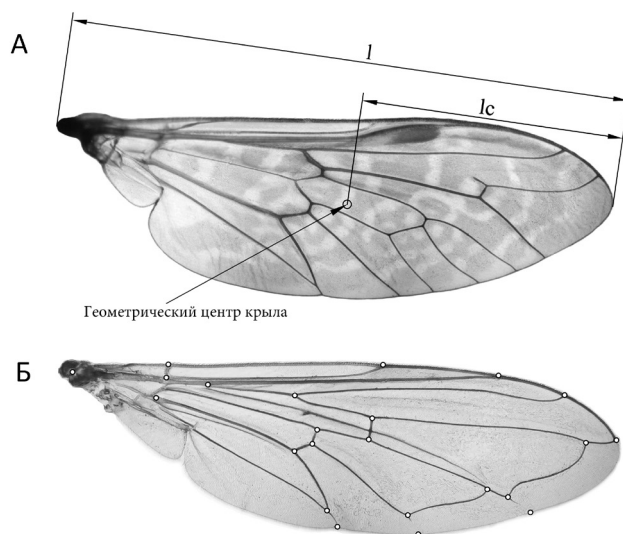


Рис. 1. Схема измерения линейных характеристик крыла (А) и размещения меток (Б). Расшифровка обозначений дана в тексте (Материалы и методы)

вить аллометрические изменения формы крыльев, был проведен регрессионный анализ медианных значений методом главных осей в среде R с использованием пакета SMATR [12].

Для анализа методами геометрической морфометрии была отобрана большая часть материала: 415 особей — представителей 38 родов из 16 семейств (таблица). Крылья с недопустимыми для геометрической морфометрии повреждениями не были включены в дальнейший анализ.

Для обозначения жилок использовали номенклатуру, как в монографиях «Manual of Nearctic Diptera» [13, 14], применяющуюся также и в более поздних работах. Метки были проставлены у основания крыла, в местах ветвлений и пересечений жилок, в том числе в точках вхождения жилок в край крыла. В случае жилки, утончающейся до подобия складки, но не достигающей края крыла, метку ставили на пересечении края крыла условной линией, продолжающей эту жилку. В случае резко обрывающейся жилки метку проставляли на ее конце. Таким образом, нами были использованы метки только I и II типа [15, 16]. Оцифровка меток и создание файлов с координатами меток и контурами крыльев выполнено с помощью программ tpsUtil и tpsDig2 [17, 18]. Для уменьшения ошибок метки для каждого крыла проставляли дважды [19], затем координаты были усреднены. Морфометрический анализ координат проведен в программе MorphoJ [20]. Статистическую обработку данных производили в программе STATISTICA 10 (Statsoft, Inc., США).

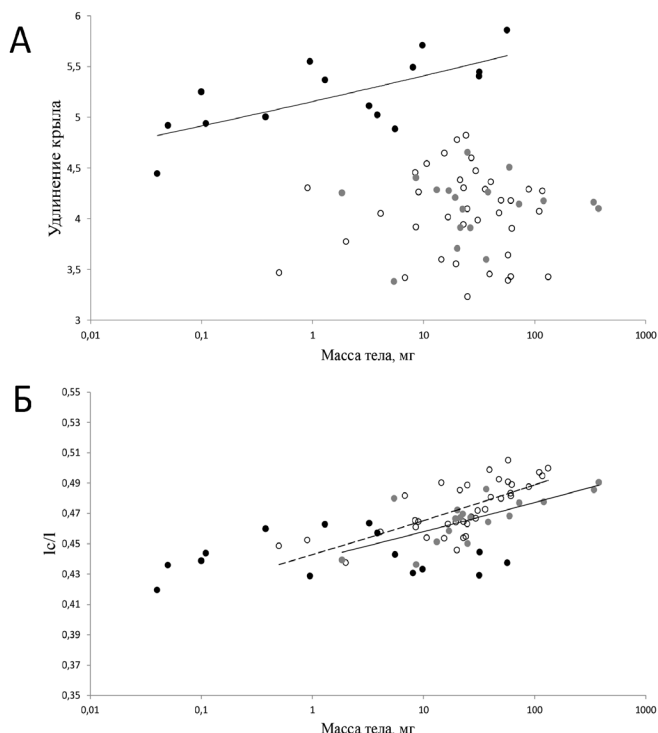


Рис. 2. Аллометрические кривые зависимости параметров крыльев от массы тела. Черные точки — Nematocera, серые точки — Brachycera-Orthorrhapha (линия тренда сплошная), выколотые точки — Brachycera-Cyclorrhapha (линия тренда пунктирная). Расшифровка обозначений дана в тексте (Материалы и методы)

Результаты

Регрессионный анализ морфологических характеристик крыльев. Аллометрические зависимости характеристик формы крыльев от размерных параметров (массы тела и длины торакса) были построены независимо друг от друга.

AR и l_c/l по-разному изменяются у длинноусых и короткоусых двукрылых с увеличением массы тела и длины торакса. У Brachycera-Cyclorrhapha и Brachycera-Orthorrhapha AR не коррелирует с размерами тела, в то время как у Nematocera выявлена прямая зависимость вида $AR = 5,13m^{0,02}$ (рис. 2А). При этом для Nematocera не обнаружена связь геометрического центра крыла с массой тела и длиной торакса, а у Brachycera l_c/l смещается в сторону основания с увеличением массы тела: зависимость имеет вид $l_c/l = 0,44m^{0,03}$ для подотряда Brachycera-Cyclorrhapha и $l_c/l = 0,44m^{0,02}$ для подотряда Brachycera-Orthorrhapha, наклон линий регрессии статистически значимо не различается (рис. 2Б). При использовании длины торакса как переменной, характеризующей размеры

тела, вышеперечисленные аллометрические зависимости проявляются сходным образом.

Геометрическая морфометрия. Анализ методами геометрической морфометрии был проведен отдельно для представителей каждого семейства. Однако и внутри одного семейства в некоторых случаях жилкование крыльев было не однотипным. Одним из путей решения данной проблемы было исключение ряда видов из анализа (например, некоторых Syrphidae), в других случаях негомологичные участки не были покрыты метками (например, у Limoniidae).

Регрессионный анализ показал, что центроидный размер, представляющий собой сумму квадратов расстояний между всеми метками, находится в прямой зависимости от массы тела и длины торакса. Поэтому в качестве критерия, отражающего размеры тела, можно использовать центроидный размер.

Для выявления изменений в расположении элементов жилкования был проведен регрессионный анализ зависимости прокрустовых координат от центроидного размера. В качестве зависимых переменных выступала

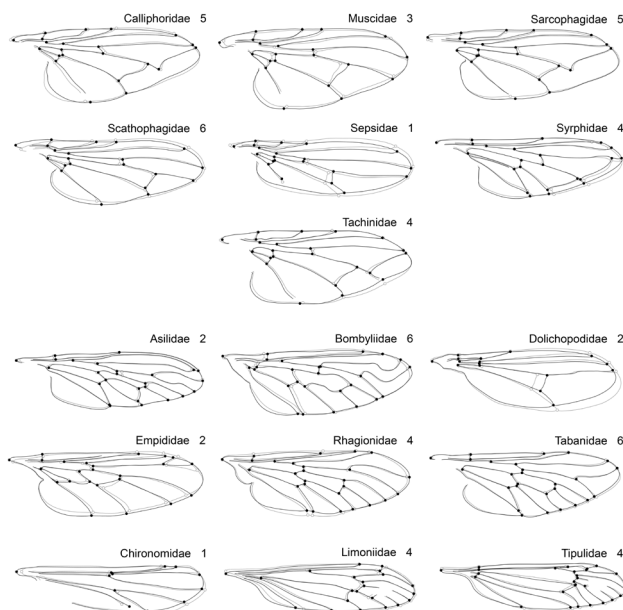


Рис. 3. Деформации формы, полученные на основе регрессионного анализа зависимости прокрустовых координат от центроидного размера после исключения остаточной регрессии. Серым контуром обозначены эталонные конфигурации, черным контуром — конфигурации, соответствующие изменению формы при увеличении центроидного размера. В большинстве случаев масштаб изменений увеличен для наглядности, масштабные коэффициенты приведены. Контурные крыльев построены для лучшего восприятия и не несут точной информации о деформации контура при изменении центроидного размера

Таблица

Число исследованных насекомых, а также их пол и медианные значения размерных характеристик

Подотряд	Семейство	Вид	Пол	Число особей	Масса тела, мг	Длина торакса, мм
Nematocera	Cecidomyiidae	<i>Mayetiola destructor</i>	♂	2	-	0,49
	Chironomidae	<i>Corynoneura scutellata</i> *	♂	10	0,04	0,51
		<i>Cladotanytarsus</i> sp. 1 *	♂	10	0,05	0,51
		<i>Cladotanytarsus</i> sp. 2 *	♂	10	0,10	0,55
		<i>Cladotanytarsus</i> sp. 3 *	♂	10	0,11	0,62
		<i>Paratendipes</i> sp. *	♂	10	0,38	0,88
		<i>Chironomus</i> sp. *	♂	12	1,30	1,49
	Culicidae	<i>Aedes communis</i>	♀	4	3,30	2,02
		<i>Culex pipiens</i>	♀	2	3,90	1,86
	Limoniidae	<i>Erioptera lutea</i> *	♂	4	1,00	1,06
		<i>Limonia phragmitidis</i> *	♂	2	5,60	2,04
		<i>Metalimnobia quadrimaculata</i> *	♂	15	32,00	3,70
	Tipulidae	<i>Nephrotoma aculeata</i> *	♂	2	8,10	2,49
		<i>Nephrotoma crocata</i> *	♂	2	31,80	3,62
		<i>Nephrotoma tenuipes</i> *	♂	2	9,80	2,81
		<i>Tipula paludosa</i> *	♂	2	56,80	4,42
Brachycera-Orthorrhapha	Asilidae	<i>Tolmerus atricapillus</i> *	♂	11	59,50	4,04
		<i>Dioctria cothurnata</i> *	♂	10	25,00	3,19
	Bombyliidae	<i>Hemipenthes maura</i> *	♂	18	22,60	3,44
		<i>Hemipenthes morio</i> *	♂	16	21,50	3,37
		<i>Villa</i> sp. *	♀	7	72,70	4,86
	Dolichopodidae	<i>Chrysotus neglectus</i> *	♂	2	-	1,03
		<i>Dolichopus unguulatus</i> *	♂	6	8,60	1,99
	Empididae	<i>Empis livida</i> *	♂	18	17,00	2,70
		<i>Empis tessellata</i> *	♂	18	38,30	3,54
	Hybotidae	<i>Hybos grossipes</i>	♂	2	1,90	1,29
		<i>Platypalpus ciliaris</i>	♂	2	-	0,73
	Rhagionidae	<i>Rhagio lineola</i> *	♂	6	5,50	1,96
		<i>Rhagio tringarius</i> *	♂	15	26,50	3,15
	Stratiomyidae	<i>Chloromyia formosa</i>	♂	2	13,20	2,51
	Tabanidae	<i>Chrysops caecutiens</i> *	♀	7	36,80	3,51
		<i>Chrysops relictus</i> *	♀	4	20,20	3,10
		<i>Haematopota pluvialis</i> *	♀	19	19,40	3,14
		<i>Hybomitra nitidifrons confiformis</i> *	♀	4	121,30	5,22
		<i>Tabanus bovinus</i> *	♀	5	342,70	6,78
		<i>Tabanus sudeticus</i> *	♀	3	378,50	9,18

Примечание: звездочкой (*) помечены виды, включенные в анализ методами геометрической морфометрии

Подотряд	Семейство	Вид	Пол	Число особей	Масса тела, мг	Длина торакса, мм
Brachycera-Cyclorrhapha	Anthomyiidae	<i>Hydrophoria lancifer</i>	♂	5	14,50	3,16
	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i> *	♂	10	57,80	4,66
		<i>Cynomya mortuorum</i> *	♂	10	57,60	4,19
		<i>Lucilia caesar</i> *	♂	15	39,30	4,11
	Chloropidae	<i>Chlorops</i> sp.	♂	3	2,00	0,8
	Conopidae	<i>Conops quadrifasciatus</i>	♂	2	24,10	3,24
		<i>Leopoldius signatus</i>	♂	2	20,00	2,63
		<i>Physocephala chrysorrhoea</i>	♂	2	36,00	3,81
		<i>Sicus ferrugineus</i>	♂	10	24,80	2,71
	Drosophilidae	<i>Drosophila melanogaster</i>	♂	5	0,50	0,79
	Muscidae	<i>Musca domestica</i> *	♂	5	6,80	2,46
		<i>Mydaea humeralis</i> *	♂	2	24,90	3,32
	Psilidae	<i>Psila fimetaria</i>	♂	15	22,90	3,14
	Sarcophagidae	<i>Sarcophaga carnaria</i> *	♂	20	62,40	4,69
	Scathophagidae	<i>Scathophaga inquinata</i> *	♂	4	8,60	2,50
		<i>Scathophaga lutaria</i> *	♂	9	16,60	3,04
		<i>Scathophaga stercoraria</i> *	♂	9	30,80	3,50
	Sepsidae	<i>Sepsis fulgens</i> *	♂	10	0,90	1,15
	Sphaeroceridae	<i>Leptocera</i> sp.	♂	2	-	0,33
	Syrphidae	<i>Cheilosia pagana</i> *	♂	2	8,40	2,27
		<i>Chrysotoxum festivum</i> *	♂	5	61,2	4,10
		<i>Episyrphus balteatus</i> *	♂	7	27,0	3,36
		<i>Eristalis arbustorum</i>	♂	12	47,80	4,07
		<i>Eristalis tenax</i>	♂	7	110,20	5,11
		<i>Helophilus pendulus</i>	♂	8	50,00	3,91
		<i>Helophilus trivittatus</i>	♂	10	88,90	4,78
		<i>Platycheirus albimanus</i> *	♂	4	9,00	2,45
		<i>Platycheirus clypeatus</i> *	♂	2	4,10	1,95
		<i>Sphaerophoria scripta</i> *	♂	8	15,40	2,53
		<i>Syritta pipiens</i>	♂	4	10,70	2,12
		<i>Syrphus ribesii</i> *	♂	12	40,40	3,88
		<i>Syrphus vitripennis</i> *	♂	4	21,30	3,60
		<i>Volucella pellucens</i>	♂	7	117,50	5,38
		<i>Xylota segnis</i> *	♂	7	29,50	3,40
		<i>Xylota tarda</i> *	♂	2	23,00	3,08
	Tachinidae	<i>Brullaea ocypteroidea</i>	♀	4	19,60	2,79
		<i>Linnaemya</i> sp. *	♀	4	61,00	4,32
		<i>Nemoraea pellucida</i> *	♀	4	132,60	5,77

форма крыльев отдельных особей. Вариацию переменных формы можно разделить на остаточную и предсказанную, последняя из которых в данном случае отражает различия, свя-

занные с изменением центроидного размера и, следовательно, размеров тела [5, 21]. Для Conopidae и Psilidae зависимость формы крыла от центроидного размера при имеющихся

объемах выборок оказалась статистически недостоверной ($p > 0,05$) по критерию перестановки (эквивалентному тесту Гудала), поэтому оба эти семейства не участвовали в дальнейшем анализе. Было обнаружено, что доля аллометрического компонента изменчивости формы крыла существенно различается в выбранных группах и составляет от 12% до 74%. Чтобы оценить зависимость доли аллометрического изменения формы крыльев от диапазона размеров тела, был вычислен коэффициент корреляции Спирмена между долей предсказанной регрессии относительно совокупной и коэффициентом вариации центроидного размера каждого исследуемого семейства. Выявлено отсутствие корреляции ($r_s = 0,38$, $p = 0,14$). Это говорит о том, что доля предсказанной регрессии существенно варьирует между семействами.

Для выявления зависимости расположения элементов жилкования от центроидного размера был проведен анализ аллометрического компонента изменчивости формы крыла методом относительных деформаций, результаты которого представлены на рис. 3. В целом какие-либо общие для всех групп тенденции обнаружить не удалось, однако внутри каждого подотряда расположение отдельных жилок имеет сходную зависимость от центроидного размера. С увеличением центроидного размера у *Brachycera-Cyclorhapha* (*Calliphoridae*, *Muscidae*, *Sarcophagidae*, *Sepsidae*, *Tachinidae*) наблюдается смещение жилки $r-m$ в базальном направлении и жилки $dm-cu$ в апикальном, у *Brachycera-Orthorrhapha* (*Asilidae*, *Dolichopodidae*, *Empididae*, *Rhagionidae*, *Tabanidae*) — апикальное смещение точки слияния жилки R_{2+3} с C . Для представителей *Nematocera* (*Chironomidae*, *Limoniidae*, *Tipulidae*) в этом случае отмечено перемещение точки слияния жилки CuA_2 с C в сторону основания крыла и жилки $r-m$ в сторону апекса.

Обсуждение

Смещение геометрического центра в сторону апекса крыла при уменьшении размеров тела у *Brachycera* связано, по-видимому, с изменениями аэродинамических свойств крыльев. Чем меньше насекомое, тем затруднительнее использование малых углов атаки крыла. При низких числах Рейнольдса полет гребного типа (с большими углами атаки) более эффективен, при этом большая часть аэродинамической силы создается за счет лобового сопротивления крыла [22]. В таких условиях может быть адаптивным увеличение апикальной области крыла, которая имеет наибольшую скорость движения и, следова-

тельно, сравнительно большее лобовое сопротивление.

Удлинение крыльев с увеличением размеров тела было показано для *Hymenoptera* [3, 23]. Крупным насекомым выгодно иметь узкие длинные крылья в связи с особенностями образования прикрепленного вихря передней кромки при относительно высоких числах Рейнольдса [24]. Наши результаты, полученные для *Nematocera*, согласуются с данным утверждением. Однако удлинение крыла не коррелирует с размерами тела у *Brachycera*, что может быть следствием большего разнообразия исследованных представителей данной группы по сравнению с исследованными *Nematocera*. Ранее нами было показано [25], что представители различных семейств *Brachycera* демонстрируют довольно широкий диапазон характеристик полета, таких как частота и амплитуда взмахов. Относительные размеры крыла (отношение площади крыла к массе тела) могут существенно различаться у представителей разных семейств при сходной массе тела. Поскольку форма крыла связана с его аэродинамикой и полетными характеристиками, широкая вариабельность последних не позволяет оценить влияние размеров тела на удлинение.

Общие тенденции в аллометрии жилкования не были обнаружены, вероятно, по причине слишком большого разнообразия в расположении жилок в рамках отряда. Такие характеристики полета, как частота и амплитуда взмахов, так же связаны с формой крыла, а их значения сильно варьируют у двукрылых [26, 27]. Можно предположить, что размер тела не является главным фактором, определяющим морфологию крыла у двукрылых.

Мы благодарим В.Э. Пилипенко за помощь в определении *Tipulidae* и *Limoniidae*, Т.В. Галинскую за помощь в определении некоторых *Conopidae*, С.Н. Лысенкова за помощь в определении некоторых *Syrphidae*, А.А. Полилова за консультации и предоставление *Cecidomyiidae* и *Sphaeroceridae*, Е.И. Балакиреву за предоставление *Drosophila melanogaster*. Мы выражаем признательность А.А. Пржиборо за определение большинства *Chironomidae*, С.В. Айбулатову за определение *Culicidae* и *Hybomitra*, Н.Е. Вихреву за определение *Anthomyiidae* и *Mycetidae*, И.В. Шамшеву за помощь в определении *Hybotidae* и консультации, И.Я. Гричанову за помощь в определении *Dolichopodidae* и консультации, Д.М. Астахову за помощь в определении *Asilidae* и консультации, Э.П. Нарчук за консультации. Мы также благодарны Т. Zeegers (Суст, Нидерланды) за помощь в определении

Tachinidae и J. Carr (Массачусетс, США) за консультации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-14-00208).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панов Е.Н. Половой отбор: теория или миф? Полевая зоология против кабинетного знания. М.: Т-во научн. изд. КМК, 2014. 412 с.
2. Расницын А.П. Происхождение и эволюция низших перепончатокрылых // Тр. Палеонтол. ин-та АН СССР. Т. 123. М.: Наука, 1969. 196 с.
3. Danforth B.N. The evolution of hymenopteran wings: the importance of size // J. Zool. 1989. Vol. 218. N 2. P. 247–276.
4. Dujardin J.P., Le Pont F., Baylac M. Geographical versus interspecific differentiation of sand flies: a landmark data analysis // Bull. Entomol. Res. 2003. Vol. 93. N 1. P. 87–90.
5. Gidaszewski N.A., Baylac M., Klingenberg C.P. Evolution of sexual dimorphism of wing shape in the *Drosophila melanogaster* subgroup // BMC Evol. Biol. 2009. Vol. 9. Art. 110.
6. Kulliker-Ott U.M., Blows M.W., Hoffmann A.A. Are wing size, wing shape and asymmetry related to field fitness of *Trichogramma* egg parasitoids? // Oikos. 2003. Vol. 100. N 3. P. 563–573.
7. Расницын А.П. Происхождение и эволюция перепончатокрылых насекомых // Тр. Палеонтол. ин-та АН СССР. Т. 174. М.: Наука, 1980. 192 с.
8. Pretorius E. Using geometric morphometrics to investigate wing dimorphism in males and females of Hymenoptera – a case study based on the genus *Tachysphex* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae: Larrinae) // Aust. J. Entomol. 2005. Vol. 44. N 2. P. 113–121.
9. Serrano-Meneses M.A., Cyrdoba-Aguilar A., Azpilicueta-Amorin M., González-Soriano E., Székely T. Sexual selection, sexual size dimorphism and Rensch's rule in Odonata // J. Evol. Biol. 2008. Vol. 21. N 5. P. 1259–1273.
10. Chursina M.A., Negrobov O.P. Phylogenetic Signal in the Wing Shape in the Subfamily Dolichopodinae (Diptera, Dolichopodidae) // Entomol. Rev. 2018. Vol. 98. N 5. P. 515–527.
11. Glantz S.A. Primer of Biostatistics. 4th Edition. N.Y.: McGraw-Hill, 1997. 473 pp.
12. Warton D.I., Duursma R.A., Falster D.S., Taskinen S. smatr 3 – an R package forestimation

Исследования проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

and inference about allometric lines // Methods Ecol. Evol. 2012. Vol. 3. N 2. P. 257–259.

13. Manual of Nearctic Diptera. Vol. 1. // Monograph. Research Branch, Agriculture Canada. N 27 / Eds. J.F. McAlpine, B.V. Peterson, G.E. Shewell, H.J. Teskey, J.R. Vockeroth, and D.M. Wood. Ottawa: Canada Communication Group Pub., 1981. 674 pp.

14. Manual of Nearctic Diptera. Vol. 2. // Monograph. Research Branch, Agriculture Canada. N 28 / Eds. J.F. McAlpine, B.V. Peterson, G.E. Shewell, H.J. Teskey, J.R. Vockeroth, and D.M. Wood. Ottawa: Canada Communication Group Pub., 1987. P. 675–1332.

15. Павлинов И.Я., Микешина Н.Г. Принципы и методы геометрической морфометрии // Ж. общ. биол. 2002. Т. 63. № 6. С. 473–493.

16. Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. Geometric morphometrics for biologists: A primer. N.Y.: Elsevier Academic Press, 2004. 443 pp.

17. tpsDig2. Morphometrics at SUNY Stony Brook [Электронный ресурс]. 2013. Дата обновления: 20.02.2018. URL: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> (дата обращения: 18.08.2018).

18. tpsUtil. Morphometrics at SUNY Stony Brook [Электронный ресурс]. 2015. Дата обновления: 20.02.2018. URL: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> (дата обращения: 18.08.2018).

19. Arnqvist G., Martensson T. Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape // Acta Zool. Acad. Sci. Hung. 1998. Vol. 44. N 1–2. P. 73–96.

20. Klingenberg C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics // Mol. Ecol. Resour. 2011. Vol. 11. N 2. P. 353–357.

21. Drake A.G., Klingenberg C.P. The pace of morphological change: historical transformation of skull shape in St. Bernard dogs // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2008. Vol. 275. N 1630. P. 71–76.

22. Walker J.A. Functional morphology and virtual models: physical constraints on the design of oscillating wings, fins, legs, and feet at intermediate Reynolds numbers // Integr. Comp. Biol. 2002. Vol. 42. N 2. P. 232–242.

23. Фарисенков С.Э., Беляев О.А., Чуканов В.С. Влияние размеров тела на летные характеристики стебельчатобрюхих перепончатокрылых (Hymenoptera, Aporcrista) // Межд. науч.-иссл. журн. 2015. № 10 (41). Ч. 3. С. 117–121.

24. Harbig R.R., Sheridan J., Thompson M.C. Reynolds number and aspect ratio effects on the leading-edge vortex for rotating insect wing planforms // J. Fluid Mech. 2013. Vol. 717. P. 166–192.

25. Belyaev O.A., Chukanov V.S., Farisenkov S.E. Comparative description of the wing apparatus and flight of some flies (Diptera, Brachycera) // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 3–4. P. 23–27.

26. Osborne F.M.F. Aerodynamics of flapping flight with application to insects // J. Exp. Biol. 1951. Vol. 28. P. 221–245.

27. Бродский А.К. Механика полета насекомых и эволюция их крылового аппарата. Л.: Изд-во ЛГУ, 1988. 208 с.

Поступила в редакцию
15.08.2018

Поступила после доработки
04.01.2019

Принята в печать
11.01.2019

RESEARCH ARTICLE

A STUDY ON ALLOMETRY OF WING SHAPE AND VENATION IN INSECTS. PART 2. DIPTERA

O.A. Belyaev*, S.E. Farisenkov

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

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

The research studied how body size affects wing shape and arrangement of veins in a wide range of families of dipteran insects (Diptera). Body mass and thorax length were used as criteria reflecting body size. Wing shape was characterized by aspect ratio and position of geometric center relative to its longitudinal axis. Allometry of venation was studied by geometric morphometric methods. It was found that character of dependence of wing shape on body size among Brachycera and Nematocera is different. Aspect ratio increases with body size in Nematocera, in Brachycera any correlation is absent. Shift of geometric center of a wing towards its base at the increase in body size is observed for Brachycera, for Nematocera no correlation is noted. It was shown that allometric component of the variation in arrangement of veins varies significantly between different families. With increase in body size, for most Brachycera-Cyclorrhapha studied (Calliphoridae, Muscidae, Sarcophagidae, Sepsidae, Tachinidae) the shift of r-m vein in basal direction and dm-cu vein in apical direction are noted. In Brachycera-Orthorrhapha suborder (Asilidae, Dolichopodidae, Empididae, Rhagionidae, Tabanidae), the point of intersection of veins R_{2+3} and C shifts towards the apex. For representatives of Nematocera (Chironomidae, Limoniidae, Tipulidae), shifts of the point of intersection of veins CuA_2 and C in basal direction and r-m vein in apical direction are characteristic. The obtained data confirms significant effect of body size on wing shape in Diptera. However, the character of allometry is not uniform in different suborders, apparently due to the fact that values of flight parameters (wing frequency, stroke amplitude), relative wing size (wing area to body size ratio) and wing venation vary greatly in dipterans. It can be concluded that body size is not the principal factor affecting wing shape within the order Diptera.

Keywords: *Diptera, body size, allometry, geometric morphometrics, wing shape, wing venation*

Сведения об авторах

Беляев Олег Александрович — мл. науч. сотр. кафедры энтомологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-16-95; e-mail: olegent@yandex.ru

Фарисенков Сергей Эдуардович — вед. инженер кафедры энтомологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-16-95; e-mail: littleblacktriangle@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 595.77; 591.499.6

**РАЗВИТИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНО ТОКСИЧНОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ
DOLICHOSPERMUM FLOS-AQUAE (*ANABAENA FLOS-AQUAE*) В
ВОДЕМАХ БОРЕАЛЬНОЙ ЗОНЫ****В.И. Капков¹, С.Г. Васильева^{2,*}, Е.С. Лобакова²**

¹Кафедра гидробиологии и ²кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*email: vankat2009@mail.ru

Целью настоящей работы стало исследование цикла развития цианобактерии *Dolichospermum flos-aquae*, вызывающей «цветение» воды в водоемах бореальной зоны. Массовое развитие *D. flos-aquae* в планктонной стадии обусловлено способностью реализовывать высокий биотический потенциал благодаря комбинации жизненно важных признаков, приобретенных в процессе эволюции, которые отсутствуют у партнеров по планктонному сообществу. К их числу относятся: адаптация к определенной температуре роста; низкая потребность в биогенных элементах; азотофиксация и внутриклеточная аккумуляция фосфатов; способность трихомов к миграции, позволяющей занимать оптимальный для фотосинтеза горизонт в эвфотической зоне. Установлено, что *D. flos-aquae* во время планктонной стадии развития представляет собой популяцию гетероцитных трихомов, включающую вегетативные клетки разной степени зрелости, гетероцисты и акинеты, соотношение которых изменяется в течение жизненного цикла микроорганизмов. Как полагают в ряде исследований, выделяемые в среду первичные и вторичные метаболиты регулируют как рост собственной популяции *D. flos-aquae*, включая разрушение клеток на конечной стадии «цветения» и формирование акинет, так и ингибирование развития партнеров по сообществу. При доминировании одного вида токсичные метаболиты, выделение которых возрастает в годы с антициклональным типом погоды, снижают видовое разнообразие в планктоне, упрощая структуру биотического сообщества.

Ключевые слова: цианобактерии, «цветение» воды, биотический потенциал, структура сообщества, первичные метаболиты, вторичные метаболиты, цианотоксины

Планктонные стадии развития цианобактерий (ЦБ) в водоемах привлекают внимание исследователей в связи с участвовавшими случаями отравления человека их токсичными метаболитами [1]. К числу видов, вызывающих токсичное «цветение» воды в водоемах бореальной зоны, относятся ЦБ рода *Dolichospermum* и, в первую очередь, *D. flos-aquae* (Lyngb.) Breb. ex Born. et Flah. Wackl. Hoffm. (Synonym (Syn): *Anabaena flos-aquae* Elenk.), *D. lemmermannii* (Richter) Wacklin et al. (Syn: *Aphanizomenon lemmermannii* Richter), *D.*

planctonicum (Brunnth.) Wacklin et al. (Syn: *A. scheremetievi* Elenk.).

ЦБ в природной среде являются центрами формирования устойчивых планктонных сообществ и характеризуются наличием у них сложноорганизованных поверхностных структур (слизистых капсул, чехлов, колониальной слизи). Наряду с этим ЦБ обладают способностью к экскреции значительных количеств органических соединений, способных поддерживать или угнетать рост и физиологическую активность компонентов сообщества. На от-

дельных стадиях жизненного цикла ЦБ существуют как свободные организмы, а на других стадиях — как кооперативные формы, в которых они являются частью сообщества, при этом кооперативные формы для ЦБ более типичны. Такие сообщества часто формируются на границе раздела фаз и оформлены морфологически в кластеры, хлопья, гранулы, агрегаты [2].

Регуляторной основой стабильности микробных сообществ является межклеточная коммуникация, осуществляемая посредством синтеза специфических метаболитов (сигналов), что позволяет клеткам контролировать собственную структуру, морфогенез, численность и адаптацию, а также распределение видов микроорганизмов сообщества между собой [2, 3]. Одноклеточные и трихомные ЦБ могут синтезировать низкомолекулярные физиологически активные вещества (криптофитины, микровиридин, эругинозин, анабенопептины, микрогинины и другие) [4], способные как ингибировать рост микроорганизмов, включая рост собственной популяции в конце стадии «цветения», так и стимулировать развитие планктонных водорослей, беспозвоночных и рыб.

Среди вторичных метаболитов, продуцируемых ЦБ, наиболее опасными для гидробионтов и человека являются алкалоиды — нейротоксины (анатоксин-а, анатоксин-а(с), гомоанатоксин-а), ингибиторы ацетилхолинэстеразы и сакситоксин — блокатор натриевых каналов клетки. Не меньшую опасность представляют циклические пептиды — гепатотоксины (микроцистины) — ингибиторы протектинофосфатаз, обладающие также канцерогенными свойствами [5, 6].

Факторы, обуславливающие последовательность сезонной сукцессии ЦБ в водоемах и активный синтез вторичных метаболитов клетками «цветущего» вида, остаются малоизученными в настоящее время. Исследование особенностей развития потенциально опасных ЦБ в природных экосистемах будет способствовать определению роли экологических факторов, влияющих на уровень «цветения» и, соответственно, на накопление в биомассе метаболитов с различной физиологической активностью. Знание соотношения вегетативных клеток, гетероцист и акинет в популяции во время «цветения», а также морфологических характеристик клеток поможет при разработке способов управления ростом популяций ЦБ как в условиях естественного местообитания, так и при использовании их в лабораторных экспериментах.

В этой связи предпринята попытка исследования зависимости цикла развития, а также

морфологической и физиологической структуры популяции одного из потенциально опасных возбудителей «цветения» воды в водоемах бореальной зоны, *D. flos-aquae*, от основных абиотических и биотических экологических факторов, определяющих массовое развитие этой ЦБ в планктонном сообществе.

Материалы и методы

Объекты исследования. Исследования проводили на Можайском водохранилище (55°02'18" С.Ш., 37°45'20" В.Д.) и озере Каньон Ферри Лэйк (Canyon Ferry Lake) (Монтана, США) (46°30'23" С.Ш., 111°36'24" З.Д.) в течение 2010–2014 гг.

Отбор проб и подсчет клеток ЦБ. Пробы планктона отбирали в полдень батометром Руттнера объемом 2 л с различных горизонтов и в разных точках водоема в течение вегетационного периода. Первую часть пробы фиксировали 5%-ным раствором Люголя с добавлением ледяной уксусной кислоты и 20%-ного раствора формалина и концентрировали методом обратной фильтрации. Вторую часть пробы последовательно фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 5 и 1,2 мкм (Advantec, Дания) для последующего измерения линейных параметров клеток. Количество ЦБ в пробах подсчитывали под микроскопом (Leika, Германия) в камере Нажотта объемом 0,05 см³ [7].

Оценка количества биомассы и хлорофилла а. Биомассу ЦБ находили расчетным методом, приравнивая форму клеток к объему соответствующей геометрической фигуры и считая, что 1000 мкм³ составляет 0,001 мг сырой массы. Биомассу мелких и колониальных форм ЦБ из-за сложности подсчета клеток рассчитывали по содержанию хлорофилла а в пробе, принимая, что его содержание в сухом веществе клеток составляет 2,5% [7]. Для определения концентрации хлорофилла а пробы объемом 20 мл фильтровали через мембранные фильтры GC-50 (Advantec, Дания), предварительно пропуская через них 5 мл 10%-ного раствора углекислого магния для предотвращения деградации хлорофилла. После разрушения клеток в стеклянном гомогенизаторе хлорофилл экстрагировали 90%-ным водным раствором ацетона при 4°C в темноте. Определение концентрации хлорофилла а в экстракте проводили спектрофотометрически в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре Beckman UV 5240 (Beckman Instruments Inc., США). Расчет концентрации хлорофилла а проводился по описанной ранее методике [7].

Характеристика водной среды. Температуру воды на разных глубинах водоема измеряли

электронным термометром. Прозрачность воды определяли по диску Секки [7].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ «Microsoft Excel» и «STATISTICA» 5.0. Для оценки параметрических различий полученных данных использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В начале биологического лета с прогревом поверхностного слоя воды до 16–18°C сразу же после весеннего пика развития диатомовых водорослей и вызванного этим существенного снижения запасов основных биогенных элементов в эвфотической зоне происходил рост численности и прирост биомассы ЦБ *D. flos-aquae*.

Высокая степень приспособленности к обитанию в среде с дефицитом биогенных элементов у данного вида связана со способностью к диазототрофии и резервированию в клетках как связанного азота, так и полифос-

муляцией ЦБ фосфатов в период их развития в придонных слоях водоема [10]. Известно, что большинство ЦБ достигают наибольшего видового обилия при соотношении в окружающей среде N:P>10 [11]. Мигрируя в толще воды за счет изменения плавучести, ЦБ способны выбирать горизонт с более высоким содержанием фосфатов.

Популяция *D. flos-aquae* во время планктонной стадии развития представляет собой систему гетероцитных трихомов, включающих вегетативные клетки разной степени зрелости, гетероцисты и акинеты. Размеры вегетативных клеток и акинет в период «вспышки» численности существенно различались (табл. 1). В период «цветения» воды в планктоне присутствовали трихомы ЦБ, содержавшие вегетативные клетки трех основных возрастных состояний: молодые — полушаровидные, образующиеся после цитотомии и расположенные в трихомах парами, зрелые — практически шаровидные и клетки в состоянии цитотомии с зачатками перегородок. При этом размеры указанных клеток в трихомах заметно различались (табл. 1).

В начале массового развития в пробах доминировали спиралевидные трихомы длиной 500–700 мкм преимущественно с полушаровидными молодыми клетками, клетками в состоянии цитотомии и интеркалярными одиночными гетероцистами. По мере развития в популяции преобладающими становились более короткие трихомы длиной от 50 до 120 мкм объемно-спиралевидной формы с терминальными и интеркалярными гетероцистами и акинетами. Так как гетероцисты являются терминальным типом дифференцировки клеток у ЦБ, то наблюдаемое укорочение трихомов, по-видимому, связано с их фрагментацией по месту локализации отмерших

Таблица 1

Линейные размеры клеток популяции *D. flos-aquae* в период «цветения» в водохранилище Каньон Ферри Лэйк (2010 г.) (n — число исследованных клеток)

Параметры клеток	Молодые клетки (n=511)	Зрелые клетки (n=497)	Гетероцисты (n=29)	Акинеты (n=184)
Длина, мкм	3,9±0,6	6,0±0,8	7,2±0,8	21,5±2,3
Ширина, мкм	4,3±0,4	6,4±0,5	7,4±0,7	10,7±1,4

фатов, а также способностью осуществлять гетеротрофный рост [8]. Известно, что прослеживается видовое предпочтение ЦБ к определенным формам азота, что обеспечивает им в значительной мере последовательное доминирование в планктоне. Так, во время массового развития *D. flos-aquae* потребляет нитратный азот, а *Aphanizomenon flos-aquae* способна использовать и аммонийную форму азота [9]. При этом указанным видам ЦБ требуется всего 0,01 мг Р/л в форме фосфата, что почти на порядок меньше, чем нужно присутствующим в сообществе диатомовым и другим микроводорослям. Низкая потребность в этом элементе обусловлена аккумуляцией

Таблица 2

Содержание вегетативных и специализированных клеток в трихомах *D. flos-aquae* во время «цветения» в водохранилище Каньон Ферри Лэйк (2010 г.) (количество исследованных при каждом отборе трихомов не менее 100)

Дата наблюдения	Количество клеток в % от общего числа				
	Молодые клетки	Зрелые клетки	Клетки в состоянии цитотомии	Гетероцисты	Акинеты
15.06	76,0	9,4	13,6	1,0	0
20.06	69,1	14,5	15,2	1,2	0
25.06	64,8	20,7	11,6	2,4	0,5
30.06	43,9	40,3	8,7	3,1	4,0
05.07	32,6	30,2	2,1	1,9	13,2
10.07	15,2	39,0	2,0	1,7	22,1
15.07	11,3	37,4	0,9	1,8	28,6

гетероцист. Кроме того, укорочение трихомов связано с формированием ЦБ небольших флоккул и крупных хлопьев за счет слипания и объединения трихомов в межклеточном полимерном матриксе.

Во время «цветения» в популяции *D. flos-aquae* заметно менялось соотношение молодых и зрелых вегетативных клеток, а также количество дифференцированных клеток — гетероцист и акинет. Гетероцисты в трихомах обычно шаровидные, светлоокрашенные, с выраженными оболочкой и порами и несколько крупнее вегетативных клеток, из которых они сформировались. Количество гетероцист в первой половине вегетационного сезона к концу июня увеличивалось в среднем до 3%, а затем в середине июля — падало. В середине вегетационного периода в конце июня в трихомах наблюдалось появление дуплетных гетероцист, по которым обычно и происходила фрагментация трихомов.

Бесцветные или, реже, желтоватые яйцевидные акинеты с выраженной оболочкой обычно появлялись в трихомах в начале июля и располагались в трихомах поодиночке. В середине июля, к концу фазы массового развития данного вида ЦБ, в популяции резко возросло число акинет (табл. 2), что может свидетельствовать об окончании планктонного этапа развития данного вида и начале перехода его в бентосную стадию. Основной функцией акинет является переживание неблагоприятных условий и сохранение жизнеспособности ЦБ во время донной стадии развития. Формирование акинет индуцируют как абиотические, так и биотические факторы. К их числу относятся дефицит в среде соединений фосфора, бора, низкие и высокие температуры, присутствие в среде токсических органических веществ, биогенного и абиогенного происхождения. Выделенные

из донных осадков акинеты *D. flos-aquae* и помещенные в воду с добавками солей азота и фосфора при температуре 18°C прорастали в течение 2–3 сут.

Следует отметить, что особенности строения трихомов и морфологическая структура популяции во время планктонной стадии развития не только обеспечивают резкий рост численности ЦБ в эвфотической зоне, но и способствуют увеличению резистентной устойчивости к воздействию факторов среды.

Анализ наблюдений «цветения» воды в во-

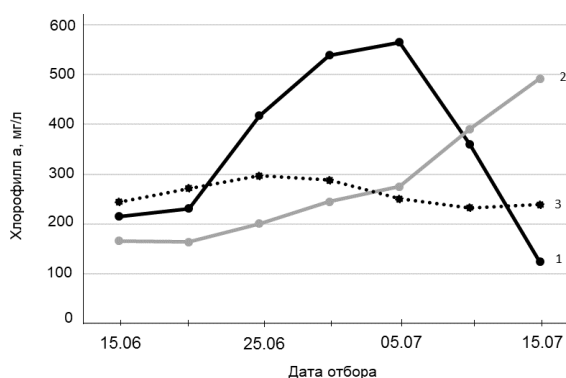


Рис. 2. Содержание хлорофилла а в воде в период «цветения» *D. flos-aquae* в полдень в водохранилище Каньон Ферри Лэйк (2010 г.) (кривые: 1 — пробы с поверхности воды; 2 — пробы с глубины 1 м; 3 — пробы с глубины диска Секки (2,5 м))

дохранилище Каньон Ферри Лэйк показал, что сроки массового развития ЦБ в значительной степени зависят от типа погоды. В годы с антициклональным типом погоды, когда на длительное время устанавливалась теплая сухая безветренная погода, «цветение» воды было наиболее ярко выражено. Закономерности развития популяции ЦБ *D. flos-aquae* были аналогичны ранее описанным для Можайского водохранилища.

Дальнейший рост температуры воды в поверхностном слое водохранилищ до 20–22°C приводил к прекращению роста *D. flos-aquae*, в воде наблюдалось образование хлопьев и флоккул из коротких трихомов ЦБ, диатомовых водорослей и бактерий. В трихомах ЦБ происходило резкое, подобное «цепной реакции», разрушение вегетативных клеток. Процесс распада клеток начинался с фрагментации длинных нитей трихомов по интеркалярным гетероцистам и акинетам. В образовавшихся фрагментах трихомов наблюдали массовый лизис вегетативных клеток и массовое развитие подвижных диатомовых водорослей рода *Navicula* и различных бактерий на их остатках. Таким образом, в популяции *D. flos-aquae* в конце июля преобладали в ос-

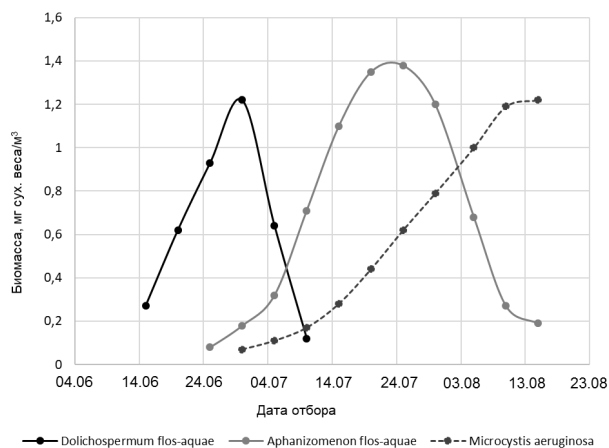


Рис. 1. Динамика изменений в содержании биомассы различных цианобактерий во время «цветения» воды в водохранилище Каньон Ферри Лэйк (2010 г.)

новном яйцевидные крупные акинеты с толстыми оболочками, интегрированные в полимерный матрикс, что также способствует переживанию ЦБ неблагоприятных условий. Вполне вероятно, что триггером «цепной реакции» разрушения зрелых вегетативных клеток наряду с ростом температуры воды в поверхностном слое выше оптимума развития *D. flos-aquae*, являются выделяемые в процессе разрушения клеток вторичные метаболиты, регулирующие численность клеток собственной популяции [12].

В дальнейшем в планктонном сообществе водоемов происходила смена доминирующего вида ЦБ в результате массового развития *A. flos-aquae*, которое усиливалось по мере прогрева воды до 22–24°C и продолжалось при чрезвычайно низких концентрациях нитратов в воде. Массовое развитие *A. flos-aquae* в водоемах обычно фиксировали в период деструкции популяции *D. flos-aquae*. При этом длинные собранные в пучки трихомы *A. flos-aquae* длиной около 500 мкм распределялись в толще воды равномерно, занимая практически всю эвфотическую зону. Затем наблюдалось их погружение и распределение популяции *A. flos-aquae* в толще эвфотической зоны на глубине от 0,5 до 1,0 м. Эта миграция в толщу воды в зоны с оптимальными условиями освещенности и температуры обычно происходила очень быстро, в течение суток, за счет изменения плавучести трихомов. С середины лета начиналось развитие одноклеточной ЦБ *Microcystis aeruginosa*, биомасса которой достигала максимальных значений в августе. Сезонная сукцессия в планктонном сообществе в общих чертах была характерна для лет с антициклональным и циклональным типами погоды (рис. 1).

Во время массового развития *D. flos-aquae* максимальная концентрация хлорофилла *a* обнаруживалась в пробах, отобранных на поверхности воды, что свидетельствует о распределении ЦБ в поверхностном слое водоема. По мере сукцессии и смены доминирующего вида наиболее высокое содержание хлорофилла *a* отмечалось на глубине 1 м, где была наибольшая плотность трихомов *A. flos-aquae*. Характерно, что концентрация хлорофилла на глубине диска Секки (глубина 2,5 м) оставалась практически постоянной в течение всего исследования (рис. 2).

Известно, что регуляция плавучести ЦБ связана с их метаболической активностью. В процессе фотосинтеза в клетках повышается тургор, который вызывает разрушение газовых вакуолей и поэтому ЦБ опускаются в нижние слои зоны фотосинтеза. Благодаря наличию газовых вакуолей и особенности функциони-

рования фотосинтетического аппарата ЦБ в период массового развития могут находиться в поверхностном слое водоема и при этом избегать эффекта фотоингибирования [4].

Необходимо подчеркнуть, что в период массового развития популяций *D. flos-aquae* и *A. flos-aquae* никогда не наблюдалось массового развития одноклеточной токсичной ЦБ *Microcystis aeruginosa*, хотя ее одиночные колонии встречались в планктонном сообществе. Массовое развитие *M. aeruginosa* начиналось лишь после окончания «цветения» *A. flos-aquae* и сопровождалось подавлением роста этой ЦБ. Наблюдаемое явление можно объяснить выделением обоими видами ЦБ метаболитов, подавляющих развитие друг друга.

Известно, что у ЦБ кроме обычного оксигенного фотосинтеза обнаружена способность к аноксигенному фотосинтезу с использованием сероводорода или серы в качестве экзогенного донора электронов. Развиваясь в большом количестве в эпилимнионе и гиполимнионе в микроаэрофильных условиях, они способны длительное время находиться в условиях слабого освещения или в темноте, осуществляя аноксигенный фотосинтез или гетеротрофный рост и утилизируя запасенные на свету органические вещества [10].

Среди экологических факторов, определяющих частоту и интенсивность «цветения» водоемов, важнейшими являются содержание биогенных элементов в эвфотической зоне водоема, солнечная активность и температура воды. На фоне падения концентрации азота и фосфора в среде преимущество в росте получают популяции миксотрофных и diaзотрофных ЦБ с высокой скоростью размножения (до 4 делений в сутки). Массовое развитие ЦБ в эвфотической зоне связано с различными потребностями планктонных стадий в разных формах азота и фосфора, а также способностью к diaзотрофии и использованию резервированного в клетках фосфора [11]. Интенсивному «цветению» воды способствует также антропогенное увеличение концентрации биогенных элементов, поступающих со стоками с прибрежных территорий.

Солнечная активность и магнитное поле Земли являются важными экологическими факторами, прямо или опосредованно влияющими на динамику численности ЦБ. Колебания солнечной активности могут вызывать изменения климатических и гидрологических условий, во многом определяющих мощность «цветения» воды. Известно, что при высоком уровне солнечной активности рост биомассы ЦБ сопровождается увеличением биосинтеза токсичных метаболитов [10, 13].

Одной из особенностей функционирования водных экосистем является обмен информацией между организмами в сообществе с помощью метаболитов [2]. Выделяемые в воду ЦБ экзометаболиты выполняют разные эколого-физиологические функции: регулируют деление клеток и рост собственной популяции, а также цитодифференцировку, ингибируют и/или стимулируют развитие партнеров по планктонному сообществу. Поскольку процесс синтеза и последующее выделение метаболитов (аутоиндукторов) скоординированы во времени, популяции ЦБ и других гидробионтов приспособились к совместному существованию в планктонном сообществе. В результате «вспышки» численности и роста биомассы доминирующего вида происходит нарушение координации связей между популяциями, сопровождающее изменение структуры сообщества. Упрощению структуры сообщества способствует частичная элиминация других видов ЦБ, чувствительных к метаболитам (токсинам) доминанта. Увеличение концентрации вторичных метаболитов в среде часто сопровождается ингибированием роста собственной популяции. В итоге популяция планктеров, первоначально являющаяся сообществом с центральным видом – эдификатором, представляет собой асинхронную гетерогенную сукцессию, которая за вегетационный период претерпевает несколько последовательных кардинальных перестроек [14].

Вторичные метаболиты, выделяемые при разрушении клеток ЦБ в конце фазы «цветения», могут трансформироваться в более токсичные соединения, чем исходные формы, или деградировать при участии различных бактерий. В том и другом случаях они способны длительное время сохранять физиологическую активность в окружающей среде. Первый этап массового разрушения вегетативных клеток *D. flos-aquae* в планктонном сообществе наблюдается во второй половине июля, поэтому наиболее опасным периодом для гидробионтов и потребителей воды оказывается вторая половина лета и начало осени [1].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paerl H., Huisman J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms // Environ. Microbiol. Rep. 2009. Vol. 1. N 1. P. 27–37.
2. Nozhevnikova A.N., Botchkova E.A., Plakunov V.K. Multi-species biofilms in ecology, medicine and biotechnology // Microbiology. 2015. Vol. 84. N 6. P. 731–750.

Планктонные ЦБ демонстрируют широкую экофизиологическую адаптацию к изменяющимся условиям среды и способность давать «вспышку» численности практически во всех водных экосистемах бореальной и тропической зонах. В водных экосистемах ЦБ образуют постоянные ассоциации с бактериями и беспозвоночными животными. При этом максимальный рост ЦБ, вызывающих «цветение» воды, происходит лишь в ассоциациях с различными бактериями [4, 15]. Резкой «вспышке» численности в значительной степени способствует выделение ЦБ первичных и вторичных метаболитов, регулирующих рост собственной популяции и ограничивающих развитие партнеров по сообществу, включая немногочисленных представителей зоопланктона (жгутиковых и коловраток), потребляющих клетки ЦБ в качестве основного источника пищи в период «цветения» воды.

Следует отметить, что резкое увеличение численности одного вида ЦБ нарушает структурное и функциональное равновесие в планктоне, основанное на органической интеграции популяций, ведущее место в котором принадлежит комплементарным отношениям видов в сообществе. При достижении максимальной численности ЦБ включаются регуляторные системы, аналогичные коммуникативным взаимодействиям бактерий в биопленках, в результате которых сообщество начинает функционировать как единый механизм, обмениваясь информацией между клетками с помощью метаболитов [16]. Выделяемые ЦБ метаболиты регулируют физиологические процессы в популяциях, а также выполняют ингибиторные функции, обеспечивая оптимальный рост отдельных популяций и сукцессию в биотическом сообществе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00112).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

3. Branda S., Vik S., Friedman L., Kolter R. Biofilms: the matrix revisited // Trends Microbiol. 2005. Vol. 13. N 1. P. 20–26.
4. Paerl H.W., Fulton R., Moisaner P., Dyble J. Harmful freshwater algal blooms with an emphasis on cyanobacteria // Sci. World J. 2001. Vol. 1. P. 76–113.
5. Wiegand C., Pflugmacher S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial

secondary metabolites a short review // *Toxicol. Applied Pharmacol.* 2005. Vol. 203. N 3. P. 201–218.

6. *Ibelings B.W., Backer L.C., Kardinaal W.E., Chorus I.* Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe // *Harmful Algae*. 2015. Vol. 40. P. 63–74.

7. *Фёдоров В.Д., Канков В.И.* Руководство по гидробиологическому контролю качества природных вод. Москва: Изд-во Моск. ун-та, 2000. 120 с.

8. *Tilman D., Kiesling D., Sterner R., Keham S., Johnson F.* Green, blue-green and diatom algae: taxonomic difference in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen // *Arch. Hydrobiol.* 1986. Vol. 106. N 4. P. 473–485.

9. *Paerl H.W.* Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along freshwater-marine continuum // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. Vol. 619. P. 216–241.

10. *Paerl H.W.* Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae // *The ecology of freshwater phytoplankton* / Ed. C.S. Reynolds. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1986. P. 261–313.

11. *Tilman D.* Plant strategies and the dynamics and structure of plant communities. New Jersey: Princeton Univ. Press, 1988. 360 pp.

12. *Havens K.E.* Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems // *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Vol. 619. Advances in experimental medicine and biology / Ed. H.K. Hudnell. N.Y.: Springer-Verlag, 2008. P. 733–747.

13. *Канков В.И., Лухачёва Н.Е., Фёдоров В.Д.* Функциональные стратегии сине-зеленых водорослей и «цветение» воды // *Бюлл. МОИП. Сер. биол.* 2009. Т. 114. № 3. С. 411–417.

14. *Margalef R.* Some concepts relative to the organization of plankton // *Oceanogr. Marine Biol. Ann. Rev.* 1967. Vol. 5. P. 257–289.

15. *Stomp M., Huisman J., Voros L., Pick F., Laamanen M., Haverkamp T., Stal J.* Colorful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas bacteria // *Ecol. Lett.* 2007. Vol. 10. N 4. P. 290–298.

16. *Waters C.M., Bassler B.L.* Quorum sensing cell to cell communication in bacteria // *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005. Vol. 21. P. 319–346.

Поступила в редакцию

26.09.2018

Поступила после доработки

09.01.2019

Принята в печать

12.01.2019

RESEARCH ARTICLE

GROWTH OF TOXIC CYANOBACTERIA *DOLICHOSPERMUM FLOS-AQUAE* (*ANABAENA FLOS-AQUAE*) IN THE WATERS OF BOREAL ZONE

V.I. Kapkov¹, S.G. Vasilieva^{2,*}, E.S. Lobakova²

¹Department of Hydrobiology and ²Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*email: vankat2009@mail.ru

The aim of this work was to study the life cycle of cyanobacteria *Dolichospermum flos-aquae*, causing the «blooming» of waters of the boreal zone. The mass propagation of the *D. flos-aquae* in the plankton stage occurs due to their ability to realize high biotic potential, defined by the combination of features developed during evolution, which the other partners of the plankton community lack. These include: adaptation to a certain growth temperature; low demand for nutrients; nitrogen fixation and intracellular accumulation of phosphates; the ability of trichomes to migrate, allowing to occupy the optimal parts of euphotic zones for photosynthesis. It is established that during the planktonic stage the trichomes of *D. flos-aquae* consists of heterocysts and vegetative cells of different maturity, generosity and activity, the ratio of which changes throughout the life cycle of microorganisms. It is believed that the primary and secondary metabolites released by *D. flos-aquae* into the medium take part in the regulation of own population growth including the cell

destruction at the final stage of «blooming», akinetes formation and the simultaneous suppression of propagation of community partners. With the dominance of one species, the released toxic metabolites increase in years with anticyclone type of weather, resulted in the reducing of species diversity and the simplifying of the biotic community structure.

Keywords: *cyanobacteria, algal blooms, biotic potency, structure of community, primary metabolites, secondary metabolites, cyanotoxins*

Сведения об авторах

Капков Валентин Иванович — докт. биол. наук, проф. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-48; e-mail: chelena45@mail.ru

Васильева Светлана Геннадьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: vankat2009@mail.ru

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.322

СОСТАВЛЕНИЕ И АНАЛИЗ МАТРИЦ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН ДЛЯ ОПТИМАЛЬНОГО ВЫРАВНИВАНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МИКРОБНЫХ РОДОПСИНОВ

В.Н. Новоселецкий*, Г.А. Армеев, К.В. Шайтан

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

Парное выравнивание аминокислотных последовательностей является основным инструментом биоинформатики, используемым как самостоятельно, так и в большом числе более сложных методов. Эффективность этого инструмента критически зависит от используемой оценочной функции, которая состоит из матрицы замен и штрафов за вставку. В настоящей работе выполнены построение и анализ матриц аминокислотных замен для надсемейства микробных родопсинов (RHOD), а также проведено их сопоставление с рядом матриц замен общего назначения (BLOSUM, VTML, PFASUM). Показано, что все матрицы позволяют строить выравнивания последовательностей микробных родопсинов практически одинакового качества, но лишь матрицы семейств BLOSUM и VTML, а также их линейные комбинации с матрицами семейства RHOD позволяют обнаруживать гомологию между микробными родопсинами и гелиородопсином.

Ключевые слова: микробные родопсины, гелиородопсин, матрица замен, энтропия, выравнивание последовательностей, поиск гомологов

Микробные родопсины — это обширное надсемейство фотохимически активных белков прокариот и низших эукариот, распространенных по всему земному шару. Со структурной точки зрения они представляют собой трансмембранный пучок из 7 α -спиралей, образующих карман для ретиналя, который ковалентно связывается с остатком лизина в VII спирали. Поглощение кванта света приводит к изомеризации ретиналя, что, в свою очередь, запускает свойственные каждому семейству родопсинов процессы. Что касается биологической функции, то микробные родопсины являются либо приемниками энергии света, которые затем превращают ее в электрохимические потенциал клеточной мембраны (светоуправляемые ионные насосы), либо датчиками, которые используют информацию об окружении для регуляции клеточных процессов [1]. Несмотря на длительную историю изучения и широчайшие исследования микробных родопсинов, они по-прежнему дают почву для новых открытий, ярчайшим примером которых стало недавнее открытие гелиородопсина [2]. Этот ретиналь-содержащий семиспиральный трансмембранный белок имеет чрезвычайно низкое сходство последовательности с последовательностями других микроб-

ных родопсинов, а его принципиальной особенностью является инвертированная ориентация относительно мембраны: N-конец располагается внутри клетки, а С-конец — снаружи. В настоящий момент нет полного понимания филогенетических отношений между обширным семейством гелиородопсин-подобных белков и ранее известными микробными родопсинами, но можно ожидать, что семиспиральные трансмембранные белки таят в себе еще немало удивительного.

Математически строгим и вычислительно эффективным методом нахождения оптимальных глобального и локального выравниваний пары последовательностей является динамическое программирование [3, 4], причем результат работы этого алгоритма критически зависит от используемой оценочной функции, которая обычно состоит из матрицы замен аминокислот и штрафов за вставки. Несмотря на появление новых методов выравнивания [5], основанных на статистических подходах, динамическое программирование по-прежнему широко используется, например, для моделирования по гомологии [6] или построения множественных выравниваний такими программами, как CLUSTALW [7] и др. Выбор матрицы замен является наиболее важ-

ным решением перед построением выравнивания. Большинство таких матриц построены путем расчета сходства между аминокислотами как частоты их встречаемости в соответствующих позициях различных последовательностей. Если оказывается, что аминокислоты А и В часто встречаются в эквивалентных позициях, то они обладают сходными свойствами и могут быть заменены друг на друга в процессе эволюции белков. Различие между матрицами обуславливается, главным образом, тем, какая группа белковых последовательностей использована для получения этих матриц и каким образом были определены эквивалентные позиции [8]. Так, широко используемые матрицы замен BLOSUM [9] были получены путем оценки встречаемости аминокислотных замен в выравниваниях эволюционно родственных белков.

Практически все существующие матрицы замен являются матрицами общего назначения, поскольку были получены усреднением частот встречаемости в различных белковых семействах и отражают типичные черты всех белков. Матрицы такого рода востребованы для поиска схожих последовательностей в обширных базах данных, где последовательность запроса сравнивается с миллионами разнообразных последовательностей. Но часто приходится выполнять глобальное выравнивание последовательностей из одного заранее известного семейства и в этом случае даже лучшие матрицы общего назначения могут оказаться не самыми подходящими, поскольку совершенно не учитывают особенностей конкретного семейства [8].

В данной работе получено семейство матриц замен RHOD, специфичных для микробных родопсинов, и проведено исследование их точности и селективности. Показано, что полученные матрицы по качеству выравнивания последовательностей микробных родопсинов соответствуют широко используемым матрицам семейств BLOSUM [9] и VTML [10], лишь немного превосходя их. В то же время при выявлении сходства микробных родопсинов и гелиородопсина при поиске в базах данных SwissProt [11] и PDB [12] матрицы RHOD оказались недостаточно эффективными по сравнению с матрицами BLOSUM и VTML. Тем не менее, матрицы, полученные линейной комбинацией матриц RHOD и VTML, продемонстрировали высокую эффективность в обоих тестах.

Материалы и методы

Расчет матриц замен выполняли на основе множественного выравнивания последовательностей ряда микробных родопсинов и их го-

мологов из баз данных SwissProt и TrEMBL [11] по стандартному алгоритму [9]. Поиск гомологов выполняли с помощью программы FASTA [14]. Для построения множественного выравнивания использовали веб-сервисы Clustal Omega [15] и Muscle [16]. Матрицы BLOSUM были взяты на ресурсе NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/matrices>). Структурное выравнивание выполняли в программе Maestro (Schrodinger, LLC, США). Для расчета парных выравниваний с различными матрицами замен использовали программу AlignMe [17].

Результаты и обсуждение

Для построения аккуратного множественного выравнивания последовательностей различных семейств микробных родопсинов желательно использовать большое число их гомологов, поскольку сходство между последовательностями весьма невелико. Так, например, при структурном выравнивании галородопсина *Halobacterium salinarum* (pdb-код 1e12) [18] и галородопсина из *Natromonas pharaonis* (pdb-код 3a7k) [19] идентичность составляет 54%, в то время как при его выравнивании с сенсорным родопсином из *Natromonas pharaonis* (pdb-код 3qap) [20] идентичность составляет 23%, а с натриевым светочувствительным насосом из *Dokdonia eikasta* (pdb-код 3x3b) [21] — всего 11%. Однако для структурного выравнивания в базе данных PDB доступны всего лишь около 20 уникальных структур микробных родопсинов, включая четыре указанных. База данных белковых последовательностей SwissProt также содержит небольшое количество уникальных последовательностей микробных родопсинов, поэтому основная часть последовательностей для построения выравниваний была взята из базы данных TrEMBL. После исключения последовательностей с идентичностью более 99% итоговый набор стал содержать 260 последовательностей (235 из TrEMBL и 25 из SwissProt).

Множественное выравнивание последовательностей выполняли с помощью ряда соответствующих программ, включая Clustal Omega [15] и Muscle [16], но на эффективности итоговых матриц замен это практически не отразилось, поэтому далее приведены лишь результаты, полученные на основе выравниваний с помощью программы Clustal Omega. Парная идентичность последовательностей составила от 11% до 98%, средняя идентичность — $30 \pm 14\%$. Для расчета матриц замен была использована только часть выравнивания, относящаяся к трансмембранному домену рассматриваемых белков (позиции с 130 по 470). Большой (до 350 остатков) цитоплазма-

тический домен ряда последовательностей (каналородопсины) не учитывался.

Альтернативный вариант множественного выравнивания последовательностей был получен после попарного структурного выравнивания невырожденного набора из 22 структур микробных родопсинов, имеющихся в базе данных PDB, и их последующего объединения. Парная идентичность последовательностей составила от 11% до 64%, средняя идентичность – $25 \pm 11\%$. Однако полученная на основе такого выравнивания матрица замен по своим свойствам оказалась близка к матрице RHOD0020 (см. ниже) и далее отдельно не обсуждается.

Создание матриц замен

Создание семейства матриц замен RHOD, специфичных для семейства микробных родопсинов, и расчет их относительной энтропии были выполнены по стандартному алгоритму, использованному ранее при создании семейства матриц BLOSUM [9] (табл. 1). Ну-

также опирается на идентичность последовательностей и содержит два числа, первое из которых означает минимальную, а второе – максимальную идентичность последовательностей в использованном выравнивании. Так, название RHOD0020 указывает на то, что при расчете этой матрицы было использовано выравнивание последовательностей, идентичность которых лежит в пределах от 0 до 20%. Напротив, числа в названиях матриц семейства VTML обозначают степень эволюционного расхождения последовательностей, использованных для построения соответствующих матриц [10]. Свойства матриц указанных семейств приведены в табл. 1 (данные по матрицам VTML взяты из файла upam.h пакета fasta [14]). Матрицы расположены по возрастанию относительной энтропии и средней идентичности последовательностей. Интересно отметить большую относительную энтропию матриц семейства RHOD по сравнению с матрицами семейства VTML, построенными по выравниваниям сравнимой идентичности,

Таблица 1

Относительная энтропия (H) и средняя идентичность последовательностей в исходных выравниваниях (I) ряда матриц замен

Матрица	H	I, %	Матрица	H	I, %	Матрица	H	Матрица	H
						BLOSUM35	0,21	PFASUM31	0,23
RHOD0020	0,53	17				BLOSUM40	0,29	PFASUM43	0,34
RHOD0030	0,59	22	VTML200	0,41	23			PFASUM51	0,41
						BLOSUM50	0,48	PFASUM60	0,49
RHOD0040	0,65	25	VTML160	0,56	25			PFASUM67	0,56
RHOD0050	0,68	26				BLOSUM62	0,70	PFASUM78	0,69
RHOD0100	0,79	30				BLOSUM70	0,84		
RHOD20100	0,95	33	VTML120	0,94	37	BLOSUM80	0,99		
RHOD30100	1,51	44	VTML80	1,39	50	BLOSUM100	1,45		
RHOD40100	2,72	60							
RHOD50100	3,18	65	VTML40	2,27	69				
RHOD60100	3,99	74							
RHOD70100	4,80	81	VTML20	2,92	83				
RHOD80100	5,76	89	VTML10	3,46	91				
RHOD90100	6,56	94							

мерация матриц этого семейства означает идентичность последовательностей в выравнивании, использованном для построения матриц. Аналогичная нумерация используется и в семействе PFASUM [13], которое было построено с использованием структурных выравниваний, представленных в базе данных PFAM [22]. По аналогии с этими семействами матриц, нумерация полученных нами матриц

однако выяснение причин этого требует глубокого анализа аминокислотного состава соответствующих последовательностей и выходит за пределы данной публикации.

Тестирование матриц замен

При расчете оценки конкретного парного выравнивания помимо матрицы замены важную роль играют штрафы за открытие вставки

и за ее удлинение. Подбор оптимальных значений штрафов является необходимым шагом для дальнейшего использования матрицы замен. Для каждой матрицы поиск оптимальных значений штрафов выполняли в диапазоне от 1 до 20 для штрафа за открытие вставки и от 1 до 5 для штрафа за удлинение. Критерием оптимальности параметров стало качество выравнивания $Q(i, j)$ [8] для последовательностей i и j :

$$Q(i, j) = \frac{1}{2} \left(\frac{n_I(i, j)}{L_R(i, j)} + \frac{n_I(i, j)}{L_T(i, j)} \right)$$

где $n_I(i, j)$ — число одинаково выровненных пар остатков в референсном и тестовом выравниваниях, $L_R(i, j)$ — длина референсного выравнивания, $L_T(i, j)$ — длина тестового выравнивания.

Тестирование матриц замен выполняли на последовательностях микробных родопсинов, структура которых была определена экспериментально, и соответствующие данные размещены в базе данных PDB. В качестве референсных выступали выравнивания последовательностей, полученные на основе парных структурных выравниваний соответствующих родопсинов (231 выравнивание), а тестовые выравнивания были построены для этих же последовательностей, но с использованием тестируемых матриц замен и штрафов за вставки. Оптимальные значения штрафов и среднее значение качества выравниваний с использованием различных матриц приведены в табл. 2. Видно, что все исследуемые матрицы замен демонстрируют близкие средние значения качества выравнивания. Это не позволяет рекомендовать какую-либо из них в качестве лучшей для выполнения выравнивания последовательностей микробных родопсинов.

Еще одним применением парного сравнения последовательностей и, соответственно, матриц замен является поиск схожих последовательностей в базах данных. В этой связи особенный интерес представляет возможность нахождения таких последовательностей, которые не использовались в параметризации матриц, но имеют определенное сходство с последовательностями из обучающего набора. В нашем случае такой последовательностью стала последовательность недавно открытого гелиородопсина [2], практически не имеющая идентичных остатков с остальными микробными родопсинами. С другой стороны, при наличии в базах данных последовательностей, гарантированно гомологичных последовательности запроса, итоговый список схожих последовательностей должен содержать все гомологичные последовательности и никаких

других. Для проверки такой селективности матриц замен была использована последовательность дельта-родопсина, структура которого известна (pdb-код 4fbz) [23]. Результаты проверок также приведены в табл. 2 и представляют особенный интерес. При использовании последовательности дельта-родопсина в качестве последовательности запроса в базах данных SwissProt и PDB все матрицы продемонстрировали практически одинаковую способность выявить все или почти все гомологичные последовательности в обоих ресурсах. Большее число последовательностей в базе данных PDB обусловлено тем, что некоторые белки имеют по несколько структур, размещенных в ней. Отметим, что в случае дельта-родопсина схожая результативность поиска наблюдалась в широком диапазоне штрафов. Напротив, результаты поиска гомологов гелиородопсина сильно зависели от использованных штрафов и в целом совершенно иные: в то время как матрицы семейств BLOSUM, VTML и отчасти PFASUM оказались способны выявить сходство последовательностей гелиородопсина и микробных родопсинов, матрицы семейства RHOD оказались к нему нечувствительны.

Для создания матриц замен, имеющих как высокое качество выравнивания, так и достаточную селективность, были построены матрицы Mix, являющиеся линейными комбинациями матриц RHOD0030 и VTML200:

где X и Y — весовые коэффициенты, при-

$$\text{Mix_X-Y}[a, b] = X \cdot \text{RHOD0030}[a, b] + Y \cdot \text{VTML200}[a, b],$$

чем $X + Y = 100\%$, а a и b — матричные индексы.

Выбор матриц RHOD0030 и VTML200 обусловлен низкой относительной энтропией обеих при общей схожести их свойств (табл. 1). Были рассмотрены следующие комбинации X и Y : 10% и 90%, 20% и 80%, 30% и 70%. Оказалось, что все три смешанные матрицы унаследовали лучшие черты исходных матриц, сочетая в себе способность давать высокое качество парных выравниваний и высокую селективность при поиске в базах данных (табл. 2).

Проведенное в данной работе исследование показывает, что матрицы аминокислотных замен RHOD, построенные на основе множественного выравнивания последовательностей микробных родопсинов, сравнимы по эффективности с матрицами замен общего назначения семейств BLOSUM, VTML и PFASUM при выравнивании последовательностей микробных родопсинов, но недостаточно селективны для выявления сходства по-

Таблица 2

Оптимальные штрафы (ОШ), среднее качество <Q> парных выравниваний микробных родопсинов и результативность матриц в поиске дельта- и гелиородопсина в базах данных SwissProt и PDB. В дробной записи: слева — число истинных гомологов среди результатов поиска, справа — общее число результатов поиска

Матрица	Парные выравнивания		Поиск гомологов дельтародопсина				Поиск гомологов гелиородопсина			
	ОШ	<Q>	ОШ	в SP	ОШ	в PDB	ОШ	в SP	ОШ	в PDB
BLOSUM35	16,2	0,70	1,2	44/45	6,1	317/323	20,1	3/13	2, 2	39/39
BLOSUM40	20,2	0,70	1,3	44/45	6,1	317/332	19,3	5/11	19, 1	6/7
BLOSUM80	20,5	0,69	1,3	44/46	4,2	317/323	13,1	9/28	2, 2	39/39
BLOSUM100	20,7	0,67	6,1	44/45	2,3	317/329	9,2	3/13	2, 3	39/45
VTML200	14,3	0,67	1,3	44/45	1,3	317/323	13,3	6/15	8, 3	6/7
VTML120	15,2	0,70	1,2	44/46	1,2	317/323	10,1	8/21	4, 3	6/6
VTML80	18,5	0,70	1,2	44/46	2,2	317/342	1,3	5/20	4,2	6/7
PFASUM31	14,2	0,69	1,3	44/45	3,3	317/323	—	0	9,2	27/29
PFASUM43	14,1	0,70	1,3	44/45	2,3	317/323	13,1	5/24	12,2	6/6
RHOD0020	12,1	0,70	6,3	44/48	3,3	317/324	—	0	—	0
RHOD0030	15,1	0,72	6,3	44/47	7,3	317/324	—	0	—	0
RHOD20100	15,1	0,70	12,3	44/46	2,3	317/323	—	0	—	0
RHOD30100	15,3	0,70	3,3	44/45	1,3	317/332	—	0	—	0
Mix_10-90	17,3	0,70	5,1	44/45	5,1	317/323	14,2	6/13	12,2	6/6
Mix_20-80	18,3	0,71	4,1	44/46	5,1	317/323	12,1	9/25	12,1	6/6
Mix_30-70	18,3	0,72	4,1	44/45	4,1	317/323	13,1	8/23	13,1	6/9

следовательностей микробных родопсинов с последовательностью гелиородопсина. В то же время, создание смешанных матриц замен позволяет устранить этот недостаток при сохранении высокого качества парных выравниваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-00-00166 КОМФИ — создание матриц замен и №18-02-40010 мега

— тестирование матриц замен). Вычисления выполнены с использованием суперкомпьютера «Ломоносов» [24].

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Li H., Spudich J.L. Microbial rhodopsins: diversity, mechanisms, and optogenetic applications // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. Vol. 86. N 1. P. 845–872.
2. Pushkarev A., Inoue K., Larom S. et al. A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics // *Nature*. 2018. Vol. 558. N 7711. P. 595–599.
3. Needleman S.B., Wunsch C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins // *J. Mol. Biol.* 1970. Vol. 48. N 3. P. 443–453.
4. Smith T.F., Waterman M.S. Identification of common molecular subsequences // *J. Mol. Biol.* 1981. Vol. 147. N 1. P. 195–197.
5. Luytynoja A. Alignment methods: strategies, challenges, benchmarking, and comparative overview // *Evolutionary genomics. Methods in molecular biology (methods and protocols)*. Vol 855 / Ed. M. Anisimova. New Jersey: Humana Press, 2012. P. 203–235.

6. Khan F.I., Wei D.Q., Gu K.R., Hassan M.I., Tabrez S. Current updates on computer aided protein modeling and designing // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. Vol. 85. P. 48–62.
7. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* 1994. Vol. 22. N 22. P. 4673–4680.
8. Kuznetsov I.B. Protein sequence alignment with family-specific amino acid similarity matrices // *BMC Res. Notes.* 2011. Vol. 4:296.
9. Henikoff S., Henikoff J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. N 22. P. 10915–10919.
10. Müller T., Spang R., Vingron M. Estimating amino acid substitution models: A comparison of Dayhoff's estimator, the resolvent approach and a maximum likelihood method // *Mol. Biol. Evol.* 2002. Vol. 19. N 1. P. 8–13.
11. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. N 5. P. 2699–2699.
12. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28. N 1. P. 235–242.
13. Keul F., Hess M., Goesele M., Hamacher K. PFASUM: A substitution matrix from Pfam structural alignments // *BMC Bioinformatics.* 2017. Vol. 18:293.
14. Pearson W.R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA // *Methods Enzymol.* 1990. Vol. 183. P. 63–98.
15. Sievers F., Higgins D.G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences // *Protein Sci.* 2018. Vol. 27. N 1. P. 135–145.
16. Edgar R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32. N 5. P. 1792–1797.
17. Stamm M., Staritzbichler R., Khafizov K., Forrest L.R. AlignMe—a membrane protein sequence alignment web server // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N W1. P. W246–W251.
18. Kolbe M., Besir H., Essen L.O., Oesterhelt D. Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å Resolution // *Science.* 2000. Vol. 288. N 5470. P. 1390–1396.
19. Kouyama T., Kanada S., Takeguchi Y., Narusawa A., Murakami M., Ihara K. Crystal structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis* // *J. Mol. Biol.* 2010. Vol. 396. N 3. P. 564–579.
20. Gushchin I., Reshetnyak A., Borshchevskiy V., Ishchenko A., Round E., Grudinin S., Engelhard M., Bldt G., Gordeliy V. Active state of sensory rhodopsin II: Structural determinants for signal transfer and proton pumping // *J. Mol. Biol.* 2011. Vol. 412. N 4. P. 591–600.
21. Kato H.E., Inoue K., Abe-Yoshizumi R. et al. Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump // *Nature.* 2015. Vol. 521. N 7550. P. 48–53.
22. Finn R.D., Bateman A., Clements J., Coggill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E.L.L., Tate J., Punta M. Pfam: The protein families database // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N D1. P. D222–D230.
23. Zhang J., Mizuno K., Murata Y., Koide H., Murakami M., Ihara K., Kouyama T. Crystal structure of deltarhodopsin-3 from *Haloterrigena thermotolerans* // *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 2013. Vol. 81. N 9. P. 1585–1592.
24. Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V., Opanasenko V.I. “Lomonosov”: Supercomputing at Moscow State University // *Contemporary High Performance Computing: From Petascale toward Exascale.* Boca Raton: CRC Press, 2013. P. 283–307.

Поступила в редакцию

03.09.2018

Поступила после доработки

28.12.2018

Принята в печать

11.01.2019

RESEARCH ARTICLE

CONSTRUCTION AND EVALUATION OF AMINO ACID
SUBSTITUTION MATRICES FOR OPTIMAL ALIGNMENT OF
SEQUENCES OF MICROBIAL RHODOPSINS

V.N. Novoseletsky*, G.A. Armeev, K.V. Shaitan

*Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State
University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia***e-mail: valery.novoseletsky@yandex.ru*

Pairwise alignment of amino acid sequences is the basic tool of bioinformatics and it is widely used itself and in numerous approaches. Performance of this tool is critically depends on scoring function, which consisted of substitution matrix and gap penalties. In this work we constructed and evaluated a set of family-specific substitution matrices for microbial rhodopsins (RHOD) and compared them with general-purpose matrices (BLOSUM, VTML, PFASUM). We showed that all matrices demonstrated similar quality of pairwise alignment of microbial rhodopsins and only BLOSUM and VTML matrices, and linear combinations of them with RHOD matrices, are able to detect distant homology between microbial rhodopsins and heliorhodopsin.

Keywords: *microbial rhodopsins, heliorhodopsin, substitution matrix, entropy, sequence alignment, homology search*

Сведения об авторах

Новоселецкий Валерий Николаевич — канд. физ-мат. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ.

Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: valery.novoseletsky@yandex.ru

Армеев Григорий Алексеевич — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: satary@yandex.ru

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ-мат. наук, проф., зам. зав. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ.

Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shaytan49@yandex.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.112.1

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ДИАДЕНОЗИНТЕТРАФОСФАТ ПОДАВЛЯЕТ ЭКТОПИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ В МИОКАРДИАЛЬНОЙ ТКАНИ ЛЕГОЧНЫХ ВЕН У ВЗРОСЛЫХ, НО НЕ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС**В.М. Потехина¹, В.С. Кузьмин^{1,2,*}, Д.В. Абрамочкин^{1,2}**

¹*Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12;*

²*кафедра физиологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1
e-mail: ku290381@mail.ru

Диаденозинтетрафосфат (ДАТФ) является эндогенным пуриновым соединением, которое в последнее время рассматривается как нейротрансмиттер и комедиатор в вегетативной нервной системе. Ранее было установлено, что ДАТФ оказывает влияние на биоэлектрическую активность различных отделов сердца, а также является модулятором адренергических воздействий в сердце млекопитающих. Однако физиологическая роль ДАТФ в регуляции биоэлектрической активности миокарда легочных вен (ЛВ) не исследована. Миокардиальная ткань, присутствующая в стенке ЛВ млекопитающих, в большинстве случаев является источником эктопической активности, приводящей к возникновению предсердных аритмий. Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния ДАТФ на биоэлектрическую, в том числе эктопическую проаритмическую, активность в миокарде ЛВ у взрослых крыс и у животных на ранних этапах постнатального развития. Для этого регистрировали потенциал покоя, а также электрически вызванные и спонтанные потенциалы действия с помощью стандартной микроэлектродной техники в многоклеточных перфузируемых изолированных препаратах ЛВ, полученных из сердца крысы в конце первых суток постнатальной жизни, а также на 7-е, 14-е, 21-е и 60-е сут жизни. ДАТФ вызывал статистически значимое снижение длительности потенциала действия в миокардиальной ткани ЛВ животных всех возрастов, использованных в работе. Также ДАТФ приводил к гиперполяризации потенциала покоя в миокарде ЛВ у животных на 14-е, 21-е и 60-е сут постнатального онтогенеза. ДАТФ подавлял спонтанную активность, вызванную норадреналином в ЛВ у крыс, начиная с третьей недели постнатальной жизни, однако пуриновое соединение было не способно влиять на автоматию ЛВ у неонатальных крыс. Возможно, что ДАТФ, высвобождаясь из нервных окончаний в качестве котрансмиттера, ослабляет эктопическую аритмогенную активность, вызванную симпатической стимуляцией в миокардиальных рукавах ЛВ.

Ключевые слова: *диаденозинполифосфаты, диаденозинтетрафосфат, пурины, пуриновые рецепторы, сердце, легочные вены, эктопическая активность, аритмия, постнатальное развитие*

Диаденозинполифосфаты (ДАПФ) относятся к широкой группе пуриновых соединений, молекула которых включает два аденозина, соединенных цепью из 2–7 остатков фосфорной кислоты. ДАПФ в последнее десяти-

летие рассматриваются как эндогенные сигнальные соединения, которые присутствуют во множестве тканей и участвуют в регуляции множества физиологических функций [1]. Показано, что ДАПФ проявляют свойства нейро-

медиаторов и комедиаторов в вегетативной нервной системе.

Показано, что внеклеточные ДАПФ оказывают влияние на работу сердца взрослых животных: подавляют его сократительную активность, вызывают изменение потенциалов действия (ПД) и ионных токов [2–5]. Поскольку ДАПФ являются пуриновыми соединениями, то их регуляторные эффекты в миокарде связывают с действием на мембранные рецепторы пуриновых нуклеотидов [6–10]. Известно, что регуляторное действие пуринов в значительной степени заключается в модуляции симпатических и парасимпатических влияний в сердце [11]. Основная роль ДАПФ в сердце может сводиться к ограничению адренергических воздействий на пре- или постсинаптическом уровне [3, 12].

К настоящему времени показано, что у большинства млекопитающих и у человека участки стенок легочных вен (ЛВ), прилегающие к левому предсердию, содержат кардиомиоциты, которые формируют миокардиальную ткань или так называемые «миокардиальные обкладки» ЛВ [13]. Миокардиальная обкладка ЛВ служит источником «эктопической» активности, приводящей к возникновению суправентрикулярных аритмий, в том числе фибрилляции предсердий [14]. Хорошо известно, что симпатические или адренергические воздействия играют значительную роль в инициации предсердных аритмий. Симпатическая или адренергическая стимуляция существенно усиливает аритмогенные свойства миокардиальной обкладки ЛВ за счет влияния на их биоэлектрическую активность [15, 16]. Пуриновые комедиаторы или нейромедиаторы могут существенно влиять на эффекты симпатического нейромедиатора норадреналина (НА) в миокардиальной ткани ЛВ, изменяя способность этой ткани служить источником аритмий [17]. Тем не менее роль целого ряда пуриновых регуляторных соединений, в том числе ДАПФ, как факторов, способных влиять на эктопическую аритмогенную активность миокарда ЛВ, исследована недостаточно. Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния одного из ДАПФ, а именно диаденозинтетрафосфата (ДАТФ) на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани ЛВ, а также на аритмогенную активность, вызванную симпатическим нейромедиатором НА в этой ткани.

В работе также рассматриваются онтогенетические аспекты действия ДАТФ, так как эффекты пуриновых соединений в ЛВ могут существенно различаться на разных этапах развития. Предполагаемые различия могут быть связаны с тем, что формирование симпа-

тического контроля работы сердца происходит в постнатальном онтогенезе, а именно на 2–3-й нед. развития [18], а также изменением количества рецепторов пуриновых нуклеотидов [19]. Кроме того, усиление «аритмогенности» ЛВ связывают с восстановлением неонатального электрофизиологического фенотипа в данной структуре.

В настоящее время показано, что ДАПФ, цепь остатков фосфорной кислоты которых варьирует от двух до шести, поступают во внеклеточную среду и являются физиологически активными [4]. Среди всех ДАПФ ДАТФ является основным ДАПФ, синтезируемым клеткой. Впервые физиологическая активность была выявлена именно у ДАТФ. Влияние ДАТФ на биоэлектрическую активность сходно в рабочем миокарде нескольких видов лабораторных животных [9, 20]. Вследствие этого именно ДАТФ был выбран в данной работе в качестве тестового соединения.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием изолированных многоклеточных препаратов сердца крысы. Всего было получено по одному препарату от 69 животных. В ходе экспериментов были соблюдены все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными, установленные Комиссией по биоэтике МГУ. Половозрелые самцы и самки крыс (Wistar, 250–300 г, возраст 9 нед.) были получены из питомника «Научный центр биомедицинских технологий» (Россия, Москва) и использованы для получения потомства. Животных содержали в виварии в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

В экспериментах использовали препараты сердца, полученные от крыс в конце первых суток постнатального развития (Д1), а также на 7-е, 14-е, 21-е и 60-е сут (Д7, Д14, Д21, Д60) постнатальной жизни. До 21-х сут жизни потомство содержалось с самками в индивидуальных клетках. Крыс в возрасте 60 сут считали взрослыми.

Для выявления действия ДАТФ на биоэлектрическую активность сердца регистрировали потенциал покоя (ПП) и ПД в многоклеточных перфузируемых препаратах ЛВ крысы с помощью стандартной микроэлектродной техники согласно процедуре, подробно описанной ранее [9]. Регистрировали либо электрически вызванные, либо спонтанные ПД.

Перед экспериментом крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали сердце, выделяли многоклеточные препараты ЛВ. Препараты помещали в экспериментальную камеру, разрезали таким образом, чтобы

регистрация ПП и ПД была возможна с эндокардиальной стороны, перфузировали при 37°C оксигенированным (O_2 – 95%, CO_2 – 5%) раствором Тироде с pH 7,2–7,4 (состав, mM: NaCl – 129; KCl – 4; NaH_2PO_4 – 20,9; $MgSO_4$ – 0,5; $NaHCO_3$ – 20; $CaCl_2$ – 1,2; глюкоза – 5) со скоростью протока 10 мл/мин. В части экспериментов ПД вызывали нанесением электрических стимулов при помощи серебряных электродов, соединенных со стимулятором ЭЛС-2 (Россия, частота стимуляции – 3,3 Гц, длительность прямоугольных импульсов – 2 мс, амплитуда импульсов – 3–10 В).

Для отведения ПД использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивление – 10–30 МОм), подключенные к усилителю (Neuroprobe Amplifier Model 1600; A-M Systems, США). Усиленный сигнал поступал на АЦП (E-154; L-Card, Россия) и далее обрабатывался на компьютере с помощью программы «Power Graph 3.3» (Ди-софт, Россия). Во всех экспериментах с помощью программы MiniAnalysis 6.0.7. (Synaptosoft, США) оценивали длительность ПД на уровне 90% реполяризации (ДПД90%).

После получасовой адаптации многоклеточных препаратов в перфузионной камере осуществляли запись, которая состояла из двух блоков: запись ПД в контрольных условиях в течение 1 мин; запись ПД при действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ (Sigma-Aldrich, США) либо при одновременном действии ДАТФ в той же концентрации и НА в концентрации 10 мкМ в течение 10 мин.

Следует отметить, что длительность ПД в контрольных условиях существенно различается в препаратах, полученных от крыс разного возраста (рис. 1А). Наибольшая длительность ПД в наших экспериментах наблюдалась в миокарде ЛВ у взрослых животных. Длительность ПД, наблюдаемую при действии ДАТФ, представляли в % от контрольного значения, полученного для животного конкретного возраста.

Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми измерениями post-hoc, а также последующим внесением поправки Даннета после предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро-Вилка. Тест Фишера использовали для оценки значимости влияния ДАТФ на спонтанную актив-

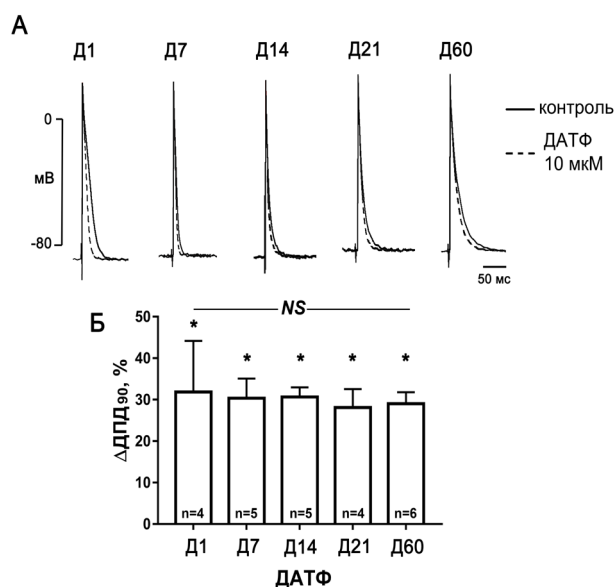


Рис. 1. Влияние диаденозинтетрафосфата (ДАТФ) на электрически вызванные потенциалы действия в многоклеточных препаратах легочных вен, полученных от крыс на разных этапах постнатальной жизни. **А.** Репрезентативные примеры потенциалов действия в контрольных условиях (сплошная линия) и при действии ДАТФ (пунктирная линия) в концентрации 10 мкМ. D1 – препараты легочных вен, полученные от животных в конце первых суток постнатального развития; D7, D14, D21 и D60 – препараты, полученные на 7-е, 14-е, 21-е и 60-е сут постнатального развития. **Б.** Изменение длительности потенциала действия (ΔДПД90) на уровне 90% реполяризации при действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ в препаратах легочных вен крысы на разных этапах постнатального онтогенеза. * – достоверное отличие длительности потенциала действия на уровне 90% реполяризации при действии ДАТФ от контрольных значений длительности потенциала действия, $p < 0,05$; NS – незначимо (non-significant; различия в проявлении эффекта ДАТФ между разными возрастными группами)

ность, вызванную НА. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего за исключением репрезентативных записей.

Результаты и обсуждение

В наших экспериментах ПД предсердного типа в многоклеточных препаратах ЛВ наблюдали на всех протестированных этапах постнатального развития. Уже начиная с первых суток постнатального развития, миокардиальная ткань ЛВ способна отвечать на электрическую стимуляцию ПД, конфигурация которых сходна с таковой в рабочем миокарде предсердий. ДАТФ оказывал существенное влияние на ПД в миокарде ЛВ, что показано впервые. Репрезентативные примеры ПД в контрольных условиях, а также при действии ДАТФ в разных возрастных группах представлены на рис. 1А. В контроле ДПД90% в препаратах ЛВ, полученных от крыс в возрасте

Д1, Д7, Д14, Д21, Д60, составила 37 ± 11 ($n=9$), 20 ± 5 ($n=6$), 22 ± 4 ($n=6$), 27 ± 3 ($n=5$) и 55 ± 6 мс ($n=5$) соответственно (рис. 2А). При действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ ДПД90% в ЛВ снизилась на $32 \pm 12\%$ ($n=4$), $31 \pm 4\%$ ($n=5$), $31 \pm 2\%$ ($n=5$), $28 \pm 4\%$ ($n=4$) от контрольных значений в препаратах, полученных от животных в возрасте Д1, Д7, Д14, Д21, соответственно. В препаратах ЛВ, полученных от животных в возрасте Д60, ДПД90% при действии ДАТФ снизилась на $29 \pm 3\%$ ($n=6$) от контрольного показателя. Таким образом, прямым (т.е. постсинаптическим) эффектом ДАТФ в миокарде ЛВ крыс разных возрастов является уменьшение длительности электрически вызванных ПД.

Следует отметить, что, несмотря на разницу в абсолютной величине длительностей ПД, характерных для разных периодов постнатального развития, величина эффекта ДАТФ, выражаемая в процентах, была близка в препаратах, полученных от крыс с первых по 60-е сут

диапазоне 25–30%. Наши результаты указывают на то, что характер и величина эффекта ДАТФ в миокарде ЛВ и предсердий оказываются сходными.

Известно, что для рабочего миокарда крыс характерно изменение длительности ПД в ходе раннего постнатального онтогенеза, которое связывают с изменением плотности трансмембранных ионных токов, например, калиевого тока задержанного выпрямления I_{Kr} [22]. Пропорциональное снижение длительности ПД на разных этапах развития в ЛВ под действием ДАТФ можно связать с тем, что основной конечной мишенью активируемых им сигнальных каскадов является один или несколько определенных трансмембранных ионных токов.

В наших экспериментах ДАТФ оказывал значимое влияние на ПП в части возрастных групп при отсутствии электрической стимуляции. В контрольных условиях ПП в препаратах ЛВ, полученных от крыс в возрасте Д1, Д7, Д14, Д21, Д60 составил -87 ± 4 мВ ($n=5$), -83 ± 6 мВ ($n=6$), -81 ± 6 мВ ($n=6$), -68 ± 7 мВ ($n=7$), -62 ± 5 мВ ($n=5$) соответственно (рис. 2А). При действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ в препаратах ЛВ от животных в возрасте Д14, Д21, Д60 наблюдали статистически значимую гиперполяризацию ПП (рис. 2А,Б), которая составила 6 ± 2 , 9 ± 1 , $9 \pm 1,5$ мВ соответственно. В препаратах, полученных от животных в возрасте Д1 и Д7, ДАТФ статистически значимого изменения ПП не вызывал. Таким образом, ДАТФ приобретает способность вызывать гиперполяризацию ПП в ЛВ крысы только начиная с 14-х сут постнатальной жизни.

Следует указать, что во всех препаратах ЛВ, полученных от крыс в конце первых сут после рождения, наблюдали спонтанные (или иначе, автоматические) ПД, которые следовали с регулярной периодичностью; спонтанные ПД наблюдали непрерывно в течение всей записи. В таких препаратах ДАТФ не снижал частоту следования спонтанных ПД, и не подавлял

Рис. 2. Влияние диаденозинтетрафосфата (ДАТФ) на потенциал покоя (ПП) в многоклеточных препаратах легочных вен, полученных от крыс на разных этапах постнатальной жизни. А. Оригинальные записи ПП при действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ в препаратах легочных вен крыс, полученные от животных в конце первых суток постнатального развития (Д1), а также на 7-е, 14-е, 21-е и 60-е сут (Д7, Д14, Д21 и Д60) постнатального развития. Во всех экспериментах в препаратах из группы Д1 в контрольных условиях наблюдали спонтанные потенциалы действия, в то время как в других возрастных группах спонтанные потенциалы действия в контрольных условиях отсутствовали. Б. Изменение ПП в препаратах легочных вен крыс под действием ДАТФ на разных этапах постнатального онтогенеза. # – достоверное отличие ПП под действием ДАТФ от ПП, наблюдаемого в конце первых суток развития, $p < 0,05$; ## – то же самое, $p < 0,005$; * – достоверное отличие ПП при действии ДАТФ от контрольных значений ПП, $p < 0,05$. В. Спонтанная активность в препаратах легочных вен, полученных от крысят в конце первых суток постнатального развития при действии 10 мкМ ДАТФ (NS – незначимо; non-significant)

жизни (рис. 1Б). Ранее было показано, что величина эффекта ДАТФ (укорочение ПД) в рабочем миокарде предсердий сходна у крыс в период с 7-х по 60-е сут жизни [21] и лежит в

их: в миокардиальной ткани ЛВ от новорожденных животных спонтанные ПД наблюдали в 100% случаев при действии ДАТФ (рис. 2А,В).

На следующем этапе работы нами было исследовано влияние ДАТФ на эффекты НА в миокарде ЛВ. Во всех экспериментах в препаратах ЛВ, полученных от животных в возрасте Д21 и Д60, НА в концентрации 10 мкМ вызвал спонтанную активность. Спонтанные ПД развивались через 5–7 мин после начала действия НА. В данных экспериментах спонтанная активность имела преимущественно пачечный характер: залпы ПД сходной длины чередовались с периодами покоя (рис. 3А). Предполагается, что особенностью миокардиальной ткани ЛВ *in vivo* у млекопитающих, включая человека, является способность генерировать спонтанные ПД под действием НА, высвобождаемого из симпатических нервов. Поскольку такие спонтанные ПД возникают вне участков миокарда, являющихся естественными источниками автоматии и ритмо-

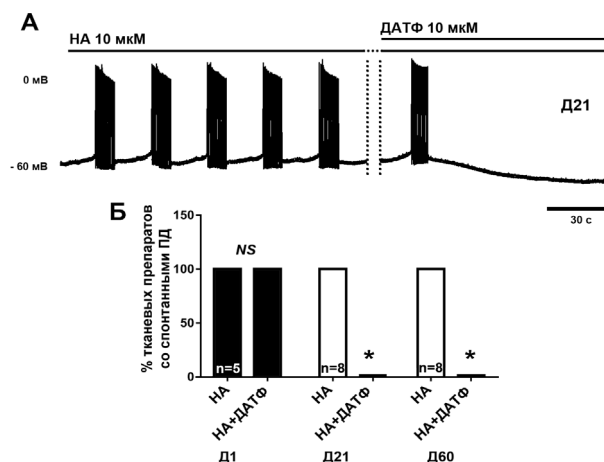


Рис. 3. Влияние диаденозинтетрафосфата (ДАТФ) на спонтанную активность, вызванную норадренином (НА) в многоклеточных препаратах легочных вен, полученных от крыс на разных этапах постнатальной жизни. А. Репрезентативная запись спонтанной активности (периодические спонтанные залпы потенциалов действия — ПД), возникающей при действии 10 мкМ НА в миокардиальной ткани легочных вен крысы в возрасте 21 сут, а также ее подавление ДАТФ (1 — мкМ). Б. Подавление ДАТФ спонтанной активности, вызванной НА, в препаратах легочных вен крыс в возрасте Д1, Д21 и Д60. Черным цветом отмечены препараты, полученные в конце первых сут развития, где спонтанная активность наблюдалась в базальных условиях, т.е. независимо от действия НА. В таких препаратах ни НА, ни ДАТФ не вызывали каких-либо изменений спонтанной активности. * — достоверное отличие числа препаратов, в которых выражено влияние ДАТФ на фоне аппликации НА, от числа препаратов, в которых влияния нет, $p < 0,05$, NS — незначимо (non-significant)

водителями сердца в нормальных условиях, то их рассматривают как эктопические. Как ука-

зано выше, эктопическая активность в ЛВ служит источником предсердных аритмий. Несомненно, что спонтанная активность, вызванная действием НА в экспериментальных условиях в изолированных участках ЛВ крыс, существенно отличается от эктопической активности в патологически измененной миокардиальной ткани ЛВ человека, страдающего фибрилляцией предсердий. Тем не менее экспериментальные исследования с использованием препаратов крыс позволяют получить представление о влиянии тех или иных физиологически активных соединений на эктопию ЛВ и их роли в «аритмогенезе».

Значение ПП, при котором возникают первые спонтанные ПД в пачке, лежало в диапазоне от -70 до -55 мВ в препаратах крыс в возрасте как Д7, так и Д60. В препаратах, полученных от животных в возрасте Д7 и Д14 НА вызывал спонтанные ПД только в 22% (2 из 9) и 33% случаев (2 из 6); ПД в этих случаях возникали нерегулярно и частота их следования была низкой ($0,5 \pm 0,2$ Гц). Поэтому эти возрастные группы исключили из дальнейшего рассмотрения.

Как указано выше, в препаратах ЛВ, полученных от крыс в возрасте Д1, всегда наблюдали спонтанные ПД. НА не вызвал значимого изменения характера этой активности. Например, частота следования спонтанных ПД составляла $2,8 \pm 1$ Гц ($n=7$) в контрольных условиях и $3,2 \pm 1$ Гц ($n=7$) при действии НА. Как и НА, ДАТФ был неспособен вызвать сколько-либо заметное изменение автоматической активности в препаратах ЛВ, полученных от крыс в возрасте Д1.

Однако, в отличие от животных в возрасте Д1, в ЛВ, полученных от крыс в возрасте Д21 и Д60, ДАТФ в концентрации 10 мкМ отчетливо вызывал подавление спонтанной пачечной активности, индуцированной НА. Этот эффект был статистически значимым: прекращение спонтанной активности происходило в 100% препаратов, полученных от крыс обоих возрастов (рис. 3А,Б). Во всех случаях спустя 0,5–1 мин после начала действия ДАТФ происходила гиперполяризация ПП на 7–8,5 мВ, в то время как очередного залпа спонтанных ПД не возникало. Следует указать, что в ходе последнего залпа не наблюдали заметного снижения частоты следования спонтанных ПД или иных изменений.

В предыдущей работе [17] нами было исследовано влияние двух других пуриновых соединений — никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) и АТФ, рассматриваемых в настоящее время как нейротрансмиттеры, а также как комедиаторы в вегетативной нервной системе — на биоэлектрическую активность миокарда

ЛВ. Было установлено, что внеклеточные НАД⁺ и АТФ вызывают снижение частоты следования спонтанных ПД, увеличение интервалов времени между залпами ПД, а также снижение длительности залпов спонтанных ПД, индуцированных НА в ЛВ. Однако оба соединения не приводили к полному подавлению автоматии в ЛВ. Результаты наших исследований позволяют предположить, что ДАТФ, возможно, будучи симпатическим комедиатором, ослабляет аритмогенную активность в миокарде ЛВ и делает это более выражено, чем НАД⁺ и АТФ. Способность ДАТФ подавлять спонтанную активность в ЛВ, возможно, связана с его гиперполяризующим действием на ПП.

В заключение следует отметить, что ДАТФ вызывает снижение длительности вызванных ПД в миокардиальной ткани крыс как на ранних этапах постнатального онтогенеза, так и у взрослых животных. Эффект ДАТФ сходен по

величине с таковым, наблюдаемым в рабочем миокарде предсердий крыс в возрасте от Д7 до Д60. ДАТФ оказывает влияние на электрофизиологию ЛВ в тот период, когда симпатический нервный контроль еще отсутствует. ДАТФ подавляет спонтанную активность, вызванную НА в миокардиальной ткани ЛВ у крыс, начиная с третьей недели постнатальной жизни, однако пуриновое соединение не способно влиять на автономию миокардиальной ткани ЛВ у неонатальных животных.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00268).

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Szalata M. Dinucleoside polyphosphates: occurrence, metabolism and function // *Postepy Biochem.* 2001. Vol. 47. N 1. P. 105–113.
2. Abramochkin D.V., Pustovit K.B., Filatova T.S. Effects of diadenosine polyphosphates on inward rectifier potassium currents in rat cardiomyocytes // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 153–157.
3. Pakhomov N.V., Pustovit K.B., Abramochkin D.V., Kuz'min V.S. The role of diadenosine pentaphosphate and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as potential nucleotide comediators in the adrenergic regulation of cardiac function // *Neurochem. J.* 2017. Vol. 11. N 1. P. 63–71.
4. Flores N.A., Stavrou B.M., Sheridan D.J. The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system // *Cardiovasc. Res.* 1999. Vol. 42. N 1. P. 15–26.
5. Abramochkin D.V., Karimova V.M., Filatova T.S., Kamkin A. Diadenosine pentaphosphate affects electrical activity in guinea pig atrium via activation of potassium acetylcholine-dependent inward rectifier // *J. Physiol. Sci.* 2017. Vol. 67. N 4. P. 523–529.
6. Hoyle C.H., Ziganshin A.U., Pintor J., Burnstock G. The activation of P1- and P2-purinoceptors in the guinea-pig left atrium by diadenosine polyphosphates // *Br. J. Pharmacol.* 1996. Vol. 118. N 5. P. 1294–1300.
7. Erlinge D., Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease // *Purinergic Signal.* 2008. Vol. 4. N 1. P. 1–20.
8. Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergeric agonist in the myocardium // *Physiol. Rev.* 2001. Vol. 81. N 2. P. 767–806.
9. Pustovit K.B., Kuz'min V.S., Abramochkin D.V. Diadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via P2 purinergeric receptors // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2016. Vol. 389. N 3. P. 303–313.
10. Pakhomov N., Pustovit K., Potekhina V., Filatova T., Kuz'min V., Abramochkin D. Negative inotropic effects of diadenosine tetraphosphate are mediated by protein kinase C and phosphodiesterases stimulation in the rat heart // *Eur. J. Pharmacol.* 2018. Vol. 820. P. 97–105.
11. Pelleg A., Katchanov G., Xu J. Autonomic neural control of cardiac function: modulation by adenosine and adenosine-5-triphosphate // *Am. J. Cardiol.* 1997. Vol. 9149. N 2. Suppl. 1. P. 11–14.
12. Neumann J., Meissner A., Boknik P., Gombosová I., Knapp J., Lüss H., Müller F.U., Schlüter H., Zidek W., Rolf N., Van Aken H., Vahlensieck U., Schmitz W. Inotropic effects of diadenosine tetraphosphate in isolated canine cardiac preparations // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999. Vol. 33. N 1. P. 151–156.
13. Masani F. Node-like cells in the myocardial layer of the pulmonary vein of rats: an ultrastructural study // *J. Anat.* 1986. Vol. 145. P. 133–142.
14. Haissaguerre M., Jais P., Shah D.C. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins // *N. Engl. J. Med.* 1998. Vol. 339. N 10. P. 659–666.

15. Maupoil V., Bronquard C., Freslon J.L., Cosnay P., Findlay I. Ectopic activity in the rat pulmonary vein can arise from simultaneous activation of α_1 - and β_1 -adrenoceptors // *Br. J. Pharmacol.* 2007. Vol. 150. N 7. P. 899–905.

16. Ehrlich J.R., Cha T.J., Zhang L., Chartier D., Melnyk P., Hohnloser S.H., Nattel S. Cellular electrophysiology of canine pulmonary vein cardiomyocytes: action potential and ionic current properties // *J. Physiol.* 2003. Vol. 551. N 3. P. 801–813.

17. Karimova V.M., Pustovit K.B., Abramochkin D.V., Kuz'min V.S. Effect of Purine co-transmitters on automatic activity caused by norepinephrine in myocardial sleeves of pulmonary veins // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. Vol. 162. N 5. P. 589–593.

18. Robinson R.B. Autonomic receptor-effector coupling during post-natal development // *Cardiovasc. Res.* 1996. Vol. 31. P. 68–76.

19. Webb T.E., Boluyt M.O., Barnard E.A. Molecular biology of P2Y purinoceptors:

expression in rat heart // *J. Auton. Pharmacol.* 1996. Vol. 16. N 6. P. 303–307.

20. Pustovit K.B., Abramochkin D.V. Effects of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) and diadenosine tetraphosphate (Ap4A) on electrical activity of working and pacemaker atrial myocardium in guinea pigs // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. Vol. 160. N 6. P. 733–736.

21. Pustovit K.B., Potekhina V.M., Pakhomov N.V., Kuzmin V.S. Effects of extracellular diadenosine tetraphosphate on action potentials in the atrial and ventricular myocardium of the rat heart during early postnatal ontogenesis // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 1. P. 43–49.

22. Nerbonne J.M. Regulation of voltage-gated K^+ channel expression in the developing mammalian myocardium // *J. Neurobiol.* 1998. Vol. 37. N 1. P. 37–59.

Поступила в редакцию
29.10.2018

Поступила после доработки
28.12.2018

Принята в печать
10.01.2019

RESEARCH ARTICLE

EXTRACELLULAR DIADENOSINE TETRAPHOSPHATE SUPPRESSES ECTOPIC PROARRHYTHMICITY IN THE MYOCARDIAL TISSUE OF THE PULMONARY VEINS IN ADULT BUT NOT IN NEONATAL RATS

V.M. Potekhina¹, V.S. Kuzmin^{1,2,*}, D.V. Abramochkin^{1,2}

¹*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*
²*Department of Physiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia*

*e-mail: ku290381@mail.ru

Diadenosine tetraphosphate (Ap4A) belongs to a group of endogenous purine compounds that have been recently considered as new neurotransmitters or cotransmitters in autonomic nervous system. It has been shown that Ap4A affects electrophysiology of a pacemaker and working myocardium; modulates adrenergic control of the heart in adult mammals. Nevertheless, the physiological role of Ap4A in regulation of bioelectric properties in pulmonary veins (PV) myocardium has not still been investigated. It is well known that myocardial tissue in the wall of the PV acts as source of the ectopic proarrhythmic activity that underlies supraventricular arrhythmias like atrial fibrillation. The aim of the present study was to elucidate the effects Ap4A on bioelectrical properties and proarrhythmic ectopy in PV in adults and at early postnatal ontogenesis. Thus, the action potentials were recorded with use of standard microelectrode technique in multicellular isolated PV preparations from male Wistar rats at postnatal day 1-, 7-, 14-, 21- and, also, from 60-day-old animals, which were considered as mature. The application of Ap4A caused significant reduction of action potential duration in PV preparations from rats of all ages. Also, Ap4A caused significant

resting membrane potential hyperpolarization in quiescent PV preparations from 14-, 21- and 60-day-old rats. In addition, Ap4A caused complete and significant suppression of ectopic automaticity caused by preliminary noradrenaline administration in PV from 21- and 60-day-old rats, but Ap4A was unable to alter spontaneous intrinsic activity in PV from neonate (1-day-old) rats. The Ap4A-caused attenuation of noradrenaline-induced ectopy in PV was accompanied by substantial resting membrane potential hyperpolarization in all cases. Our results allow suggesting that the release of Ap4A as cotransmitter from autonomic nerves endings can reduce proarrhythmic ectopy caused by sympathetic stimulation of the PV myocardium in vivo.

Keywords: *diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate, purines, purine receptors, heart, pulmonary veins, ectopic activity, arrhythmia, postnatal development*

Сведения об авторах

Потехина Виктория Маратовна — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: vm-karimova@yandex.ru

Кузьмин Владислав Стефанович — канд. биол. наук., доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; вед. науч. сотр. кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ku290381@mail.ru

Абрамочкин Денис Валерьевич — докт. биол. наук., вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; вед. науч. сотр. кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: abram340@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 595.73:57.044

СТРЕКОЗЫ И АНТРОПОГЕННОЕ ЗАСОЛЕНИЕ ВНУТРЕННИХ ВОД

Г.И. Рязанова

Кафедра энтомологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

e-mail: ryazanovagi@mail.ru

Антропогенное засоление внутренних вод и его влияние на пресноводную биоту являются актуальными экологическими проблемами. Такое засоление приводит к изменениям в природной среде, нежелательным с точки зрения охраны окружающей среды и небезразличным для человека. Одним из трех наиболее важных факторов антропогенного засоления пресной воды в странах с умеренным и холодным климатом, наряду с сельскохозяйственной деятельностью и горным делом, стало широкое использование химических реагентов в борьбе с обледенением дорог. Сегодня основными компонентами этих реагентов являются хлориды Na и Ca — дешевые и легко доступные природные материалы. Их смесь с песком, используемая в практике противообледенительной обработки, обычно хранится навалом на специальных площадках под открытым небом круглый год. Воздействие атмосферных осадков делает ее источником засоления окружающих почв и вод. В 2015, 2016 и 2018 гг. регистрировали засоленность внутренних водоемов вблизи многолетнего открытого хранилища противогололедных реагентов в Калужской области. Установлен антропогенный характер засоления обследованных водоемов. Основные составляющие засоления водоемов в районе исследования — хлориды Na и Ca. Максимальный уровень засоления в изученных условиях — 4‰, степень засоления зависит от удаленности водоема от хранилища дорожной соли. Рассмотрено влияние антропогенной засоленности на стрекоз, главным образом, вида *Coenagrion puella* L. Обнаружено, что влияние повышенной засоленности воды проявляется лишь в замедлении развития особей с высоким уровнем флуктуирующей асимметрии, оно не оказывает воздействия на их число в популяции. Высокая соленость воды приводит только к изменению сроков лёта особей с высокой ФА. Предполагается, что стрекозы, как один из массовых объектов пресноводной биоты, очевидно, не подвержены значительному влиянию антропогенного засоления.

Ключевые слова: *дорожная соль, открытое хранилище, окружающие водоемы, стрекозы, флуктуирующая асимметрия, влияние засоления*

Настоящая работа выполнена в рамках проблемы антропогенного влияния на живую природу. Континентальные водоемы Земли в основном пресноводные. Однако существует природное засоление водоемов и водотоков за счет геохимических и климатических процессов, преимущественно хлоридами и сульфатами щелочных и щелочноземельных металлов. Показано, что отношение разных групп пресноводных обитателей и к величине природного засоления, и к его химизму сильно раз-

личается [1, 2]. Соответствующие вариации экосистем минерализованных вод исследованы недостаточно.

Проблема изучения биоты минерализованных водоемов осложняется тем, что к природному засолению присоединяется изменчивое антропогенное, характеризующееся как глобальная и растущая угроза, которая может быть усилена изменением климата [1]. В качестве основного источника антропогенного засоления внутренних вод, наряду с сельскохо-

зяйственным производством и горным делом, рассматривают в настоящее время широкое использование химических реагентов для борьбы с обледенением автодорог [1–4]. Во всем мире до настоящего времени основной составляющей противогололедных реагентов (ПГР) остается NaCl [5]. Показано, что большая часть антигололедных солей поступает в соседние водоемы и водотоки с осадками и при таянии снега [6]. В сельской местности более серьезным источником загрязнения среды, чем зимняя обработка дорог (непостоянная и дозированная), может являться предусмотренное соответствующими инструкциями постоянное хранение запасов твердых ПГР открытым способом — насыпью на подготовленных площадках.

Стрекозы — одни из древнейших насекомых, пережившие многие природные катастрофы и процветающие сегодня. Как эта модель выживания чувствует себя при современном антропогенном изменении своей среды обитания? Эти насекомые известны толерантностью к природному засолению внутренних вод. В обзоре Корбета [7] названы 24 вида стрекоз, обитающие в естественно солоноватых и соленых водах. Показано, что стрекозы семейств Coenagrionidae, Aeshnidae, Gomphidae, Libellulidae, Hemicorduliidae и Lestidae обитают в воде с природной соленостью 5,9–40‰ (промилле), Calopterygidae — с соленостью 0,21–2,60‰ [8–10]. Отметим, что соленость мирового океана около 35‰ (из них 19‰ приходится на хлориды), пресных вод — менее 0,5‰. О сравнительной толерантности к соли разных стрекоз известно немного и данные противоречивы [7, 11]. Так, стрекозы рода *Aeshna* зарегистрированы как обитатели воды с соленостью 21,1‰ [10] или 8,1–11,0‰ [11]. Так же разноречивы литературные данные по стрекозам родов *Lestes*, *Enallagma*, *Sympetrum*. При этом авторы высказывают предположение, что не сама соленость является определяющим экологическим фактором для стрекоз. Например, показано, что *Zygoptera* преимущественно водятся в водоемах среднесоленых (5–18‰), а не в малосоленых (0,5–5‰), так как именно там преобладает их корм — хирономиды [12]. Показано, что личинки стрекоз *Ischnura heterosticta* лучше растут в соленой воде, чем в пресной [13]. Для вида *Enallagma clausum* в озере с соленостью воды 15,6–16,4‰ показано, что не соленость, а глубина и характер грунта — ведущие факторы в распределении личинок [14].

Не решен вопрос о механизме толерантности стрекоз к соли в естественно минерализованных водоемах. Имеем ли мы дело с локальными генетическими адаптациями

изолированных популяций или с физиолого-морфологическими преадаптациями стрекоз в целом? Возможно, способность развиваться в солоноватой воде — адаптация лишь отдельных популяций к природным условиям, в которых они существуют многие годы. Отсюда противоречивые данные о толерантности к соли стрекоз одного рода. Надо отметить, что исследователи нередко выбирают стрекоз моделями для изучения эволюционных процессов именно из-за их сравнительной оседлости и изолированности популяций, что позволяет предполагать значимую популяционно-генетическую дифференциацию типичной характеристикой этого таксона [15–18].

Однако в ряде исследований как общая характеристика отряда показана способность стрекоз к регулированию осмотического давления гемолимфы, позволяющая им осваивать умеренно соленые воды [7]. Механизм этой регуляции обеспечен специфическим строением эпителия прямой кишки и особенностью дыхания личинок стрекоз с использованием этого органа. Широта распространения и видоспецифичность этой морфо-физиологической особенности в отряде не описана, что не дает возможности априори оценивать способность вида осваивать солоноватую воду.

В представленной работе освещены две стороны проблемы. С одной стороны — масштабы и динамика антропогенного засоления водоемов за счет открытого хранения ПГР. Литературные данные такого рода нам не известны. С другой стороны, рассмотрено отношение стрекоз местных популяционных группировок, прежде с соленостью воды не сталкивавшихся, к антропогенному засолению среды. Важно также было выяснить, является ли этот фактор стрессовым для стрекоз и как в связи с этим изменяется один из показателей стресса у животных — флуктуирующая асимметрия (ФА) [19].

Материал и методы

Настоящее исследование проведено в 2015, 2016 и 2018 гг. около г. Балабаново Калужской области. Выбранный участок позволяет оценить максимальное возможное антропогенное засоление в наших условиях. Здесь на площадке возле федеральной трассы А-108 «Большое московское кольцо» более 10 лет открыто навалом хранились возобновляемые запасы песчано-соляной смеси, предназначенной для зимней обработки автодорог. Это хранилище было уничтожено в начале 2017 г. В нашей стране используют песчано-соляную смесь с содержанием технической поваренной соли 30–40%. Площадка расположена на вершине водораздела. На спуске от нее в долину

реки Истья мы обследовали шесть водоемов, разно-удаленных от хранилища соли. Различаются они глубиной и величиной открытых водных пространств. Водоемы в обычное время не связаны наземными протоками, но второй-третий и четвертый могут сообщаться в период половодья по трубе или ровику. За время наблюдения такой ситуации не возникло, что позволяет считать подземные воды главным путем распространения соли.

Поскольку водоемы невелики и не имеют качественно выделяющихся участков, пробы брали в одном месте водоема. Каждое приведенное значение – среднее по трем пробам. Определяли соленость воды методом выпаривания и взвешивания сухого остатка на электронных весах. Данные определения количества солей в воде рассматриваемых водоемов, а также размеры и положение водоемов представлены в табл. 1.

Проведен ионный анализ воды из водоема с наиболее высокой засоленностью (№ 1). Анализ выполнен в Испытательном центре Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова 17.06.2016 на пробе от 30.05.2016 (см. табл. 2).

Стрекозы *Coenagrion puella* L. избраны для рассмотрения особенностей ФА как наиболее многочисленный вид. Взяты выборки еще двух видов стрекоз, менее многочисленных в исследуемых водоемах, вида *Coenagrion*

Толерантность вида к соли в литературе не отмечена. О развитии описываемой особи в

Таблица 2

Содержание в пробе воды водоема № 1 от 30.05.2016 катионов и анионов		
Определяемый показатель	Результат измерения (мг/л)	Нормативное значение*(мг/л)
<i>Катионы</i>		
Магний	33,6	5-65
Кальций	168	25-130
Калий	5,1	20
Натрий	283	200
<i>Анионы</i>		
Сульфат	24,2	500
Хлорид	593	350
Нитрат	0,2	45
Фосфат	<0,1	3,5

* – гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества, СанПиН 2.1.4.1074-01.

данном водоеме говорили ее мягкие еще покровы и неполная окраска, характерные для нелетающих полноценно молодых, только что вышедших из воды имаго стрекоз. Число ячеек подсчитывали в крыльях самцов, отловленных в начале и в конце сезона лёта вида (май или начало июня – середина июля). Подсчет ячеек крыла проводили по схеме, предложенной в работе акад. А.В. Яблокова с соавт. [18]: по отдельным полям крыла, ограниченным продольными жилками. Крыло равнокрылой стрекозы содержит 13 таких полей. Оценили частоту встречаемости ФА (число асимметричных пар полей в крыльях) и степень асимметрии (величину различий числа ячеек в парах полей) – табл. 3.

Все результаты подсчета ячеек обработаны статистическими методами. Использованы непараметрический критерий «U» Вилкоксона–Манна-Уитни и четырехпольные таблицы с критерием χ^2 .

Результаты и обсуждение
Общая минерализация воды по данным анализа Испытательного центра МГУ – 1,11 г/л, то есть несколько меньше, чем полученная нами. Возможно, это следствие ограниченности набора ионов, определяемых Испы-

Характеристики обследованных водоемов

№ водоема	Площадь поверхности (м)	Удаленность от хранилища соли (м)	Соленость воды (‰)					
			2015г. 14.06	2016 г.		2018 г.		
				30.05	07.07	27.05	15.07	
1	40 x 8	250	3,5	1,4	3,2	2,8	4,0	
2	75 x 15	520	2,4	1,1	-	2,1	-	
3	145 x 30	600	1,4	0,7	1,3	1,1	1,4	
4	40 x 15	760	1,6	-	-	1,1	1,1	
5	70 x10	1150	0	0	0	0	0	
6	30 x20	1400	0,01	0	0	0	0	

hastulatum (Charp.) 28.05.16 – водоемы 2, 5, 6 и *Enallagma cyathigerum* (Charp.) 07.07.15 – водоемы 3, 6.

Всего рассмотрена ФА крыльев 295 особей *C. puella*. Вылет имаго этих стрекоз наблюдали во всех шести водоемах на всем протяжении летнего сезона – с конца мая до конца июля, так что речи о драматически летальном влиянии на них засоления думать не приходится.

Таблица 3

Флуктуирующая асимметрия жилкования крыльев у стрекоз *Coenagrion puella* в водоемах с разной соленостью воды*

№ водоема	Время взятия выборок					
	2015		2016		2018	
	14-16.06	4-7.07	28-29.05	9.07	13-14.06	15-16.07
	Число пар полей крыльев/из них асимметричных – из них на 1 ячейку (% асимметричных пар полей - из них асимметричных на 1 ячейку)					
1	257/113-96 (44-85)	270/153-101 (57-66)	208/83-66 (40-82)	247/140-96 (57-67)	283/149-110 (53-74)	198/124-87 (63-70)
2	259/115-72 (44-63)	285/136-97 (48-71)	260/114-93 (44-82)	—	247/126-94 (51-75)	—
3	249/120-84 (48-70)	273/123-87 (45-71)	221/124-87 (56-77)	234/135-85 (58-63)	260/145-98 (56-68)	260/144-98 (55-68)
4	—	297/159-118 (54-74)	—	—	260/136-98 (52-72)	247/132-85 (53-64)
5	156/61-45 (39-74)	231/105-79 (45-75)	104/49-48 (47-98)	—	—	—
6	259/118-97 (46-82)	278/137-101 (49-74)	182/87-75 (48-86)	286/158-105 (55-66)	284/151-107 (53-71)	308/169-107 (55-63)

* — достоверность различий см. в тексте.

тательным центром МГУ. Этот набор учитывает наиболее массовые ионы и отвечает гигиеническим требованиям к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения, утвержденным как контроль качества в рамках СанПиН (санитарно-эпидемиологические правила и нормативы).

Установлено, что основная минерализация обследованных водоемов осуществляется, как и ожидалось, за счет NaCl, составляющего основу химических реагентов пескосоли, и CaCl₂.

Между выборками стрекоз из разных водоемов, взятыми в одно время, не обнаружено значимых различий в частоте встречаемости ФА (табл. 3). Исключением является только выборка из водоема № 1 в сравнении с выборкой из водоема № 3 в начале лета стрекоз в 2016 г. ($\chi^2=3,9$, $p<0,05$).

Достоверно также различие в частоте ФА у стрекоз водоема № 1 в начале лета и конце лета в 2015 и 2016 гг. В начале лета она значительно меньше ($\chi^2=3,9$, $p<0,05$ и $\chi^2=4,4$, $p<0,05$ соответственно). Во всех других водоемах ФА крыльев стрекоз не изменяется значимо в ходе сезона.

Во всех выборках была определена доля стрекоз с ФА полей крыла минимальной величины — в одну ячейку. Эта характеристика свидетельствует о степени асимметрии. Достоверных различий между выборками не обнаружено, как и различий в большем числе ячеек (определяемых по критерию «U»).

У видов *C. hastulatum* и *E. cyathigerum* значимых различий в частоте асимметрии крыльев в водоемах с нулевой соленостью (№ 5, № 6) и в водоемах, имеющих соленость в 1,1–1,4‰ (№ 2, № 3), не обнаружено.

Наблюдаемая связь степени засоленности воды с удалением от хранилища пескосоли, как и состав ионов, соответствующий составу ПГР в хранилище, свидетельствует о том, что основным источником засоления является хранилище, в котором за время нашего исследования в 2015–2016 гг., круглый год находилась пескосоль.

Обнаруженное антропогенное засоление водоемов сравнительно невелико. Вода в обследованных водоемах соответствует уровню малосоленой в естественно минерализованных водоемах — от 0,5 до 5‰. Тем не менее, по литературным данным [2, 4, 23], такая соленость может заметно влиять на пресноводную биоту. Водоемы, удаленные от хранилища более чем на 1 км, не содержат соли вообще.

Измерение в разные годы и дважды в ходе сезона показывает, что степень засоления водоемов весьма изменчива. Она явно зависит от осадков. Так, наименьшая засоленность всех водоемов отмечена 30.05.2016 после сильных дождей. Несмотря на уничтожение хранилища в 2017 г. и прекращение новых поступлений из него соли, максимальная засоленность водоема № 1 наблюдалась в июле засушливого 2018 г., когда водоем № 2 практически пересох. Соленость наибольшего

водоема № 3 в это время вновь достигла уровня 2015 г. после падения в 2016 г. Очевидно, запасы соли в почве, несмотря на прекращение новых поступлений из хранилища, обеспечивают высокий уровень засоленности водоемов и более года спустя после его уничтожения, а вымывание соли пресными водами, поступающими с атмосферными осадками, процесс не быстрый.

При выявленном уровне засоленности водоемов в основном NaCl во всех шести развивались стрекозы *C. puella*. Мы не обнаружили в литературе упоминания этого вида в связи с естественным засолением пресных вод, и не известны границы его возможной толерантности к солености.

В районе нашего исследования — кроме водоемов № 5 и № 6, удаленных от хранилища пескосоли более чем на 1 км и имеющих совершенно пресную воду, — мы оценили минерализацию еще двух водоемов в долине реки Истья, заселенных стрекозами *C. puella*. Эти водоемы удалены от хранилища более чем на 3 км. Содержания солей в них также не обнаружено. Вероятно, геохимические и климатические условия района не способствуют естественному засолению пресных вод, и местная метапопуляция стрекозы *C. puella* с естественным засолением прежде не сталкивалась.

Была сделана попытка оценить негативное влияние на избранных стрекоз антропогенного засоления. Использована гипотеза о влиянии стрессовых (негативных) факторов на нарушение стабильного развития особей и на повышение у них уровня ФА [19]. В мировой литературе ФА признана пригодной в качестве биоиндикатора антропогенных стрессов у водных беспозвоночных [20, 21]. В то же время подчеркивается необходимость осторожного подхода к ее использованию и предполагается, что связь стресса и ФА — нелинейная. Действительно, негативный фактор может вызывать не только развитие ФА, но и дифференцированную смертность особей и, прежде всего, особей с нестабильным развитием, приводя к сокращению в популяции ФА и создавая видимость экологического благополучия. Ранее нами была показана такая парадоксальная ситуация у стрекоз *Ischnura elegans* (V.d. Linden) [22]. Показано, также, что действие стресса на ручейника приводит к выборочной смертности личинок младших возрастов с нестабильным развитием (имеющих большую ФА). В итоге вылетевшие имаго имеют общую небольшую ФА, несмотря на стресс [23].

По литературным данным, соленость воды, будучи негативным фактором, в зависимости от концентрации может оказывать на стрекоз летальное или сублетальное действие.

В нашем случае соленость невелика и далеко не достигает экспериментально показанного для некоторых стрекоз летального уровня. Для пресноводных беспозвоночных было показано, что сублетальная соленость может приводить всего лишь к изменениям в воспроизводстве, росте и развитии особей [13].

Обнаруженный нами уровень антропогенного засоления водоемов не является летальным фактором для стрекоз, так как при самом высоком наблюдаемом уровне засоленности изучаемый вид благополучно развивается с обычной плотностью. Влияет ли вообще найденный уровень антропогенной засоленности водоемов на стрекоз как фактор негативный, но сублетальный? Нами не выявлено значимой связи частоты встречаемости ФА с соленостью воды даже при уровне в 4‰. Обнаруженный градиент солености воды не коррелирует ни с градиентом частоты встречаемости асимметрии (кроме одного исключения, описанного выше), ни со степенью асимметрии. Подобное отсутствие действия на ФА стрекоз описано и для безусловно негативного фактора — инсектицида карборила. Обнаружено, что его сублетальные дозы не изменяют ФА *Xanthocnemis zealandica* (McLach.) — равнокрылых стрекоз семейства Coenagrionidae [24]. Выше [12–14] было показано, что в ряде случаев авторы, невысоко оценивая значение для стрекоз даже большей солености воды, не считают естественное засоление главным фактором, определяющим распределение стрекоз в водоемах. Изучение ФА (длины бедра) личинок стрекоз *Calopteryx splendens* (Harr.) на участке в 20 км реки Мёрт (Франция) при градиенте естественной солености от 0,2 до 2,6‰ показало, что рассматриваемая ФА не определяется соленостью воды [25]. То есть отсутствие связи частоты ФА в популяции стрекоз и солености воды уже отмечали.

Следует учитывать, что литературные данные о влиянии засоления водоемов на стрекоз получены главным образом в исследованиях популяций, долговременно обитающих в естественно засоленных водах. В настоящей работе рассматривается популяция, долговременно существовавшая в пресной воде, а отсутствие связи ее ФА с засолением свидетельствует о том, что небольшое антропогенное засоление не является для данной популяции заметным негативным фактором. Два другие использованные в настоящем исследовании вида стрекоз подтверждают это предположение, расширяя его, по крайней мере, на семейство Coenagrionidae. Отсутствие различий в характере ФА популяционных группировок засоленных и несоленых водоемов свидетельствует о том, что соль в обнаруженном количестве не

является серьезным стрессовым фактором для изучаемых видов.

Тем не менее, некоторое отрицательное влияние засоления на изучаемых стрекоз мы все же обнаружили при рассмотрении ФА популяционной группировки при максимальном наблюдаемом нами уровне засоления — в водоеме № 1. При солёности в 4‰ найдена значимая связь частоты встречаемости ФА со временем лёта стрекоз. В этом водоеме, в отличие от всех других, ФА крыльев стрекоз в 2015 и в 2016 гг. изменяется со временем — увеличивается в конце лёта вида. Мы полагаем, что сравнительно высокая солёность как фактор, в какой-то мере неблагоприятный, замедляет онтогенез особей с нестабильным развитием, имеющих большую ФА. Такие особи начинают лететь в водоеме № 1 позже, чем в других, — в июле, и только тогда здесь увеличивается общая частота ФА крыльев стрекоз. В 2018 г. водоем № 1 — единственный, где, судя по процентному соотношению асимметричных особей, обнаруженное различие сохраняется, но только как тенденция (не хватает достоверности: $\chi^2=1,3$, $p>0,05$). Больше ни в одном из водоемов и ни в одном из трех сезонов такое явление мы не наблюдали. То есть, при максимальном обнаруженном нами уровне солёности воды все же фактор негативный, хотя и не влияющий на ФА рассмотренных популяционных группировок.

Полученные данные позволяют считать, что хранение под открытым небом запасов таких противогололедных реагентов как пескосоли с превалированием в ее составе дешевой

технической поваренной соли приводит к засолению близлежащих водоемов. В худших случаях, при расстоянии от хранилища до водоема около 200 м и при особенностях ландшафта, не препятствующих стоку от хранилища в сторону водоема поверхностных и подземных вод, засоленность пресных вод может составлять 4‰. Уровень антропогенной засоленности изменяется в зависимости от величины осадков.

Солёность как негативный физико-химический фактор могла бы обладать заметным воздействием на стрекоз. Однако эти насекомые, по-видимому, в масштабах отряда, даже независимо от экологической истории популяции, отличаются морфо-физиологической особенностью, позволяющей претерпевать без заметного ущерба такое небольшое антропогенное засоление водоемов. Неизбежные же изменения, происходящие в составе биоты водоемов в связи с описанным антропогенным засолением и касающиеся кормовой базы стрекоз, не критичны для этого хищника — очень широкого полифага. При известном разнообразии отношения к засоленности разных групп пресноводной экосистемы для стрекоз, по-видимому, изученная антропогенная засоленность не является стрессовым фактором, угрожающим существованию популяции.

Исследования проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kefford B.J., Buchwalter D., Cañedo-Argüelles M., Davis J., Duncan R.P., Hoffmann A., Thompson R. Salinized degraded systems or new habitats for salt-tolerant faunas? // *Biol. Lett.* 2016. Vol. 12. N 3. Article ID: 20151072.
2. Cañedo-Argüelles M., Kefford B.J., Piscart C., Prat N., Schäfer R.B., Schulz C.J. Salinisation of rivers: an urgent ecological issue // *Environ. Pollut.* 2013. Vol. 173. P. 157–167.
3. Blasius B.J., Merritt R.W. Field and laboratory investigations on the effects of road salt (NaCl) on stream macroinvertebrate communities // *Environ. Pollut.* 2002. Vol. 120. N 2. P. 219–231.
4. Hart B., Bailey P., Edwards P., Hortle K., James K., McMahon A., Meredith C., Swadling K. A review of salt sensitivity of Australian freshwater biota // *Hydrobiologia.* 1991. Vol. 210. N 1–2. P. 105–144.
5. Stranko S., Bourquin R., Zimmerman J., Kashiwagi M., McGinty M., Klauda R. Do road salts cause environmental impacts? Annapolis: Maryland Department of Natural Resources, 2013. 33 pp.
6. Williams D.D., Williams N.E., Cao Y. Road salt contamination of groundwater in a major metropolitan area and development of a biological index to monitor its impact // *Water Res.* 2000. Vol. 34. N 1. P. 127–138.
7. Corbet P.S. Dragonflies. Behavior and ecology of Odonata. Ithaca, New-York: Comstock Publ. Assoc., Cornell Univ. Press. 2004. 829 pp.
8. Rutherford J.C., Kefford B.J. Effects of salinity on stream ecosystems: improving models for macroinvertebrates. CSIRO Land and Water Technical Report 22/05. Canberra, 2005. 64 pp.
9. Millán A., Velasco J., Gutiérrez-Cánovas C., Arribas P., Picazo F., Sánchez-Fernández D., Abellán P. Mediterranean saline streams in

southeast Spain: What do we know? // J. Arid. Environ. 2011. Vol. 75. N 12. P. 1352–1359.

10. Zinchenko T.D., Golovatyuk L.V. Salinity tolerance of macroinvertebrates in stream waters (review) // Arid Ecosyst. 2013. Vol. 3. N 3. P. 113–121.

11. Catlin P.M. Dragonflies (Odonata) emerging from brackish pools in saltmarshes of Gaspé, Quebec // Can. Field-Nat. 2009. Vol. 123. N 2. P. 176–177.

12. Hart E.A., Lovvorn J.R. Patterns of macroinvertebrate abundance in inland saline wetlands: a trophic analysis // Hydrobiologia. 2005. Vol. 541. N 1. P. 45–54.

13. Kefford B.J., Zalizniak L., Nugegoda D. Growth of the damselfly *Ischnura heterosticta* is better in saline water than freshwater // Environ. Pollut. 2006. Vol. 141. N 3. P. 409–419.

14. Herbst D.B., Medhurst R.B., Roberts S.W., Jellison R. Substratum associations and depth distribution of benthic invertebrates in saline Walker Lake, Nevada, USA // Hydrobiologia. 2013. Vol. 700. N 1. P. 61–72.

15. Conrad K.F., Willson K.H., Whitfield K., Harvey I.F., Thomas C.J., Thomas N. Characteristics of dispersing *Ischnura elegans* and *Coenagrion puella* (Odonata): age, sex, size, morph and ectoparasitism // Ecography. 2002. Vol. 25. N 4. P. 439–445.

16. Watts P.C., Rouquette J.R., Saccheri I.J., Kemp S.J., Thompson D.J. Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercurial* // Molecular Ecology. 2004. Vol. 13. N 10. P. 2931–2945.

17. Watts P.C., Saccheri I.J., Kemp S.J., Thompson D.J. Effective population sizes and migration rates in fragmented populations of an endangered insect (*Coenagrion mercurial*: Odonata) // J. Animal Ecol. 2007. Vol. 76. N 4. P. 790–800.

18. Yablokov A.V., Eatin V.J., Pritikina L.N. Variability of wing venation of the dragonfly // Beitr. Ent. 1970. Vol. 5. N 6. P. 503–526.

19. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И., Валецкий А.В., Кряжева Н.Г., Чистякова Е.К., Ф.Т. Чубинишвили. Здоровье среды: методика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000. 68 с.

20. Bonada N., Prat N., Resh V.H., Statzner B. Developments in aquatic insect biomonitoring: A comparative analysis of recent approaches // Annu. Rev. Entomol. 2006. Vol. 51. P. 495–523.

21. Beasley D.A.E., Bonisoli-Alquati A., Mousseau T.A. The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: a meta-analysis // Ecol. Indic. 2013. Vol. 30. P. 218–226.

22. Ryzanova G.I., Polygalov A.S. Fluctuating asymmetry of wing venation in damselflies *Ischnura elegans* (V.d. Linden) (Odonata, Coenagrionidae) and prospects of its use as a biological indicator of ecological quality of freshwater reservoirs // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 4. P. 165–169.

23. Piscart C., Moreteau J.-C., Beisel J.-N. Decrease of fluctuating asymmetry among larval instars in aquatic, holometabolous insect // C.R. Biol. 2005. Vol. 328. N 10–11. P. 912–917.

24. Hardersen S., Wratten S.D., Frampton C.M. Does carbaryl increase fluctuating asymmetry in damselflies under field conditions? A mesocosm experiment with *Xanthocnemis zealandica* (Odonata:Zygoptera) // J. Appl. Ecol. 1999. Vol. 36. N 4. P. 534–543.

25. Piscart C., Moreteau J.-C., Beisel J.-N. Fluctuating asymmetry of natural populations of aquatic insects along a salinity gradient // Environmental Bioindicators. 2006. Vol. 1. N 4. P. 229–241.

Поступила в редакцию
25.11.2018

Поступила после доработки
13.01.2019

Принята в печать
15.01.2019

RESEARCH ARTICLE

ODONATA AND THE ANTHROPOGENIC SALINIZATION OF INLAND WATERS

G.I. Ryazanova

*Department of Entomology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: ryazanovagi@mail.ru*

Anthropogenic salinization of inland waters and its effect on freshwater biota is one of the current environmental problems. Such salinization leads to changes in the natural environment, undesirable from the point of view of environmental protection and not indifferent to humans. One of the three most important factors of anthropogenic salinization of freshwater in countries with a temperate and cold climate, along with agricultural activities and mining, has today become the widespread use of chemical reagents in the fight against road icing. Today, the main components of these reagents are chlorides of Na and Ca – cheap and easy to obtain natural materials. The mixture of sand and salt used in the practice of de-icing is usually stored in bulk in special open-air areas all year round. The impact of atmospheric precipitation makes it a source of salinization of the surrounding soils and waters. In 2015, 2016 and 2018 recorded salinity of inland waters near the long-term open storage of anti-icing agents in the Kaluga region. The anthropogenic nature of salinization of the examined reservoirs has been established. The main components of salinization of reservoirs in the study area are Na and Ca chlorides. The maximum level of salinity in the studied conditions is 4‰ (ppm), the degree of salinity depends on the distance of the reservoir from the salt storage. The influence of anthropogenic salinity on dragonflies, mainly of the species *Coenagrion puella* L., has been studied. It has been found that the negative effect of salt manifests itself only as a slowdown in the development of individuals with a high level of fluctuating asymmetry, the number of which in the population is not determined by water salinity. High salinity of water only leads to a change in the time of emergence of imago of subjects with high FA. It is assumed that dragonflies, as one of the mass objects of freshwater biota, obviously do not suffer significantly with anthropogenic salinization.

Keywords: *road salt, open storage, surrounding reservoirs, dragonflies, fluctuating asymmetry, salinization effect*

Сведения об авторе

Рязанова Галина Ивановна — докт. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры энтомологии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-16-95; e-mail: ryazanovagi@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.64

ПЦР-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ АГРОБАКТЕРИЙ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ВИНОГРАДНИКАХ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ, ПО ТИПУ СОДЕРЖАЩИХСЯ В НИХ Ti-ПЛАЗМИД**М.В. Макаркина*, Е.Т. Ильницкая, С.В. Токмаков***Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Россия, 350901, г. Краснодар, ул. имени 40-летия Победы, д. 39***e-mail: konec_citatu@mail.ru*

Agrobacterium vitis и некоторые штаммы *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* вызывают опасное хроническое заболевание на виноградных растениях — бактериальный рак. С использованием молекулярно-генетического метода проведена работа по идентификации и изучению разнообразия патогенных агробактерий, вызывающих бактериальный рак на виноградниках Краснодарского края. В качестве материала использовали 76 образцов молодых и одревесневших опухолевидных наростов бактериального рака винограда, собранных с растений в четырнадцати виноградарских хозяйствах Краснодарского края и имеющих различное происхождение посадочного материала (Италия, Франция, Австрия, Сербия, Болгария, Россия). Во всех исследуемых образцах, по данным ДНК-анализа с помощью тест-системы PGF/PGR, идентифицировано присутствие *A. vitis*. При изучении разнообразия агробактерий по типу содержащихся в них Ti-плазмид определены 4 группы, содержащие Ti-плазмиды: октопинового (59,5%), октопин/витопинового (13,5%), витопинового (13,5%) и нопалинового (13,5%) типов. На основе полученных данных сделан вывод, что на виноградниках Краснодарского края бактериальный рак винограда вызывается агробактериями *A. vitis*, преимущественно октопинового типа.

Ключевые слова: *Agrobacterium vitis*, бактериальный рак винограда, полимеразная цепная реакция, Ti-плазмида, типы опинов, тест-системы

Бактериальный рак винограда — хроническое заболевание виноградной лозы, возбудителем которого являются бактерии рода *Agrobacterium* spp. Агробактерии вызывают заболевание, если обладают крупной Ti- или Ri-плазмидой (от 200 до 800 тыс. п.н.) [1]. Визуально поражённые кусты определяются по опухолевидным наростам растительной ткани. Опухолообразование инициируется интеграцией переданной ДНК в растительный ядерный геном, что приводит к активации экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза гормонов растения. Выработка огромного количества гормонов роста (ауксинов и цитокининов) приводит к неуправляемому делению и росту зараженных клеток растения, из которых образуется опухолевидный нарост. Особенностью протекания заболевания является наличие латентной стадии, что способствует

распространению возбудителя бактериального рака при заготовке посадочного материала с визуально здоровых растений [2, 3].

Систематика видов *Agrobacterium* spp. неоднократно пересматривалась. Исследования Керр и Панагопулос, а также результаты биохимических и ДНК-тестов, проведенных Офель и Керр, показали, что *Agrobacterium* spp., выделенные из виноградной лозы, образуют отдельную группу и отличаются от isolates, выделенных из других растений (плодовых, ягодных и некоторых цветочных) [4, 5]. Долгое время была принята номенклатура, основывающаяся на классификации *Agrobacterium* spp. по биотипам: биотип-1, биотип-2 и биотип-3 — соответственно, *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* и *A. vitis* [4, 5]. Однако Мусави и др. по данным мультилокусного секвенирования (MLSA) доказали, что вид *A.*

vitis отличается от *Agrobacterium* и предложили его перенести в род *Allorhizobium* [6]. На то, что *A. vitis* не принадлежит к роду *Agrobacterium*, указывают и Рамирес-Вахена и др. [7]. Эти авторы определили, что члены рода *Agrobacterium* характеризуются наличием линейной хромосомы рядом с круговой хромосомой. В отличие от генома *Agrobacterium* spp. основным геном *A. vitis* состоит из двух круговых хромосом [8].

Онкогенные виды *Agrobacterium* классифицируют по типу бактериального рака, индуцируемого ими. Так агробактерии (*A. rhizogenes*), паразитирующие на корнях, обладают Ri-плазмидой и вызывают болезнь называемую «бородатые корни», а агробактерии (*A. tumefaciens*, *A. vitis*) имеют в своем составе Ti-плазмиду и вызывают опухолообразования (корончатые галлы) на корнях и надземных частях растения. Ti-/Ri-плазмиды агробактерий различаются по типу синтезируемых ими опинов. Одна плазида не всегда индуцирует только один определенный тип опинов, чаще — несколько типов опинов в различных комбинациях связаны с единичной Ti-/Ri-плазмидой. *A. vitis* преимущественно синтезируют нопалин, витопин или октопин и редко — другие типы опинов [9].

Точная идентификация опухолегенных агробактерий — принципиальный вопрос по причине их большого разнообразия. Особенно это важно для вирулентных штаммов. Первые значимые результаты ПЦР-идентификации агробактерий опубликованы в 1995 г. Тогда были предложены универсальные маркеры для выявления патогенных агробактерий [10]. Далее последовала серия работ, направленных на точную видовую, а позже и штамм-специфичную идентификацию агробактерий. Были разработаны тест-системы для *Agrobacterium* spp. [11–14], *A. tumefaciens* и *A. vitis* [15–19]. Созданы ДНК-маркеры и для выявления различий агробактерий по типу содержащихся в них Ti-плазмид. Для идентификации изолятов, содержащих Ti-плазмиды октопинового, нопалинового и витопинового типа, были разработаны тест-системы детекции генов, определяющих синтез соответствующих опинов (OCTF/OCTR, NOPF/NOPR, VisF/VisR) [15, 20, 21]. Также были сконструированы праймеры (TF/TR, NF/NR, SF/SR) к последовательностям гена *bb*, который полиморфен в изолятах с различным типом Ti-плазмиды (октопиновой, нопалиновой и витопиновой) [15, 22]. В результате совместной работы итальянских и немецких ученых были разработаны ДНК-маркеры, позволяющие разделять штаммы *A. vitis* на две подгруппы по типу плазмид (октопин/нопалиновые и

витопиновые), основываясь на нуклеотидной последовательности гена *virD2* [23].

В настоящее время в разных районах виноградарства проводится изучение патогенных агробактерий. Турецкие ученые исследовали биоразнообразие агробактерий на виноградниках Турции в Центральной Анатолии [24]. Преобладающий вид онкогенных агробактерий, выделенных из опухолевидных наростов растений — *A. vitis*. Генетическое разнообразие изолятов оценивали путем сравнения ДНК-фингерпринтов межгенной спейсерной области гена 16S-23S рибосомальной ДНК, а также с использованием тест-систем к генам агробактерий *pehA*, *virA* [16]. Выделились две основные группы: содержащие Ti-плазмиду октопинового типа и нопалин/витопиновую Ti-плазмиду. В Словении из 80 изолятов *Agrobacterium* spp., отобранных в ходе фитопатологического исследования в 2006 г. [25], 75 изолятов были идентифицированы как *A. vitis*, 5 — как *A. tumefaciens* с помощью тест-системы к гену *pehA* [16] и мультиплексного ПЦР-анализа [12], позволяющему определять патогенные агробактерии, относящиеся к 3 видам — *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* и *A. vitis*. Изучение в Болгарии биоразнообразия агробактерий [26], выделенных из виноградной лозы, почвы и опухолей растений, проводили с помощью четырех тест-систем (PGF/PGR [17], *virD2A/virD2C* [10], *virE2PF/virE2PR* [27] и *visF/visR* [20, 21]) к генам *A. vitis* и *A. tumefaciens*. Из 75 опухолегенных образцов большинство (88 %) было идентифицировано как *A. vitis* и некоторое количество (12 %) — как атипичные изоляты *A. tumefaciens*. На виноградной лозе в Египте было выделено 12 изолятов агробактерий [28]. Генетическое разнообразие оценивали, используя мультиплексный ПЦР-анализ с тремя специфичными парами праймеров к генам *pehA*, *virF* и *virD2* [15]. Изоляты были разделены на три основные группы в зависимости от типа Ti-плазмиды — октопиновые, витопиновые и октопин-витопиновые. Так как ни один из изолятов не принадлежал к нопалиновому типу, авторы сделали предположение, что в египетских штаммах *A. vitis* отсутствует Ti-плазида этого типа. Исследование биоразнообразия *A. vitis* на виноградниках Вожводинской провинции Сербии проводили с помощью маркеров к гену *virC* [14], локализованному на Ti-/Ri-плазмидах, а также идентифицировали виды агробактерий с помощью универсальных маркеров [12]. Всего было определено пять штаммов, для которых подтвердили их патогенность и принадлежность к виду *A. vitis* [29]. На виноградниках в Иране также изучалось разнообразие агробактерий. В работе использовали маркеры к генам *virD2*,

pehA и к опинсинтазным генам (*OCT*, *NOP*, *Vis*). Из 105 собранных образцов 77 были идентифицированы как *A. vitis*, а 28 — как *A. tumefaciens*, 49 образцов были отнесены к штаммам октопинового типа, 35 — к витопиновому типу и 8 — к нопалиновому типу [30].

Актуальность изучения биоразнообразия агробактерий в различных зонах виноградарства определяется не только фундаментальными целями, но и практическим значением подобных работ для разработки биологических методов контроля развития бактериального рака, так как известен ряд штаммов-антагонистов, сдерживающих развитие опухолей, вызываемых определенными штаммами [31]. Таким образом, анализируя информацию о наличии тех или иных видов и штаммов в исследуемой зоне, можно подобрать соответствующие штаммы-антагонисты для борьбы с бактериальным раком. В настоящее время использование штаммов-антагонистов является перспективным направлением борьбы с бактериальным раком винограда.

В Краснодарском крае расположены основные площади промышленных виноградников Российской Федерации. Тем самым, изучение патогенов виноградной лозы в данном регионе — актуальная задача. Целью представляемой работы является исследование разнообразия по типу Ti-плазмиды агробактерий, вызывающих бактериальный рак, на виноградниках Краснодарского края с использованием молекулярно-генетических методов идентификации.

Материалы и методы

Сбор образцов. Сбор образцов производился в 2016–2017 гг. В качестве материала использовали молодые и частично одревесневшие опухоли, обнаруженные на надземных частях растений винограда в четырнадцати виноградарских хозяйствах различных зон Краснодарского края и имеющие различное происхождение посадочного материала (Италия, Франция, Австрия, Сербия, Болгария, Россия). Всего проанализировано 76 образцов.

Выделение ДНК. ДНК из опухолей выделяли с применением методики на основе ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид) с добавлением поливинилпирролидона поперечносшитого (PVPP) на этапе гомогенизации и с использованием изопропилового спирта в качестве осаждающего агента [32].

ПЦР-анализ. Для исследования изолятов агробактерий применяли классический метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). В работу были включены ДНК-маркеры к генам *pehA*, *virF* и *virD2*, *6b*, а также октопинсинтаз-

ному (*OCT*), нопалинсинтазному (*NOP*) и витопинсинтазному (*Vis*) генам [10, 15, 21, 22].

ПЦР-анализ проводили с предварительной оптимизацией таких параметров, как температура и длительность циклов отжига праймеров и элонгации, общее количество циклов, концентрация дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP), праймеров и т.д. В состав смеси для ПЦР общим объемом 20 мкл входило: 50–70 нг ДНК, ПЦР-буфер для Taq-полимеразы с сульфатом аммония и магнием, 0,125 мМ/мкл dNTP, 0,25 пМ/мкл каждого праймера, 0,05% БСА (бычий сывороточный альбумин), 0,125 е.а./мкл Taq-полимераза (ООО «Бигль», Россия). ПЦР осуществляли с использованием прибора «Терцик» («ДНК-технология», Россия) при условиях: 5 мин при 94°C — начальная денатурация; последующие 40 циклов — 18 с денатурация при 94°C, 40 с отжиг праймеров при температуре 60°C (для праймеров PGF/PGR, VIRFF1/VIRFR2, VIRD2S4F716/VIRD2S4R1036, NF/NR, TF/TR, SF/SR) или 55°C (для VIRD2A/VIRD2C, VIRD2A/VIRD2F; Visf/Visr, OCTF/OCTR, NOPF/NOPR), 1 мин — элонгация при 72°C; 4 мин — финальная элонгация при 72°C.

Разделение продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле («Helicon», Россия), содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. Визуализировали и анализировали размер амплифицированных фрагментов ДНК по интенсивности свечения в УФ-свете с использованием маркера молекулярного веса 100–1500 п.н. («СибЭнзим», Россия).

Исследования выполнены на оборудовании центра коллективного пользования «Геномные и постгеномные технологии» Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия.

Результаты и обсуждение

Для изучения агробактерий были выбраны тест-системы для детекции вирулентных генов *A. vitis* — *pehA*, *virF*, *virD2*, *6b*, витопинсинтазного, нопалинсинтазного и октопинсинтазного, а также ДНК-маркеры к высококонсервативным участкам *virD2* гена *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*, которые принято считать универсальными для идентификации патогенных *Agrobacterium* spp.

На первом этапе был произведен скрининг всех исследуемых образцов тест-системами VIRD2A/VIRD2C и VIRD2A/VIRD2F к высококонсервативным участкам гена *virD2*, который обнаруживается у *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Следует отметить, что указанные тест-системы дают не всегда воспроизводимые результаты [15]. Маркерной

системой VIRD2A/VIRD2C, согласно литературным данным, можно определить все патогенные агробактерии. В нашем случае удалось амплифицировать целевые фрагменты у 85% анализируемых изолятов. Считается, что тест-система VIRD2A/VIRD2F определяет штаммы, содержащие Ti-плазмиду витоинового типа. С помощью тест-системы VIRD2A/VIRD2F обнаружили целевые ПЦР-фрагменты у 28,5% образцов. Подобные нестабильные результаты были отмечены и в некоторых других работах по изучению патогенных агробактерий [15, 29]. Причиной этому может быть высокое генетическое разнообразие изучаемых образцов, а также вероятность того, что данная тест-система обнаруживает большей частью *A. tumefaciens*, а не все патогенные агробактерии.

Следующим шагом была проверка образцов с помощью мультиплексной тест-системы PGF/PGR/VIRFF₁/VIRFR₂/VIRD2S4F₇₁₆/VIRD2S4R₁₀₃₆ к основным генам *A. vitis* — *pehA*, *virF* и *virD2* [15]. *PehA* — полигалактуроназный ген, присутствующий во всех агробактериях вида *A. vitis* и отсутствующий в агробактериях *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*; ген *virF* присутствует в агробактериях с Ti-плазмидой октопинового и нопалинового типа, ген *virD2* — только в агробактериях с Ti-плазмидой витоинового типа. Указанная тест-система была нами апробирована ранее [33]. По результатам проведенного исследования было определено, что возбудителем бактериального рака в Краснодарском крае являются агробактерии вида *A. vitis*, различающиеся по типу Ti-плазмиды.

В настоящей работе мы расширили выборку и географию сбора образцов. Получены следующие результаты: целевой фрагмент (466 п.н.) гена *pehA* *A. vitis* выявлен нами во всех проанализированных образцах, что говорит о присутствии агробактерий вида *A. vitis* в опухолевидных тканях растений (рис. 1). Целевой фрагмент гена *virF* (382 п.н.) отмечен в 92% образцов (в 13 хозяйствах из 14) — эти образцы несут Ti-плазмиды октопинового или нопалинового типа. Целевой фрагмент гена *virD2* (320 п.н.) идентифицирован в 28,5 % образцов (в 4 хозяйствах из 14). Кроме того, в 13,5 % образцов (в двух хозяйствах) обнаружены одновременно целевые фрагменты генов *pehA* и *virF*, и *virD2*. Это свидетельствует о наличии двух типов Ti-плазмид в данных образцах (рис. 1, образцы 1 и 10).

Следует отметить, что мультиплексную тест-систему PGF/PGR/VIRFF₁/VIRFR₂/VIRD2S4F₇₁₆/VIRD2S4R₁₀₃₆ можно успешно использовать для идентификации возбудителя

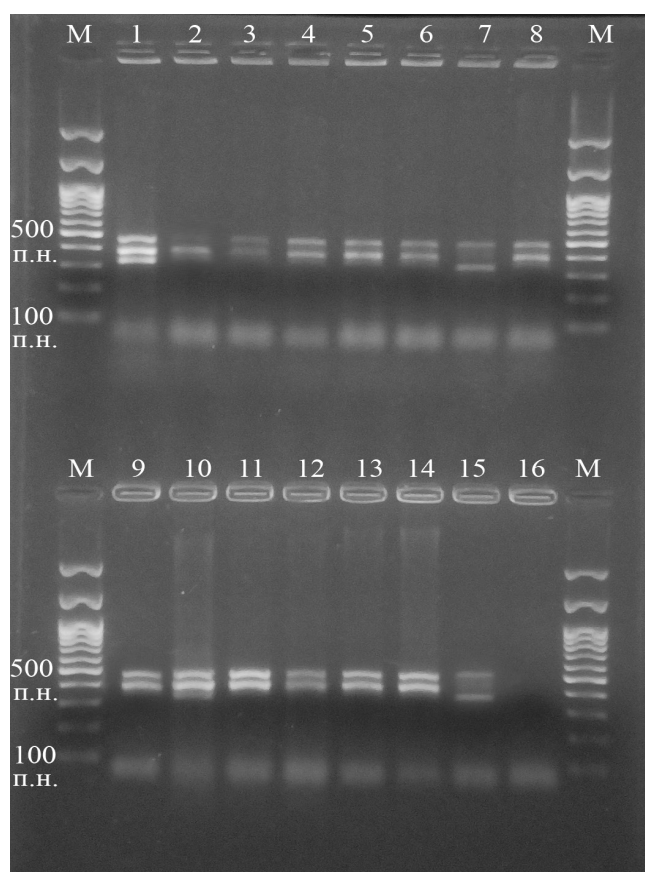


Рис. 1. Результаты мультиплексного ПЦР-анализа: PGF/PGR (целевой фрагмент 466 п.н.), VIRFF₁/VIRFR₂ (382 п.н.) и VIRD2S4F₇₁₆/VIRD2S4R₁₀₃₆ (320 п.н.). Анализируемые образцы из: 1 — поселок Абрау-Дюрсо, 2 — село Молдаванское; 3 — поселок Сенной; 4 — станица Старотитаровская; 5 — хутор Копанской; 6 — хутор Усатова балка; 7 — город Горячий ключ; 8 — станица Красносельская; 9 — станица Гастагаевская; 10 — станица Наухаевская; 11 — станица Старовеличковская; 12 — хутор Колосистый; 13 — хутор Северный; 14 — село Тамань; 15 — хутор Северный. 16 — отрицательный контроль (ПЦР-смесь без ДНК). М — маркер веса

бактериального рака в латентной стадии в посадочном материале винограда [34].

При изучении агробактерий по типу содержащихся в них Ti-плазмид (октопиновой, витоиновой, нопалиновой) проводили параллельные анализы всех образцов и другими, более специфичными, тест-системами. Так, точная принадлежность к конкретному типу Ti-плазмиды (октопиновому или нопалиновому) изучалась ДНК-маркерами (OCTF/OCTR, NOPF/NOPR) к октопинсинтазному и к нопалинсинтазному гену, а также тест-системами (TF/TR, NF/NR) к различным участкам гена *bb*, характерным для агробактерий с октопиновой и нопалиновой Ti-плазмидой.

С помощью тест-системы OCTF/OCTR удалось детектировать целевые фрагменты (475 п.н.) у 73% исследуемых образцов (в 11 из 14 хозяйств) (рис. 2А). Проведенные анализы с маркером TF/TR к гену *bb* подтвердили

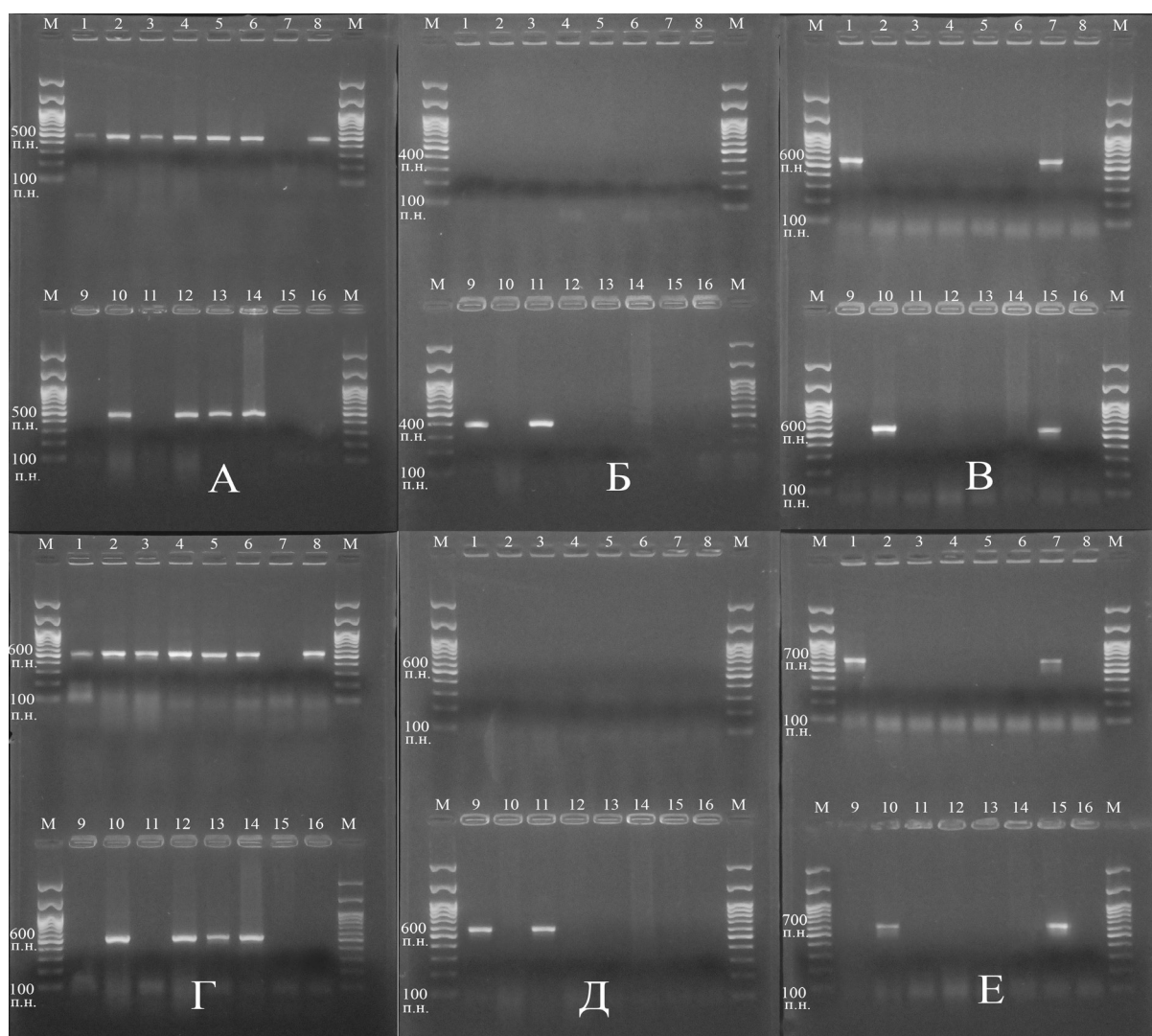


Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов *A. vitis* тест-системами по определению типа Ti-плазмиды: **А** – OCTF/OCTR (целевой фрагмент 475 п.н.); **Б** – NOPF/NOPR (394 п.н.); **В** – VisF/VisR (561 п.н.); **Г** – TF/TR (520 п.н.); **Д** – NF/NR (570 п.н.); **Е** – SF/SR (620 п.н.). Анализируемые образцы из: 1 – поселок Абрау-Дюрсо, 2 – село Молдаванское; 3 – поселок Сенной; 4 – станица Старотитаровская; 5 – хутор Копанской; 6 – хутор Усатова балка; 7 – город Горячий ключ; 8 – станица Красносельская; 9 – станица Гагатаевская; 10 – станица Натухаевская; 11 – станица Старовеличковская; 12 – хутор Колосистый; 13 – хутор Северный; 14 – село Тамань; 15 – хутор Северный. 16 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь без ДНК). М – маркер веса

полученные результаты, был амплифицирован целевой продукт (520 п.н.) в тех же образцах (рис. 2Г).

С помощью тест-системы NOPF/NOPR целевой фрагмент (394 п.н.) идентифицирован в 13,5% исследуемых образцов, в этих же вариантах маркером NF/NR также выявили целевые фрагменты (570 п.н.), что подтверждает наличие Ti-плазмиды нопалинового типа (рис. 2Б, рис. 2Д).

С использованием тест-систем VisF/VisR к *Vis*-гену и SF/SR к *6b*-гену *A. vitis*, согласно литературным данным, могут быть идентифицированы патогенные агробактерии, несущие витопиновую Ti-плазмиду. Указанными тест-системами были проанализированы все 76 образцов (рис. 2В, 2Е). В образцах, собранных в четырех хозяйствах, обнаружили целевые

фрагменты данных генов по результатам ПЦР-анализа (27% образцов). Кроме того, 10 образцов (13,5%) из двух хозяйств (поселок Абрау-Дюрсо и станица Натухаевская) показали наличие целевых фрагментов всех исследуемых генов, т.е. они несут Ti-плазмиды октопинового и витопинового типа.

Таким образом, в девяти из четырнадцати хозяйств образцы содержат целевые фрагменты генов *virF*, *6b* и октопинсинтазного гена, характерные для штаммов *A. vitis* с Ti-плазмидой октопинового типа. В образцах из двух хозяйств (станция Натухаевская и поселок Абрау-Дюрсо) обнаружены агробактерии с фрагментами генов *virD2*, *6b*, а также витопинсинтазного гена витопиновой Ti-плазмиды *A. vitis* вместе с фрагментами генов *virF*, октопинсинтазного и *6b*, что говорит о наличии

Таблица

Генетическая характеристика агробактерий, паразитирующих на виноградниках Краснодарского края

Анализируемые образцы				Тест-системы									
Место сбора	Кол-во, год отбора	Сорт	Происхождение посадочного материала	VirD2A/ VirD2F	PG	VIRF	VIRD2S4	T	N	S	OCT	NOP	Vis
Образцы, содержащие Ti-плазмиду октопинового типа													
Темрюкский район, станица Старотитаровская	4, 2016	Совиньон блан, Каберне-Совиньон	Сербия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Темрюкский район, поселок Сенной	4, 2016	Аттика	Италия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Темрюкский район, село Тамань	4, 2017	Цвайгель, Алиготе, Ркацителы, Молдова	Австрия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Анапский район, хутор Усатова балка	5, 2016	Молдова, Бархатный	Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Крымский район, село Молдаванское	4, 2017	Рислинг, Шардоне, Совиньон блан, Коломбар	Франция	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Динской район, станица Красносельская	4, 2016	Преображение, Тасон, Низина	Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
город Краснодар, хутор Копанской	6, 2016	Каберне-Совиньон, ТАНА	Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
город Краснодар, поселок Колосистый	5, 2017	Аттика, Марадона	Италия, Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
город Краснодар, поселок Северный	4, 2017	Кишмиш молдавский, Страшенский	Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Образцы, содержащие Ti-плазмиду нопалинового типа													
Анапский район, станица Гастагаевская	6, 2017	Мерло, Каберне-Совиньон	Австрия	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Калининский район, станица Старовеличковская	10, 2016	Мерло, Шардоне, Каберне Фран, Каберне-Совиньон, Морава	Сербия	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Образцы, содержащие Ti-плазмиду витопинового типа													
Горячий ключ	5, 2017	Баклановский, Восторг идеальный	Россия	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
город Краснодар, поселок Северный	4, 2017	Ромулус, Августин	Болгария	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Образцы, содержащие Ti-плазмиду октопин-витопинового типа													
Анапский район, станица Натухаевская	6, 2017	Мерло, Сира	Сербия	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
город Новороссийск, поселок Абрау-Дюрсо	5, 2017	Пино Нуар	Австрия	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+

Ti-плазмиды витопин/октопинового типа у данных агробактерий. В образцах из хозяйства в городе Горячий ключ и в окрестностях города Краснодар были обнаружены целевые фрагменты генов *virD2*, *6b* и витопинсинтазного, но не обнаружены фрагменты генов *virF*

и октопинсинтазного, что указывает на наличие Ti-плазмиды только витопинового типа (таблица). ДНК-анализ образцов из станицы Гастагаевская и станицы Старовеличковская выявил в них наличие всех исследуемых генов

(*virF*, нопаинсинтазный, *bb*), относящихся к нопаинового типу Ti-плазмиды.

Согласно полученным данным, все исследуемые нами образцы агробактерий, обнаруженные на пораженных бактериальным раком растениях винограда, можно разделить на 4 группы по типу содержащихся в них Ti-плазмид: октопиновые (59,5 %), октопин-витопиновые (13,5%), витопиновые (13,5%) и нопаинового (13,5%).

В 100% изученных образцов ДНК, выделенных из опухолевидных наростов бактериального рака винограда, был выявлен фрагмент гена *pehA*, встречающийся только у агробактерий вида *A. vitis*. Полученные нами данные свидетельствуют о принадлежности агробактерий, паразитирующих на виноградниках Краснодарского края, к виду *A. vitis*, что согласуется с результатами исследований ученых из Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, которые занимались подобной проблемой в Крыму [35].

Результаты проведенных ДНК-анализов показывают преобладание *A. vitis*, содержащей плазмиду октопинового типа (59,5%), над изо-

лятами, содержащими плазмиды витопин-октопинового (13,5%), витопинового (13,5%), нопаинового (13,5%) типов на виноградниках Краснодарского края.

Анализ происхождения посадочного материала растений винограда, на которых были обнаружены опухоли бактериального рака, не выявил четких зависимостей в различии выявленных типов агробактерий и страны происхождения посадочного материала. Можно отметить незначительное превалирование агробактерий, несущих плазмиды октопинового типа, в насаждениях из посадочного материала из Италии и Сербии, витопинового и октопин-витопинового типов — из Болгарии и Австрии, нопаинового типа — из Сербии и Австрии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-34-00827 мол_а).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gelvin S.B. Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. Vol. 67. N 1. P. 16–37.
2. Tarbah F.A., Goodman R.N. Rapid detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis for an efficient indexing system // Plant Dis. 1986. Vol. 70. P. 566–568.
3. Бурдинская В.Ф., Арестова Н.О. Латентная зараженность винограда бактериальным раком // Защ. карант. раст. 2010. № 10. С. 38–39.
4. Kerr A., Panagopoulos C.G. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control // J. Phytopathol. 1977. Vol. 90. N 2. P. 172–179.
5. Ophel K., Kerr A. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines // Int. J. Syst. Bacteriol. 1990. Vol. 40. N 3. P. 236–241.
6. Mousavi S.A., Osterman J., Wahlberg N., Nesme X., Lavire C., Vial L., Paulin L., de Lajudie P., Lindstrom K. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov // Syst. Appl. Microbiol. 2014. Vol. 37. N 3. P. 208–215.
7. Ramírez-Bahena M.H., Vial L., Lassalle F., Diel B., Chapulliot D., Daubin V., Nesme X., Muller D. Single acquisition of protelomerase gave rise to speciation of a large and diverse clade within the *Agrobacterium/Rhizobium* supercluster characterized by the presence of a linear chromid // Mol. Phylogenet. Evol. 2014. Vol. 73. P. 202–207.
8. Slater S.C., Goldman B.S., Goodner B. et al. Genome sequences of three agrobacterium biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria // J. Bacteriol. 2009. Vol. 191. N 8. P. 2501–2511.
9. Szegedi E. Opines in naturally infected crown gall tumors // Vitis. 2003. Vol. 42. N 1. P. 39–41.
10. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. N 8. P. 2879–2884.
11. Матвеева Т.В., Богомаз Д.И., Лутова Л.А. Способ диагностики биоматериалов на наличие в них агробактерий. Патент РФ на изобретение № 2458142. Дата публ.: 10.08.12. Бюл. №22/12.
12. Puławska J., Willems A., Sobiczewski P. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex

PCR // Syst. Appl. Microbiol. 2006. Vol. 29. N. 6. P. 470–479.

13. Sawada H., Ieki H., Matsuda I. PCR detection of Ti and Ri plasmid from phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. N 2. P. 828–831.

14. Suzuki K., Yoshida K., Sawada H. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers // J. Gen. Plant. Pathol. 2004. Vol. 70. N 6. P. 342–347.

15. Bini F., Kuczmog A., Putnoky P. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens* // Vitis. 2008. Vol. 47. N 3. P. 181–190.

16. Eastwell K.C., Kenneth C., Leslie Willis G., Cavileer D.T. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction // Plant Dis. 1995. Vol. 79. N 8. P. 822–827.

17. Herlache T.C., Hotchkiss A.T., Burr T.J., Collmer A. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologous enzymes from *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. N 1. P. 338–346.

18. Kawaguchi A., Sawada, H., Inoue, K., Nasu H. Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains // J. Gen. Plant Pathol. 2005. Vol. 71. N 1. P. 54–59.

19. Lim S.H., Kim J.G., Kang H.W. Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains // Microbiol. Res. 2009. Vol. 164. N. 4. P. 451–460.

20. Canaday J., Gerard J.C., Crouzet P., Otten L. Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4 // Mol. Gen. Genet. 1992. Vol. 235. N 2–3. P. 292–303.

21. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // Vitis. 2002. Vol. 41. N 1. P. 37–42.

22. Szegedi E., Bottka S., Mikulás J., Otten L., Sule S. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine // Vitis. 2005. Vol. 44. N 1. P. 49–54.

23. Bini F., Geider K., Bazzi C. Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel *virD2* gene-specific primers that discriminate two subgroups // Eur. J. Plant Pathol. 2008. Vol. 122. N 3. P. 403–411.

24. Argun N., Momol M.T., Maden S., Momol E.A., Reid C.L., Celek H., Burr T.J. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from Turkish grape cultivars in the

Central Anatolia region // Plant Dis. 2002. Vol. 86. N 2. P. 162–166.

25. Lamovšek J., Zidarič I., Pleško I.M., Urek G., Trdan S. Comparative study of diagnostic methods used for monitoring of common grape vine (*Vitis vinifera* L.) crown gall (*Agrobacterium vitis* Ophel & Kerr) in Slovenia // Acta Agric. Slov. 2015. Vol. 103. N 2. P. 313–321.

26. Genov I., Atanassov I., Tsvetkov I., Atanassov A. Isolation and characterization of *Agrobacterium* strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes, *V. vinifera* ssp. *Silvestris* // Vitis. 2015. Vol. 45. N 2. P. 97–101.

27. Winans S.C., Allenza P., Stachel S.E., McBride K.E., Nester E.W. Characterization of the *virE* operon of the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 // Nucleic Acids Res. 1987. Vol. 15. N 2. P. 825–837.

28. Tolba I.H., Zaki M.F. Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt // Ann. Agric. Sci. 2011. Vol. 56. N 2. P. 113–119.

29. Kuzmanović N., Gašić K., Ivanović M., Prokić A., Obradović A. Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia. Arch. Biol. Sci. 2012. Vol. 64. N 4. P. 1487–1494.

30. Rouhrazi K., Rahimian H. Characterization of Iranian grapevine isolates of *Rhizobium* (*Agrobacterium*) spp. // J. Plant Pathol. 2012. Vol. 94. N 3. P. 555–560.

31. Filo A., Sabbatini P., Sundin G.W., Zabadal T.J., Safe G.R., Cousins P.S. Grapevine crown gall suppression using biological control and genetic engineering: a review of recent research // Am. J. Enol. Vitic. 2013. Vol. 64. N. 1. DOI 10.5344/ajev.2012.12038.

32. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue // Phytochem. Bull. 1987. Vol. 19. P. 11–15.

33. Makarkina M.V., Il'nitskaya E.T., Stepanov I.V. Identification of *Agrobacteria* on grape plants with symptoms of crown gall lesions in ampelocenoses of Krasnodar Territory using the PCR method // Russ. Agric. Sci. 2017. Vol. 43. N 5. P. 402–405.

34. Макаркина М.В., Ильницкая Е.Т. Определение латентной стадии бактериального рака винограда методом полимеразной цепной реакции // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. Т. 13. Краснодар, 2017. С. 100–104.

35. Ignatov A.N., Khodykina M.V., Vinogradova S.V., Polityko V.A., Kornev K.P., Mazurin E.S. First report of *Agrobacterium vitis*

causing crown galls of wine grape in Russia // Plant Dis. 2016. Vol. 100. N. 4. P. 853.

Поступила в редакцию

27.09.2018

Поступила после доработки

14.01.2019

Принята в печать

18.01.2019

RESEARCH ARTICLE

PCR IDENTIFICATION OF PATHOGENIC AGROBACTERIES DETECTED ON VINEYARDS OF KRASNODAR TERRITORY BY THE TYPE OF CONTAINED Ti PLASMIDS

M.V. Makarkina*, E.T. Ilnitskaya, S.V. Tokmakov

North-Caucasian federal scientific center of horticulture, viticulture, wine-making, 40 years of Victory street, 39, Krasnodar, 350901, Russia

**e-mail: konec_citatu@mail.ru*

Agrobacterium vitis and some strains of *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes* cause a dangerous chronic disease on grape plants — crown gall. Using molecular genetic methods, work has been carried out to identify and study the diversity of pathogenic agrobacteria that cause crown gall in the vineyards of the Krasnodar Territory. 76 samples of young and lignified tumor-like outgrowths of crown gall of grapes collected from plants in fourteen vineyards of the Krasnodar Territory and having a different origin of planting material (Italy, France, Austria, Serbia, Bulgaria, Russia) were used as material. In all studied samples, the presence of *A. vitis* was identified using the PGF/PGR test-system for DNA analysis. When studying the diversity of agrobacteria by the type of Ti plasmids contained therein, four groups were identified: containing octopine-type Ti plasmids (59.5%), octopine/vitopine (13.5%), vitopine (13.5%) and nopaline type (13.5%). The obtained data indicate that in the vineyards of the Krasnodar Territory crown gall of grapes is caused by agrobacteria *A. vitis*, mainly of the octopine type.

Keywords: *Agrobacterium vitis*, crown gall of grape, polymerase chain reaction, Ti plasmid, opine-types, test-systems

Сведения об авторах

Макаркина Марина Викторовна — мл. науч. сотр. лаборатории сортоизучения и селекции винограда Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. Тел.: 8-861-252-70-74; e-mail: konec_citatu@mail.ru

Ильницкая Елена Тарасовна — канд. биол. наук, зав. лабораторией сортоизучения и селекции винограда Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. Тел.: 8-861-252-70-74; e-mail: ilnitskaya79@mail.ru

Токмаков Сергей Вячеславович — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории генетики и микробиологии Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. Тел.: 8-861-252-70-74; e-mail: ad-a-m@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 - полустрочный), 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., Gavrillo 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 адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «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.
