

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16 **БИОЛОГИЯ**

Издательство Московского университета

№ 3 • 2013 • ИЮЛЬ–СЕНТЯБРЬ

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Физиология

- Молчанов А.Ю., Ивановская М.Г. Мелатонин и деторождение. Часть 1. Доимплантационный период и имплантация 3

Биохимия

- Сереженикова Н.Б., Зак П.П., Погодина Л.С., Трофимова Н.Н., Липина Т.В., Островский М.А. Субклеточные маркеры старения ретинального пигментного эпителия японского перепела *Coturnix japonica* 9
- Путляев Е.В., Смирнов А.А., Лазарева Е.А., Клинк Г.В., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Новый фитовирусный вектор для суперэкспрессии целевых белков в растении 17

Генетика

- Рожнов В.В., Пищулина С.Л., Мещерский И.Г., Симакин Л.В. О соотношении фенотипа и генотипа соболя и лесной куницы в зоне симпатрии на Северном Урале 23

Экология

- Рязанова Г.И., Пылыгалов А.С. Флуктуирующая асимметрия жилкования крыла у стрекоз *Ischnura elegans* (V.d. Lind.) (Odonata, Coenagrionidae) и перспективы использования ее в качестве биологического индикатора экологического состояния водоемов 27
- Чертопруд М.В., Палатов Д.М. Фауна и сообщества реофильного макробентоса восточной части Новосибирской области: эффекты крупномасштабного экотона 33

Фауна, флора

- Тиханков И.А. Анатомические особенности проводящей системы листьев *Lolium perenne* L., сформировавшиеся под влиянием гидразида малеиновой кислоты. 39
- Борисанова А.О., Малахов В.В. Строение покровов тела Kamptozoa на примере вида *Barentsia discreta* Busk, 1886 44
- Полевова С.В., Авраменко А.С. Морфология и ультраструктура современных и ископаемых спор папоротников порядка Shizaeales Schimp 48

CONTENTS

Physiology

- Molchanov A.Yu., Ivanovskaya M.G.* Melatonin and child-bearing. Part 1. Preimplantation period and implantation 3

Biochemistry

- Seryozhnikova N.B., Zak P.P., Pogodina L.S., Trofimova N.N., Lipina T.V., Ostrovsky M.A.* Subcellular aging markers of japanese quail *Coturnix japonica* retinal pigment epithelium (electron-microscopic investigation) 9
- Putlyaev E.V., Smirnov A.A., Lazareva E.A., Klink G.V., Karpova O.V., Atabekov I.G.* New phytoviral vector for superexpression of target proteins in plants 17

Genetics

- Rozhnov V.V., Pishchulina S.L., Meschersky I.G., Simakin L.V.* On the phenotype correlation of sable and pine marten in sympatric zone in the Northern Urals 23

Ecology

- Ryazanova G.I., Polygalov A.S.* Fluctuating asymmetry of wing venation in damselflies *Ischnura elegans* (V.d. Lind) (Odonata: Coenagrionidae) and prospects of its use as a biological indicator of ecological quality of fresh-water reservoirs. 27
- Chertoprud M.V., Palatov D.M.* Macroscale ecoton effects for the stream macrobenthic fauna and communities of the east Novosibirsk region 33

Fauna, Flora

- Tikhankov I.A.* Anatomical peculiarities of vascular system of *Lolium perenne* L., leaves, growing under maleic hydrazide influence 39
- Borisanova A.O., Malakhov V.V.* Integument of Kamptozoan *Barentsia discreta* Busk, 1886 . . . 44
- Polevova S.V., Avramenko A.S.* Morphology and ultrastructure of modern and fossil spores in order Schizaeales Schimp 48

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 57.052

**МЕЛАТОНИН И ДЕТОРОЖДЕНИЕ.
ЧАСТЬ 1. ДОИМПЛАНТАЦИОННЫЙ ПЕРИОД И ИМПЛАНТАЦИЯ****А.Ю. Молчанов, М.Г. Ивановская****(кафедра эмбриологии, e-mail:img@genebee.msu.su)*

Мелатонин (М) — гормон, вырабатываемый у наземных позвоночных и человека в эндокринной железе — эпифизе. Установлено, что одной из основных функций М является синхронизация работы всех органов, регуляция сезонных и суточных ритмов их физиологической активности. Функция синхронизации и ритмовождения осуществляется в соответствии с суточным ритмом экспрессии М, зависящим от продолжительности дня и ночи. М способен влиять на рост, развитие и физиологическую активность различных типов клеток подобно ростовым факторам, воздействуя на механизмы сигнальных путей и каскадов. Подтверждено, что процессы зачатия, беременности и деторождения напрямую зависят от ритма и профиля секреции эпифизарного гормона М в организме. В данном обзоре предпринята попытка объединить имеющиеся литературные данные об участии М в различных физиологических процессах в течение доимплантационного и постимплантационного периодов жизни организма, его позитивном и негативном воздействии на этапах полового созревания.

Ключевые слова: мелатонин, беременность, гаметогенез, оплодотворение, имплантация.

Мелатонин (М) — гормон, вырабатываемый у наземных позвоночных и человека в эндокринной железе — эпифизе. Установлено, что одной из основных функций М является синхронизация работы всех органов организма, регуляция сезонных и суточных ритмов их физиологической активности. М способен влиять на рост, развитие и физиологическую активность различных типов клеток, подобно ростовым факторам, воздействуя на механизмы сигнальных путей и каскадов. Функция синхронизации и ритмовождения осуществляется в соответствии с суточным ритмом экспрессии М, зависящим от продолжительности дня и ночи. Максимальный уровень экспрессии М приходится на ночные часы (с 23:00 до 5:00), минимальный — на утренние часы. Различие концентраций достигает одного порядка. Биологический предшественник М — серотонин — накапливается в эпифизе в течение всего светового дня и не секретируется в кровь. В ночные часы клетки эпифиза — пинеалоциты — с помощью специфических ферментов превращают серотонин в М.

На мембранах практически всех клеток обнаружены рецепторы к М. В настоящее время все чаще его называют самым сильным природным антиоксидантом, иммуномодулятором и регулятором клеточной активности, а также важнейшим звеном в физиологии репродукции и эмбриологии человека и животных. Подтверждено, что процессы зачатия, беремен-

ности и деторождения напрямую зависят от ритма и уровня секреции гормона мелатонина в организме. В данном обзоре предпринята попытка объединить имеющиеся в литературные данные об участии М в различных физиологических процессах в течение доимплантационного и постимплантационного периодов, позитивных и негативных эффектов действия М на этапы полового созревания, гаметогенеза, оплодотворения и имплантации (первая часть обзора), а также его эффект на различные этапы беременности и роды (вторая часть обзора).

Половое созревание

Половое созревание (пубертация) — сложный процесс комплексных изменений в организме человека, вследствие которых он становится способным к продолжению рода. Половое созревание запускается с помощью гормональных сигналов из отделов промежуточного мозга к половым железам: яичкам у мальчиков и яичникам у девочек, образуя гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось (ГГГ ось). ГГГ ось активна в течение эмбрионального периода вплоть до момента рождения. Но от момента рождения до 10—12-летнего возраста остается неактивной. Ее активация соответствует началу полового созревания человека. Реактивация ГГГ оси проявляет себя как восстановление активного синтеза гонадотропного релизинг-гормона (ГТРГ), увеличение секреции

*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва.

лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) передней доли гипофиза. М влияет на процессы реактивации и последующей активности. Доказано, что в препубертатный период (до полового созревания) концентрация М слишком велика и запуск гипоталамической активности невозможен [1]. Однако на 9—10-м году жизни концентрация М в сыворотке крови человека понижается до 500 фмоль/мл, а количество рецепторов к М в клетках гипофиза уменьшается. Благодаря этому запускается триггерный сигнал к началу развития процессов пубертации [2].

Возрастное понижение концентрации М не зависит от увеличения массы тела, но напрямую связано с общим развитием организма [3]. Сейчас стало ясно, что высокая концентрация М у детей приводит к недостаточной секреции гонадотропина, гипофункции и слабому развитию яичников [4]. Высокая ночная концентрация М обнаружена у детей с запаздывающим половым созреванием по сравнению с нормой [5], в то же время низкий уровень М обнаружен у детей с ранним половым созреванием [4].

М адаптирует секрецию гонадотропина и пролактина в соответствии с суточным фотопериодом [6, 7]. Генная экспрессия и пульсирующая секреция ГТРГ, контролирующего секрецию ЛГ и ФСГ, регулируются М и обладают цикличностью в 24 часа [8]. У женщин, в крови которых была обнаружена высокая концентрация М, наблюдалось ослабление функции гипоталамуса (гипоталамическая аменорея) с пониженным уровнем пульсирующей секреции ГТРГ [14] и ЛГ [9], что в свою очередь влияет на состояние фолликулов [10, 11]. Благодаря высокому распространению специфических рецепторов и сайтов связывания М на клеточной и ядерной мембранах многие клетки и ткани могут координировать свою работу согласно изменению концентрации этого гормона. Из последних работ стало известно, что М, присутствующий и в органах женского репродуктивного тракта, участвует также в понижении степени окислительного стресса в фолликулах яичников и защищает ооциты от повреждающего действия свободных радикалов [12, 13]. Уровень концентрации М в крови имеет также и сезонные колебания: максимум в конце осени, зимой и минимум в летние месяцы, что накладывает свой отпечаток на сезонные колебания фертильности женщины [14].

Гаметогенез

Гаметогенез, или предзародышевое развитие, — процесс созревания половых клеток, или гамет. Процесс созревания и формирования подвижных сперматозоидов в семенниках принято называть — *сперматогенезом*. Оогенез — процесс роста и созревания яйцеклетки в яичниках.

Процесс гаметогенеза также протекает под контролем гормонов ГГГ оси и специализированных фолликулярных клеток гонад. В отсутствие гормональной

стимуляции развитие и созревание гамет не происходит. Основными гормонами гаметогенеза являются ФСГ, ЛГ, тестостерон, прогестерон, эстроген.

Процесс гаметогенеза сопряжен с интенсивными процессами клеточной смерти (апоптоза) и клеточной пролиферации, что в свою очередь является источником образования большого количества активных форм кислорода (АФК). Но среда развития клеток является относительно изолированной (в семенниках развитие сперматозоидов протекает в компартментах клеток Сертоли, а в яичниках — внутри фолликула), так что она резко нуждается в антиоксидантах (энзимах и простых веществах). В данных условиях именно М является наиболее оптимальным веществом-антиоксидантом, так как его окисленные метаболиты уже не способны к окислению других веществ [14].

Установлено, что в физиологической концентрации (20—200 фМ/мл) М оказывает положительное действие на созревание и развитие гамет, а также на их активность, жизнеспособность и сохранность генетического материала [12]. Сохранность генетического материала обоих типов гамет, а также подвижность сперматозоидов повышаются за счет мягкой антиоксидантной и пролиферативной функций эпифизарного гормона. М участвует в контроле сезонных изменений роста, развития и созревания фолликулов, транслируя информацию об изменениях суточного фотопериодизма [15]. Активируя или ингибируя МАРК-каскад, М регулирует восприимчивость фолликулярных клеток к гонадотропинам. В данном случае эпифизарный гормон выполняет свою биоритмологическую и пролиферативную функции.

Противодействуя возрастанию уровня окислительного стресса, М повышает качество ооцитов и приводит к увеличению уровня оплодотворения и имплантации эмбриона. Изучение состава фолликулярной жидкости показало, что высокий уровень деградации ооцитов целиком коррелирует с повышенным содержанием 8-оксоГ (8-гидрокси-2-диоксигуанозина) в этой жидкости.

За счет своих иммуномодулирующей и пролиферативной функций М поддерживает способность эндометрия к имплантации [16]. Действуя через цАМФ-сигналинг, эпифизарный гормон опосредованно задействован в комплексной регуляции ритмичности и амплитуды сокращения миометрии. М регулирует сезонные и суточные колебания сексуальной активности и фертильности женщины.

В работе мужской половой системы М играет роль суточного и сезонного координатора активности сперматогенеза. Как на мембране гранулезных клеток фолликулов, так и на клетках Лейдига (источник тестостерона) и Сертоли и эпидидимуса обнаружены рецепторы М — МТ₁ и МТ₂ [17]. М, влияя на пероксидазную активность сперматозоидов, способен продлевать время подвижности сперматозоидов *in vitro*, снижая их активность [18]. Длительное применение М, повышая локальный баланс тестос-

стерона/ E_2 , наоборот, приводит к образованию менее жизнестойких сперматозоидов с повышенном уровнем аномалий [19]. М определяет пики экспрессии и секреции половых гормонов. На примере мышей, нокаутных по генам рецепторов к М, показано, что именно он влияет на суточную экспрессию тестостерона, эстрадиол-17 β и пролактин. М оказывает отрицательное воздействие на злокачественное перерождение клеток простаты [20].

Учитывая результаты многих работ по эмбриогенезу, можно заключить, что положительное влияние М на гаметогенез обусловлено его участием в блокировании деструктивного воздействия АФК на генетический материал гамет. Причем действие М заключается в прямой реакции нейтрализации активных радикалов кислорода и азота, накапливающихся в клетке. Регуляторная роль М осуществляется за счет его связывания с рецепторами, моделирующими уровень экспрессии различных генов, вовлеченных в гаметогенез.

Доимплантационный период

Оплодотворение — слияние мужской и женской гамет, объединение генетического материала и образование зиготы. Оплодотворение в норме происходит в дистальном конце трубы через несколько часов после овуляции.

Важно отметить, что овуляция происходит именно в ночные часы, когда концентрация М в плазме крови максимальна. На этапе миграции гаметы максимально подвержены возможным негативным воздействиям токсичных агентов, таких, как никотин, алкоголь, лекарственные средства, элементы бытовой химии. Максимальный уровень М, по-видимому, необходим для сохранности генетического материала в ночные часы [18]. Слияние же гамет приходится на время максимальной концентрации эстрогена, т.е. на 15:00—18:00 ч, и минимальной концентрации М.

Показано, что М в дозе 100 пМ/мл понижает уровень активных форм кислорода АФК, что проявляет себя в пролонгированном этапе культивирования партеногенетических бластоцист свиньи, сперматозоидов млекопитающих и человека в обычной среде и среде с добавлением перекиси водорода в летальной концентрации. ПЦР (полимеразная цепная реакция) анализ показал, что уровень экспрессии гена Bcl-xl и Oct-4 значительно выше, а Вах ниже в клетках особей, культивируемых в среде с добавлением одновременно и источников АФК, и мелатонина, чем в контрольной группе.

Защитная функция М подтверждается следующими экспериментами. Установлено, что при культивировании эмбрионов мышей до созревания в среде с содержанием перекиси водорода (конц. H_2O_2 — 300 мкл/мл), вызывающей окислительный стресс и накопление 8-оксоG, развитие эмбриона блокирует-

ся. Но при добавлении М в ту же среду блок развития не возникает [21].

Имплантация — внедрение эмбриона в слизистую матки человека. Имплантация начинается примерно через 6—8 дней после оплодотворения, когда трофобласт контактирует с эндометрием и высвобождаются протеолитические ферменты. Данные о влиянии М на процесс имплантации немногочисленны.

Есть сведения о том, что М способен участвовать в подготовке эндометрия благодаря установлению необходимого гормонального статуса, определять сезонность возрастания и угасания рецептивной способности эндометрия, что особенно ярко выражено на примере сезонно размножающихся животных.

У женщин М координирует и регулирует ритмику гормонального статуса как в течение суток, так и в течение всего менструального цикла [22]. М способен напрямую влиять на клетки органов женского репродуктивного тракта (клетки эндометрия) и регулировать секрецию половых стероидных гормонов у млекопитающих [23], в том числе и у людей [15, 24]. Контроль над состоянием эндометрия М осуществляет в течение всего цикла, с момента начала менструации на фолликулярной стадии и до конца лютеиновой фазы [22].

Феномен, известный как менструация, главным образом эндометриальное событие, запускаемое снижением концентрации прогестерона. Природа данного явления и биохимические основы изменений, происходящих в эндометрии во время менструации, понятны лишь частично. Но нельзя отрицать того, что во второй стадии фолликулярной фазы происходит вспышка пролиферативной активности клеток эндометрия и их подготовки к процессу имплантации эмбриона. В данном процессе участвуют факторы роста EGF (эпидермальный фактор роста), VGF (фактор роста сосудов) и другие цитокины и простагландины, на синтез которых также влияет М.

Концентрация М в течение менструального цикла не одинакова [25]. Она претерпевает значительные изменения. У женщин, достигших половой зрелости, вплоть до периода менопаузы, утренние концентрации М значительно ниже в лютеиновую фазу по сравнению с фолликулярной [26]. М корректирует как секрецию гормонов ГТРГ, ФСГ, ЛГ, эстрогена, прогестерона и др., так и модулирует трансдукцию сигнала данных гормонов в органах-мишенях (ядра гипоталамуса, клетки эндометрия, клетки коркового слоя надпочечников и клетки гранулёзы), тем самым координируя и регулируя ритмику клеточной активности.

У пациенток с выраженным предменструальным дистрофическим синдромом (ПДС) наблюдался сдвиг в циклике суточной экспрессии М. Его ночная секреция была ниже и наступала раньше, чем у женщин с физиологически нормальным циклом. При этом амплитуда изменения концентрации эпифизарного гормона в течение дня также была ниже, чем у женщин контрольной группы [26]. В течение этого пе-

риода наблюдались осложнения общего характера, такие, как нарушение сна, изменения настроения, нарушение аппетита, снижение работоспособности. Недостаток М, связанный с тем, что человек работает в ночные часы, приводит к уменьшению продолжительности менструального цикла до 25 дней и меньше. Полное отсутствие пинеального М, наоборот, приводит к удлинению цикла.

В работе [27] показано, что М необходим для успешной имплантации эмбриона. На пинеалэктомизированных крысах установлено, что механизм такого воздействия может быть двойственным — за счет непосредственного действия М на рецепторы или же опосредованно через стероидные гормоны яичника и желтого тела. Подавляя секреторную функцию клеток, продуцирующих стероидные гормоны, М тем самым опосредованно увеличивает концентрацию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и пролактина. Кроме того, действуя на свои рецепторы, М регулирует суточную активность гипоталамо-гипофизарной оси, что в свою очередь синхронизирует развитие фолликула и эндометрия. Отклонение сроков овуляции является возможным следствием недостатка или полного отсутствия М в крови, что показано на пинеалэктомизированных крысах. Подтверждением тому служит нормализация ритмики при введении эндогенного М. Безусловно, в данных процессах М оказывает необходимое воздействие на пролиферацию и дифференцировку гранулезных клеток и клеток эндометрия матки, а также на изменения концентрации эстрадиола (E_2), ФСГ, ГТРГ в крови.

Показано, что М участвует в установлении правильного баланса Т-хелперов первого и второго типа, что крайне необходимо для верного исполнения первой стадии имплантации, которая схожа с воспалительной реакцией [16]. Для того чтобы плод не был отторгнут в результате развития воспалительной стадии второго типа, необходимо преобладание Т-хелперов первого типа над Т-хелперами второго типа, что является нормальной ситуацией для организма. Нарушения же происходят в том случае, если происходит избыточный выброс простагландинов (что характерно для первых дней цикла) или наблюдается хроническая воспалительная реакция. М устанавливает баланс выработки простагландинов (предотвращая спонтанное сокращение миометрия матки) и влияет на работу тимусных клеток и лимфоцитов.

Одновременно М участвует в поддержании рецептивности эндометрия и жизнеспособности эмбриона за счет своих выраженных антиоксидантных свойств, предотвращая агрессивное воздействие активных радикалов на их клетки и ткани, ингибируя работу нитрооксид и супероксид синтаз [10, 11]. М в комплексе с другими антиоксидантами подавляет развитие некротических процессов на стадии разрушения эндотелия сосудов матки.

Иммуномодуляторная и антиапоптотическая роли М проявляются в основном через регуляцию активности Т-хелперов лимфоцитов (Th), NK-киллеров и

моноцитов. Прямое действие М на иммунную систему человека возможно благодаря присутствию особых участков связывания М на лимфоцитах [28], моноцитах [29] и гранулоцитах [30]. Th1/Th2-баланс цитокинов с доминированием Th2 является важным механизмом, предопределяющим имплантацию и выживание плода в матке матери [31]. Физиологически ритм М коррелирует с ритмичной Th1/Th2-баланса [32], и М стимулирует Th2-иммунную активность [33].

Данные о сезонных отличиях в уровне имплантации весьма противоречивы. При схожих результатах в одних работах [22] предполагают, что значительные сезонные изменения уровня имплантации и рецептивности эндометрия, по всей видимости, отсутствуют, в других [34], наоборот, корреляция четко прослежена и явно говорится о существовании благоприятного сезона, который приходится на период с декабря по февраль [34]. Однако повышение концентрации М в сыворотке крови человека независимо от способа обсчета полученных данных отмечено почти во всех работах, и его максимум приходится на декабрь, а этот период соответствует самой большой продолжительности ночи и максимальной суточной концентрации эпифизарного гормона. Следовательно, М, скорее всего, необходим для достижения высокого уровня имплантации.

В первой части обзора мы рассмотрели влияние мелатонина на гаметогенез, оплодотворение, имплантацию. Во второй части обзора нам предстоит изучить эффект эпифизарного гормона на механизмы беременности и деторождения.

Выводы

В настоящей статье мы попытались кратко описать роль М в работе половой системы человека в норме и патологии. Систему, адаптирующую организм человека к изменениям суточного освещения, образуют зрительная система, ядра гипоталамуса и эпифиз. Передача данного сигнала органам и тканям осуществляется эпифизарным эндокринным гормоном М, рецепторы к которому обнаружены почти на всех органах и тканях. Таким образом, информация о динамике изменений суточной и сезонной фотопериодичности поступает в клетки органов гипоталамо-гипофизарно-гональной оси и обеспечивает развитие адаптивных изменений функциональной активности.

М, безусловно, обладает полифункциональным спектром действия. Взаимодействуя с рецепторами на клеточной и ядерной мембране, М регулирует работу самой клетки и, проникая внутрь нее, способен самостоятельно реагировать с мишенью, выполняя антиоксидантную функцию или участвуя в трансдукции сигнала. М участвует в регуляции и координации физиологических процессов на всех уровнях организации — клеточном, органном и на уровне сис-

темы органов, в частности модулируя работу органов половой системы человека на всех этапах онтогенеза.

М способен регулировать репродуктивные процессы у человека — половое созревание, гаметогенез, оплодотворение, наступление беременности. Понижение концентрации гормона в ночное время и/или

нарушение профиля секреции М в течение суток негативно сказывается на репродуктивной способности человека — пубертации, имплантации эмбриона.

Влияние эпифизарного гормона М на механизмы беременности и деторождения нам предстоит изучить во второй части обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brzezinski A. Melatonin and human reproduction: why the effect is so elusive? // From molecules to therapy / Eds. S.R. Pandi-Perumal, D.P. Cardinali. Melatonin. N.Y.: Nova Science Publishers, 2007. P. 219—225.
2. Silman R.E. Melatonin and the human gonadotrophin-releasing hormone pulse generator // J. Endocrinol. 1991. Vol. 128. P. 7—11.
3. Waldhauser F., Boepple P.A., Schemper M., Mansfield M.J., Crowley W.F.Jr. Serum melatonin in central precocious puberty is lower than in age-matched prepubertal // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1991. Vol. 73. P. 793—796.
4. Cavallo A. Melatonin and human puberty. Current perspectives // J. Pineal. Res. 1993. Vol. 15. P. 115—121.
5. Cohen H.N., Hay I.D., Annesley T.M. Serum immunoreactive melatonin in boys with delayed puberty // Clin. Endocrinol. 1982. Vol. 17. P. 291—297.
6. Diaz Lopez B., Diaz Rodriguez E., Urquijo C., Fernandez Alvarez C. Melatonin influences on the neuroendocrine—reproductive axis // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005. Vol. 1057. P. 337—364.
7. Reiter R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions // Endocrinol. Rev. 1991. Vol. 12. P. 151—180.
8. Roy D., Belsham D.D. Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7 GnRH neurons: signal transduction mechanisms // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 251—258.
9. Waldhauser F., Weiszenbacher G., Frish H., Zeithuber V., Waldhauser M., Wurtman R.J. Fall in the nocturnal serum melatonin during prepuberty and pubescence // Lancet. 1984. Vol. 1. P. 362—365.
10. Ayre E.A., Wang Z.P., Brown G.M., Pang S.F. Localization and characterization of [125I] iodomelatonin binding sites in duck gonads // J. Pineal. Res. 1994. Vol. 17. P. 39—47.
11. Ayre E.A., Pang S.F. 2-[125I] Iodoelatonin binding sites in the testis and ovaries: putative melatonin receptors in the gonads // Biol. Signals. 1994. Vol. 3. P. 71—84.
12. Takasaki A., Nakamura Y., Tamura H., Shimamura K., Morioka H. Melatonin as a new drug for improving oocyte quality // Reprod. Med. Biol. 2003. Vol. 2. P. 139—144.
13. Tamura H., Takasaki A., Miwa I., Taniguchi K., Maekawa R., Asada H. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate // J. Pineal. Res. 2008. Vol. 44. P. 280—287.
14. Хронобиология и хрономедицина: Руководство / Под ред. С.И. Рапопорта, В.А. Фролова, Л.Г. Хетагуровой. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012. 480 с.
15. Woo M., Tai C.-J., Kang S., Nathwani P., Pang S., Leung P. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells // J. Clin. Endocrin. & Metab. 2008. Vol. 86. N 10. P. 4789—4797.
16. Chernyshov V.P., Tumanova L.E., Sudoma I.A., Bannikov V.I. Th1 and Th2 in Human IVF Pregnancy with Allogenic Fetus // Am. J. Reprod. Immunol. 2008. Vol. 59. N 4. P. 352—358.
17. Shiu S.Y.W., Li L., Wong J.T.Y., Pang S.F. Biology of G-protein coupled melatonin receptors in the epididymis and prostate of mammals // Chin. Med. J. 1997. Vol. 110. P. 648—655.
18. Luboshitzky R., Shen-Orr Z., Nave R., Lavi S., Lavie P. Melatonin administration alters semen quality in healthy men // J. Androl. 2002. Vol. 23. P. 572—578.
19. Luboshitzky R., Levi M., Shen-Orr Z., Blumenfeld Z., Herer P., Lavie P. Long-term melatonin administration does not alter pituitary-gonadal hormone secretion in normal men // Hum. Reprod. 2000. Vol. 15. P. 60—65.
20. Laudon M., Gilad E., Matzkin H., Braf Z., Zisapel N. Putative melatonin receptors in benign prostate tissue // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1996. Vol. 81. P. 1336—1342.
21. Tamura H., Takasaki A., Miwa I., Taniguchi K., Maekawa R., Asada H., Taketani T., Matsuoka A., Yamagata Y., Shimamura K., Morioka H., Ishikawa H., Reiter R.J., Sugino N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate // J. Pineal. Res. 2008. Vol. 44. N 3. P. 280—287.
22. Wunder D., Limoni C., Birkhäuser M. and the Swiss FIVNAT-Group. Lack of seasonal variations in fertilization, pregnancy and implantation rates in women undergoing IVF // J. Hum. Rep. 2005. Vol. 20. N 11. P. 3122—3129.
23. Tamura H., Nakamura Y., Takiguchi S., Kashida S., Yamagata Y., Sugino N. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster // J. Pineal. Res. 1998. Vol. 25. P. 135—141.
24. Nakamura Y., Tamura H., Takayama H., Kato H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production // Fertil. Steril. 2003. Vol. 80. P. 1012—1016.
25. Brzezinski A., Lynch H.J., Seibel M.M., Deng M.H., Wurtman R.J. The circadian rhythm of plasma melatonin during the normal menstrual cycle and in amenorrheic women // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1988. Vol. 66. P. 891—896.
26. Анисомов В.Н., Виноградов И.А. Старение женской репродуктивной системы и мелатонина. СПб.: Система, 2008. 44 с.
27. Dair E.L., Simoes R.S., Simoes M.J. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats // Fertil Steril (in press).
28. Garcia-Perga~neda A., Pozo D., Guerrero J.M., Calvo J.R. Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis-toxin sensitive G protein // J. Immunol. 1997. Vol. 159. P. 3774—3781.
29. Barjavel M.J., Mamdouh Z., Raghbati N., Bakouche O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes // J. Immunol. 1998. Vol. 160. P. 1191—1197.

30. Lopez-Gonzalez M.A., Calvo J.R., Segura J.J., Guerrero J.M. Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils // *Biotech. Ther.* 1993. Vol. 4. P. 253—262.
31. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface // *J. Reprod. Immunol.* 2001. Vol. 47. P. 87—103.
32. Petrovsky N., Harrison L. The chronobiology of human cytokine production // *Int. Rev. Immunol.* 1998. Vol. 16. P. 635—649.
33. Raghavendra V., Singh V., Kulkarni S.K., Agrewala J.N. Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists // *Mol. Cell. Biochem.* 2001. Vol. 221. P. 57—62.
34. Stolwijk A., Reuvers M., Hamilton C., Jongbloet P., Hollanders J., Zeilhuis G. Seasonality in the results of in-vitro fertilization // *Hum. Reprod.* 1994. P. 2300—2305.

Поступила в редакцию
10.10.12

MELATONIN AND CHILD-BEARING. PART 1. PREIMPLANTATION PERIOD AND IMPLANTATION

A.Yu. Molchanov, M.G. Ivanovskaya

Melatonin (M) — a hormone developed at land vertebrata and human in endocrine gland — pineal. It is established that one of the main functions M is synchronization of work of all bodies, regulation of seasonal and daily rhythms of their physiological activity. Function of synchronization and regulation of the rhythm is carried out according to a daily rhythm of an expression to the M depending on day and night length. The M is capable to influence growth, development and physiological activity of various types of cell is similar to growth factors, influencing mechanisms of signaling pathways and cascades. It is confirmed that processes of conception, pregnancy and child-bearing directly depend on a rhythm and a profile of secretion of a pineal hormone of M in an organism. In this review attempt to unite available in literary data of participation of M in various physiological processes during preimplantation and post-implantation periods of life of an organism is undertaken, its positive and negative effects on puberty stages, gametogenesis, fertilisation and implantation.

Key words: *melatonin, pregnancy, gametogenesis, fertilization, implantation.*

Сведения об авторах

Молчанов Александр Юрьевич — науч. сотр. кафедры эмбриологии МГУ. Тел.: 8-495-939-14-19; e-mail: img@genebee.msu.su

Ивановская Марина Григорьевна — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. Института физико-химической биологии им. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-916-693-51-72; e-mail: img@genebee.msu.su

БИОХИМИЯ

УДК 576.311:591.484.3:598.617.1

**СУБКЛЕТОЧНЫЕ МАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ
РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ
ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА *COTURNIX JAPONICA*****Н.Б. Серезникова, П.П. Зак*, Л.С. Погодина, Н.Н. Трофимова*,
Т.В. Липина, М.А. Островский****(кафедра клеточной биологии и гистологии, кафедра молекулярной физиологии;
e-mail: natalia.serj@yandex.ru)*

Методом электронной микроскопии с применением морфометрического анализа исследованы возрастные изменения пигментного эпителия сетчатки японского перепела, являющегося в настоящее время перспективной экспериментальной моделью ускоренного старения. Установлено, что наряду с накоплением гранул липофусцина и ультраструктурными изменениями мембраны Бруха маркерами старения ретинального пигментного эпителия являются изменения формы ядер и митохондрий (увеличение доли кольцевидных и гантелевидных митохондрий), снижение численности миеоидных телец и дезорганизация базальных отростков.

Ключевые слова: японский перепел, ретинальный пигментный эпителий, липофусцин, митохондрии, старение.

Старение — неизбежный процесс, характеризующийся нарушением физиологических функций, снижением адаптационных возможностей и повышением вероятности развития различных заболеваний. Возрастные нарушения зрения достаточно разнообразны, но одно из первых мест занимает поражение сетчатки [1]. Сохранение зрительных функций на уровне сетчатки во многом зависит от целостности клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ), выполняющего многочисленные специализированные функции по поддержанию гомеостаза сетчатки. РПЭ — это монослой пигментированных кубовидных клеток, обеспечивающих двусторонний транспорт веществ между фоторецепторами и капиллярами сосудистой оболочки [2]. Между самим РПЭ и сосудистой оболочкой расположена мембрана Бруха, фильтрующая растворы, диффундирующие между РПЭ и сосудистой оболочкой. Инволюционные изменения клеток РПЭ могут способствовать развитию серьезных глазных патологий, сопровождающихся значительным снижением зрения или даже его потерей [3, 4].

Медленное развитие процессов старения делает практически невозможными прижизненные наблюдения возрастных изменений сетчатки человека. В этой связи для моделирования процессов старения сетчатки и развития заболеваний глаз обычно используют лабораторных грызунов — мышей, крыс, кроликов. Наряду с ними в качестве удобной живот-

ной модели старения сетчатки сейчас рассматривается японский перепел *Coturnix japonica*. Эти мелкие домашние птицы имеют короткий срок жизни (1,5—2 года), и к 1,5 года в их РПЭ проявляются характерные возрастные изменения, присущие людям в возрасте 60—70 лет [5, 6]. Сетчатки перепела и человека имеют значительное морфологическое сходство и близкий оксикаротиноидный антиоксидантный обмен, отсутствующий у традиционных лабораторных грызунов, что придает дополнительную привлекательность данной животной модели. Вместе с тем возрастные изменения в сетчатке перепела, в том числе в РПЭ, особенно на ультраструктурном уровне, сейчас изучены не в полной мере. Известными субклеточными маркерами старения РПЭ как перепела, так и человека являются липофусциновые гранулы (ЛГ) [7, 8], однако их количественное измерение довольно трудоемко. В этой связи данная работа направлена на выявление других субклеточных маркеров старения РПЭ — демонстративных и вместе с тем доступных для измерений.

Материалы и методы

В работе были использованы самки японского перепела возрастом 9, 25, 39—40, 52 и 78 недель. Светоадаптированных птиц декапитировали, и энуклеированные глаза разрезали по линии *ora serrata* на глазной бокал, содержащий сетчатку с окружающими ее оболочками, и на роговичную часть с радужкой и

*ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва.

хрусталиком. Далее глазные бокалы разрезали радиально на узкие сегменты, сходящиеся от краев бокала к центру, из которых для дальнейшей работы использовались зоны центральной области.

Электронная микроскопия. Полученные кусочки глазных бокалов фиксировали в смеси 2,5%-го глютарового альдегида с 2%-м формалином на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) в течение 3–5 ч., дофиксировали раствором 1%-го OsO_4 2 ч., дополнительно контрастировали 2%-м спиртовым раствором уранилацетата, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, заливали в эпон 812. Для пространственной ориентировки материала на пиромитоме изготавливали поперечные срезы толщиной 2 мкм с центральных участков кусочков, окрашивали их 1%-м метиленовым синим. Ультратонкие срезы сетчатки с РПЭ контрастировали 2%-м уранилацетатом, а затем лимоннокислым свинцом по Рейнольдсу. Срезы просматривали в электронные микроскопы JEM-100В и JEM-1011 при увеличении $\times 8000$, $\times 15\,000$ и $\times 25\,000$.

Морфометрический анализ. На электронограммах с помощью программы “Image J” и квадратной тестовой решетки (площадь 64 мкм²) стандартным методом [9] определяли численную плотность и удельный объем профилей митохондрий, ЛГ, миелоидных

телец, фагосом на срезах ядросодержащей части клеток РПЭ, свободной от гранул меланина, т.е. на площади, на которой сосредоточены органеллы, ограниченной расстоянием 8 мкм от мембраны Бруха.

Для оценки апоптоза клеток РПЭ применяли метод TUNEL, выявляющий межнуклеосомные разрывы ДНК [10]. Кусочки глазных бокалов перепелов возрастом 25 и 52 недели фиксировали в 4%-м формалине на фосфатно-солевом буфере (PBS). Для окраски парафиновых срезов использовали набор “Apor-Tag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit” (Millipore). Меченые ядра РПЭ подсчитывали при увеличении 1500.

Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни в программе Statistica 5.5. Различия признавались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты электронно-микроскопического анализа свидетельствовали о выраженных изменениях в ультраструктуре клеток РПЭ по мере старения птиц (рис. 1).

Наиболее характерным оказалось увеличение количества гранулярных структур (рис. 1, Г), распола-

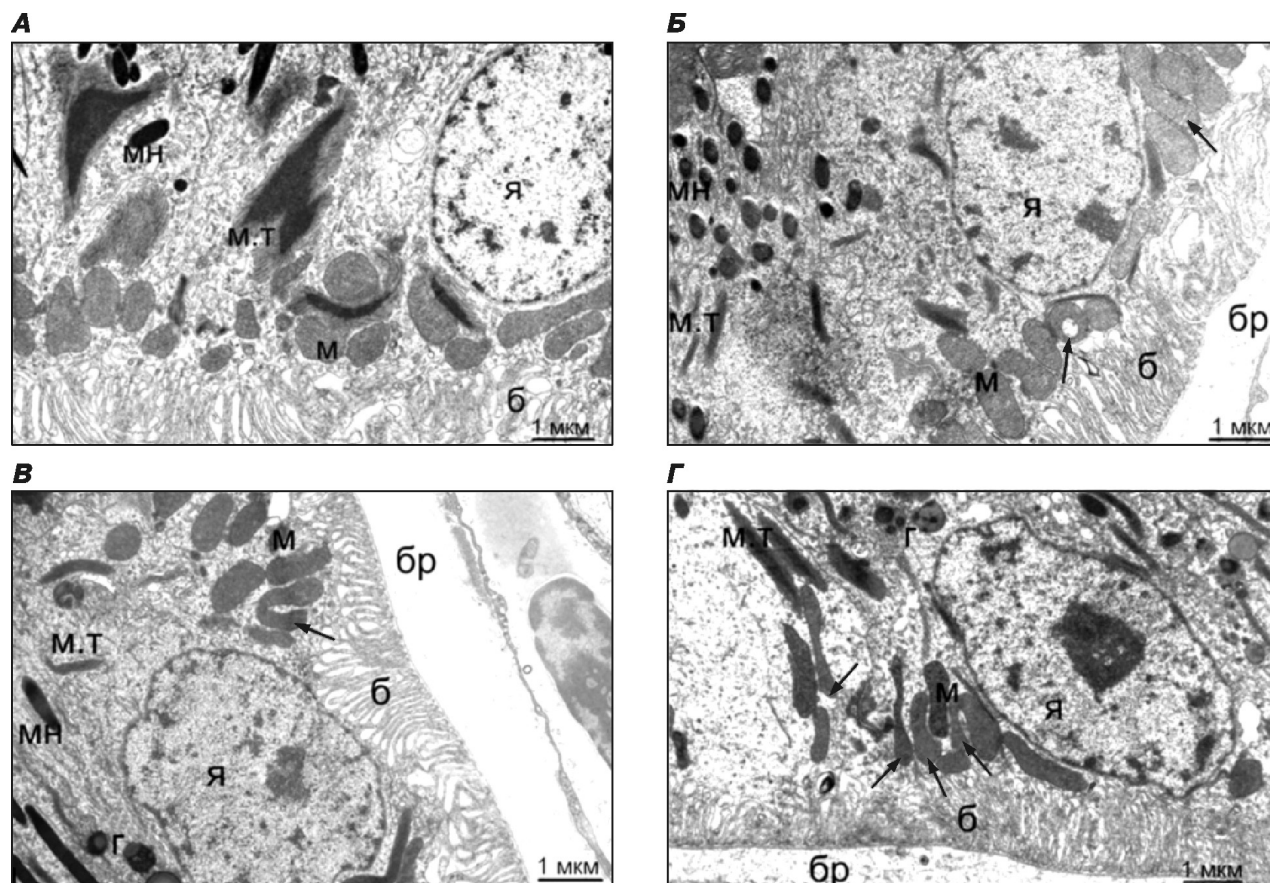


Рис. 1. Ультраструктура ядросодержащей части клеток РПЭ сетчатки перепела разного возраста: А — 9 недель, Б — 25 недель, В — 39–40 недель, Г — 52 недели;

я — ядро, мн — гранулы меланина, м — митохондрии, м.т — миелоидные тельца, г — гранулы разных типов, б — базальная складчатость плазмалеммы, бр — мембрана Бруха. Стрелками указаны кольцевидная и гантелевидные митохондрии

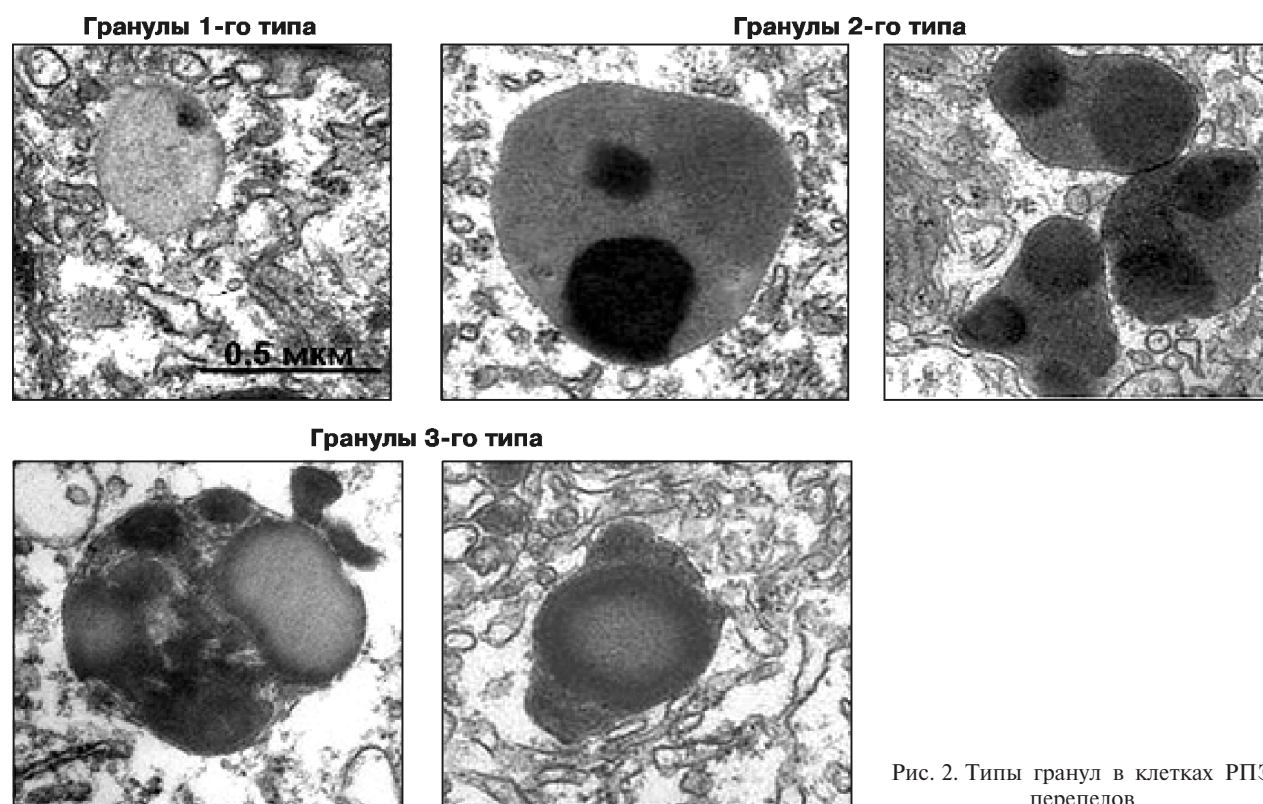


Рис. 2. Типы гранул в клетках РПЭ перепелов

гающихся преимущественно в ядросодержащем слое цитоплазмы. Эти структуры окружены одинарной мембраной и могут быть разной формы и размера. Их можно классифицировать на три типа (рис. 2): 1-й — небольшие округлые гранулы с однородным тонкозернистым содержимым средней электронной плотности; 2-й — более крупные гранулы с гетерогенным содержимым разной электронной плотности; 3-й — крупные гранулы смешанного строения с ограниченной темным ободком, светлой центральной частью и периферией с включениями разной

электронной плотности. Гранулы 1-го типа соответствовали по структуре лизосомам, описанным в РПЭ кролика [11]. Гранулы 2-го и 3-го типа, согласно литературным данным [7, 8, 12], представляют собой липофусцин. При этом гранулы 2-го типа, очевидно, являются “меланолипифусцином” — продуктом неполного переваривания разрушающегося меланина [7], а гранулы 3-го типа — зрелым липофусцином, поскольку именно они преобладают у старых перепелов. Морфометрический анализ (таблица) показал, что у перепелов в возрасте 39—40 не-

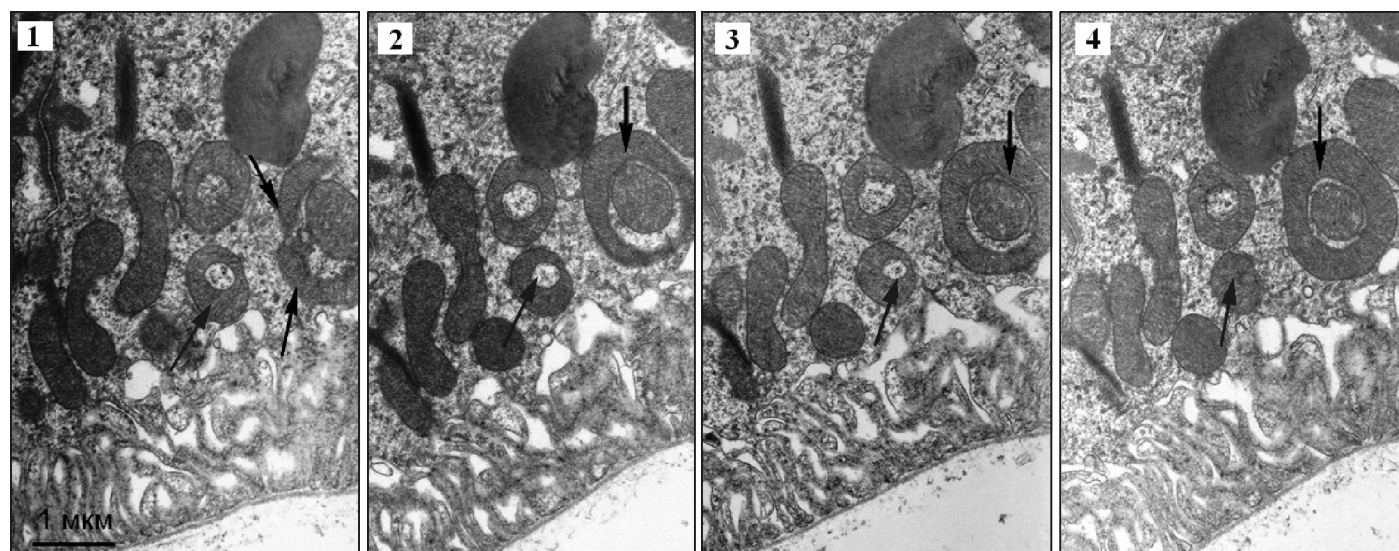


Рис. 3. Серийные срезы митохондрий в РПЭ перепела в возрасте 25 недель. Крупные стрелки указывают на кольцевидные митохондрии, а мелкие — на гантелевидные

**Морфометрический анализ ультраструктуры клеток РПЭ
у японских перепелов разного возраста**

Возраст перепелов (недели)	9	25	39—40	52	78
Гранулы					
Численная плотность (N_n) (число гранул на 100 мкм ² цитоплазмы)					
1-й тип	0,42 ± 0,20	0,20 ± 0,10	0,87 ± 0,30	0,00	0,47 ± 0,30
2-й тип	0,88 ± 0,20*	1,91 ± 0,40*	2,40 ± 0,40	1,55 ± 0,80	1,63 ± 0,50
3-й тип	0,42 ± 0,20	0,10 ± 0,10*	1,80 ± 0,60*	5,86 ± 1,90*	5,70 ± 0,90
Всех типов	1,72 ± 0,40	2,20 ± 0,40*	5,18 ± 0,70*	7,40 ± 1,40*	7,80 ± 0,90
Удельный объем (V_v), %					
1-й тип	0,21 ± 0,10	0,07 ± 0,10	0,00	0,00	0,00
2-й тип	0,30 ± 0,20*	0,83 ± 0,20*	0,62 ± 0,20	0,40 ± 0,30	0,71 ± 0,30
3-й тип	0,10 ± 0,10	0,14 ± 0,10	0,38 ± 0,20*	1,45 ± 0,60*	2,62 ± 0,70
Всех типов	0,64 ± 0,20	1,00 ± 0,20	1,00 ± 0,30	1,86 ± 0,50	3,09 ± 0,70
Митохондрии					
Численная плотность (N_n) (число митохондрий на 100 мкм ²)					
Измененная форма	3,35 ± 0,40	2,85 ± 0,30*	4,96 ± 0,50*	6,71 ± 0,70*	—
Всех типов	18,01 ± 0,90	16,70 ± 0,90	18,23 ± 1,04	16,71 ± 1,46	—
Удельный объем (V_v), %					
Измененная форма	2,92 ± 0,60	2,64 ± 0,40*	4,62 ± 0,70*	4,37 ± 0,70	—
Всех типов	10,5 ± 0,70	10,52 ± 0,70	11,71 ± 0,90	10,04 ± 1,26	—
Миелоидные тельца					
Численная плотность (N_n) (число миелоидных телец на 100 мкм ²)					
	8,68 ± 0,50*	12,04 ± 0,70*	8,00 ± 0,60*	7,92 ± 0,70	9,53 ± 0,80
Удельный объем (V_v), %					
	8,66 ± 0,60*	5,76 ± 0,60*	6,00 ± 0,60	5,02 ± 0,80	4,88 ± 0,80
Фагосомы					
Численная плотность (N_n) (число фагосом на 100 мкм ²)					
	1,13 ± 0,30	0,90 ± 0,20	1,12 ± 0,30	0,00	0,54 ± 0,30
Удельный объем (V_v), %					
	1,81 ± 0,50	2,12 ± 0,60	0,80 ± 0,30	0,00	0,60 ± 1,36

*Группы перепелов разного возраста, для которых различия показателей достоверны.

дель по сравнению с более молодыми птицами численная плотность (N_n) всех гранул возрастает в 2 раза, а у 52-недельных птиц — еще в 1,5 раза, при этом удельный объем (V_v) гранул остается постоянным. Соотношение гранул разных типов меняется по мере старения. Так, у 25-недельных птиц N_n и V_v гранул 2-го типа возрастают (в 2 и почти в 3 раза соответственно), а затем остаются постоянными; к 39—40 неделям увеличиваются N_n и V_v гранул 3-го типа (в 18 и 3 раза соответственно), и у птиц в возрасте 52 недели происходит дальнейшее увеличение этих показателей. В то же время показатели для гранул 1-го типа остаются неизменными на протяжении жизни.

При увеличении возраста птиц наблюдаются также выраженные изменения хондриома в клетках РПЭ. У молодых птиц митохондрии, как правило, имеют округлую или палочковидную форму; кристы ровные узкие или несколько расширенные; матрикс средней электронной плотности (рис. 1, А). У перепелов старшего возраста чаще встречаются необычные по форме митохондрии, имеющие на срезах вид колец или изогнутых гантелей, при этом их внутренняя структура такая же, как и у остальных митохондрий (рис. 1, Б—Г; 3). Такие видоизмененные митохондрии у птиц в возрасте 52 недели составляют 40,1% от общего числа митохондрий (при расчете

на 100 мкм² площади цитоплазмы), причем число гантелевидных митохондрий в 12 раз больше, чем кольцевидных (37,1% по сравнению с 3,1%) (таблица). Кольцевидные и гантелевидные митохондрии встречаются и в клетках РПЭ молодых птиц, но гораздо реже, составляя в среднем около 18,6% от общего числа митохондрий. Как показало изучение серийных срезов, профили кольцевидных и некоторых гантелевидных митохондрий, скорее всего, представляют собой сечения чашевидных митохондрий, хотя, видимо, существуют митохондрии и гантелевидной формы (рис. 3). По данным морфометрического анализа (таблица), к возрасту 39–40 недель N_n и V_v митохондрий измененной формы повышаются почти в 2 раза за счет гантелевидных митохондрий; N_n и V_v кольцевидных митохондрий с увеличением возраста не меняются. Примечательно, что V_v и N_n для всей совокупности митохондрий клеток РПЭ старых и молодых птиц сходны.

N_n миелоидных телец у перепелов в возрасте 25 недель увеличивается в 1,4 раза по сравнению с более молодыми, однако к 39–40 неделям возвращается к прежнему уровню. При этом V_v этих телец снижается в 1,5 раза. Показатели V_v и N_n для фагосом в клетках РПЭ перепела остаются неизменными на протяжении жизни (таблица).

Возрастные изменения ультраструктуры клеток РПЭ затрагивают также их ядра: у молодых птиц ядра округлые с ровной поверхностью, у старых нередко наблюдаются ядра неправильной формы с инвагинациями ядерной оболочки (рис. 1, В, Г).

Также при старении нарушается упорядоченное расположение базальных отростков клеток РПЭ, характерное для молодых птиц: они становятся более редкими (рис. 4, Б).

Внутренняя структура мембраны Бруха, состоящая у молодых птиц из гомогенного вещества малой электронной плотности, с возрастом становится заметно гетерогенной с различными везикулярными,

гранулярными, линейными и пластинчатыми включениями (рис. 4, Б).

При анализе методом TUNEL РПЭ молодых птиц (25 недель) апоптотические ядра не выявлены; у старых птиц (52 недели) 16% всех ядер клеток РПЭ были апоптотическими.

Обсуждение результатов

Полученные нами данные позволяют сформировать систему маркеров старения РПЭ на электронно-микроскопическом уровне и дают представления о развитии возрастных изменений в его клетках.

Наиболее специфическими маркерами старения клеток млекопитающих считаются ЛГ — не поддающиеся перевариванию токсичные метаболиты. В РПЭ ЛГ включают окисленные липиды, белки и ретиноидные флуорофоры, оставшиеся после внутриклеточного расщепления фагоцитированных участков наружных сегментов фоторецепторных клеток [13, 14]. В клетках РПЭ человека предельное накопление ЛГ происходит к 60–70 годам [7], а в РПЭ японского перепела аналогичное накопление ЛГ, по результатам настоящей работы, наблюдается уже к 1–1,5-годовалому возрасту. Сходные электронно-микроскопические данные по накоплению ЛГ в РПЭ перепела приведены в работе Файт и Бенгстон [8]. Вместе с тем нами установлен не описанный ими факт, что в клетках РПЭ перепела при старении меняется соотношение разных типов ЛГ: количество гранул 2-го типа (меланолипофусцин) резко возрастает к возрасту 25 недель, но затем остается постоянным, тогда как количество ЛГ 3-го типа, напротив, прогрессивно увеличивается. Эти данные коррелируют с распределением меланолипофусцина и липофусцина в РПЭ сетчатки человека по мере старения [7]. Исходя из этого наиболее выраженными и специфическими маркерами старения РПЭ перепела можно считать ЛГ 3-го типа. Результаты измерений численности ЛГ в РПЭ перепела в нашей работе служили отправной точкой по оценке демонстрационной эффективности других субклеточных маркеров старения клеток РПЭ. Полученные нами результаты показывают, что наряду с отложениями липофусцина дополнительной характеристикой стареющих клеток могут служить значительные изменения в строении ядерного и энергетического аппаратов клеток РПЭ. Так, у старых птиц нередко наблюдались ядра с неровной поверхностью, иногда в них отмечалось увеличение конденсации хроматина. Возрастные изменения, наблюдаемые в хондриоме клеток РПЭ перепела, также оказались весьма существенными: резко возросло содержание митохондрий, имеющих на срезах вид изогнутых гантелей или колец. В совокупности изменения ядер и митохондрий позволяют оценивать старение РПЭ на клеточном уровне и дают воз-

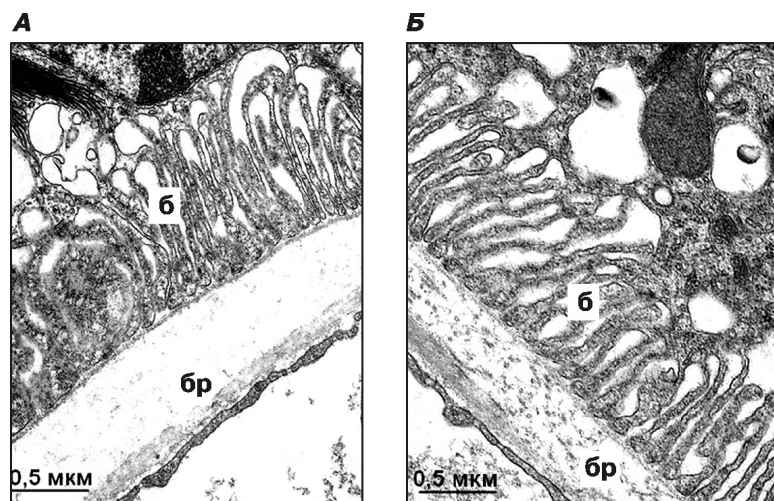


Рис. 4. Базальная часть клеток РПЭ и мембрана Бруха сетчатки перепелов в возрасте 9 недель (А) и 39–40 недель (Б): б — базальная складчатость плазмалеммы, бр — мембрана Бруха

возможность сопоставления функционального состояния клеток в разных зонах РПЭ.

Возрастные изменения, наблюдаемые в мембране Бруха и базальных отростках РПЭ перепела, представляются достаточно значимыми, однако они более трудоемки для морфометрических измерений на электронно-микроскопическом уровне. Наименее выраженными оказались изменения, характеризующие фагоцитарную активность клеток РПЭ, хотя они и свидетельствовали о в некотором ее снижении с возрастом.

Все выделенные нами субклеточные маркеры старения клеток РПЭ сами по себе могут служить маркерами функционального состояния клетки. Так, наблюдаемые нами у стареющих перепелов ядра с инвагинациями поверхности и с увеличенной конденсацией хроматина описаны в разных тканях млекопитающих при развитии патологических процессов и гибели клеток, в частности при апоптозе [15]. Полученные нами методом TUNEL данные подтвердили присутствие апоптотических клеток в РПЭ стареющих птиц. Увеличение числа кольцевидных митохондрий с возрастом, выявленное нами в клетках РПЭ перепела, отмечалось и в клетках РПЭ цыплят [16]. У человека гантелевидные и кольцевидные митохондрии наблюдали в РПЭ при гиратной атрофии сетчатки [17]. Описаны они и в клетках других тканей при патологических условиях, в частности в печени, где их появление связывают с усилением синтеза митохондриальных белков [18]. Изучение нами серийных срезов клеток РПЭ показало, что кольцевидные и гантелевидные митохондрии, скорее всего, представляют собой срезы чашевидных митохондрий. Поскольку изменение формы приводит к увеличению площади поверхности митохондрии, это можно рассматривать как проявление адаптивной реакции, направленной на компенсацию сниженного уровня энергетического метаболизма клеток РПЭ, отмечающегося при старении [16].

Наряду с изменениями ядер и хондриома наблюдаемое нами в РПЭ накопление ЛГ при старении может влиять на функциональное состояние клеток за счет фототоксичности этих гранул, генерирующих при действии света свободные радикалы [19–21]. Развивающиеся при этом окислительные реакции могут привести к нарушению метаболизма клеток и повреждению их структуры [22, 23].

Установленное нами снижение содержания в клетках РПЭ миелоидных телец может указывать на угнетение фагоцитарной активности РПЭ, поскольку образование этих структур, характерных для птиц, связывают с процессами фагоцитоза [24, 25].

Важную роль в межклеточном обмене между РПЭ и сосудистой оболочкой играют мембрана Бруха и

контактирующие с ней базальные отростки клеток РПЭ. В нашем исследовании, как и в работе Файт и соавторов [26], мы наблюдали, что в РПЭ перепела по мере старения происходит дезорганизация базальных отростков и появление различных включений в толще мембраны Бруха. Сходные явления описывают и в сетчатке млекопитающих, в том числе человека [2, 27]. Они могут быть связаны со снижением при старении деградации внеклеточного матрикса, накоплением в нем липидов и жирных кислот [27], что ведет к замедлению транспорта веществ между сосудистой оболочкой и РПЭ и ухудшает его функциональное состояние. Одним из наиболее характерных признаков старения сетчатки человека является образование посторонних включений — так называемых друз — между РПЭ и мембраной Бруха. Друзы представляют собой отложения нейтральных жиров, фосфолипидов, белков, везикул [28]. Друзоподобные включения описаны и для РПЭ перепела *C. japonica* [26]. Наблюдаемые нами пластинчатые и везикулярные включения в мембране Бруха старых птиц похожи по структуре на компоненты “мягких” друз человека [29] и, возможно, могут служить предшественниками друзоподобных отложений. Считают, что образование друз — результат нарушения нормального функционирования клеток РПЭ, при котором происходит перемещение в мембрану Бруха различного материала, накапливающегося в клетках РПЭ вследствие его недостаточного устранения [30, 31]. У человека обнаружена корреляция между плотностью этих отложений и степенью дегенерации клеток РПЭ и фоторецепторов [2]. Для перепела было показано, что область распространения и размер друзоподобных отложений увеличиваются по мере старения [26]. Однако в нашей работе друзы, подобные описанным, не были обнаружены. Возможно, это объясняется недостаточно большим возрастом изученных нами птиц.

Таким образом, из наших данных следует, что наиболее значимыми субклеточными маркерами старения клеток РПЭ японского перепела являются ЛГ 3-го типа, измененные ядра и митохондрии. Для всех трех видов маркеров имеются коррелирующие литературные данные по РПЭ человека, что подтверждает возможность использования японского перепела *C. japonica* в качестве хорошей модели для изучения в ускоренном временном режиме функционального состояния РПЭ при старении и дает дополнительную систему тестов, позволяющую на ультраструктурном уровне оценить степень развития данного процесса. При этом у японского перепела можно выделить возрастные группы ювильного, зрелого и старческого возраста, четко отличающиеся по содержанию маркерных структур в РПЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трофимова С.В., Хавинсон В.Х. Сетчатка и старение // Усп. геронтол. 2002. № 9. С. 79–82.

2. Ehrlich R., Harris A., Kheradiya N.S., Winston D.M., Ciulla T.A., Wiostko B. Age-related macular degeneration

and the aging eye // Clin. Interv. Aging. 2008. Vol. 3. N 3. P. 473—482.

3. Fine S.L., Berger J.W., Maguire M.G., Ho A.C. Age-related macular degeneration // New Engl. J. Med. 2000. Vol. 342. N 7. P. 483—492.

4. Nowak J.Z. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy // Pharmacol. Rep. 2006. Vol. 58. N 3. P. 353—363.

5. Зак П.П., Зыкова А.В., Трофимова Н.Н., Эскина Э.Н., Островский М.А. Экспериментальная модель ускоренного старения сетчатки: японский перепел *Coturnix japonica* // Сенсорные системы. 2012. Т. 26. № 1. С. 3—10.

6. Khachik F., Moura F.F. de, Zhao D.Y., Aebischer C.P., Bernstein P.S. Transformations of selected carotenoids in plasma, liver, and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002. Vol. 43. N 11. P. 3383—3392.

7. Feeney-Burns L., Hilderbrand E.S., Eldridge S. Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1984. Vol. 25. N 2. P. 195—200.

8. Fite K.V., Bengston L. Aging and sex-related changes in the outer retina of Japanese quail // Curr. Eye Res. 1989. Vol. 8. N 10. P. 1039—1048.

9. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. М.: Медицина, 1980. 216 с.

10. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation // J. Cell Biol. 1992. Vol. 119. N 3. P. 493—501.

11. Kim I.T., Kwak J.S. Degradation of phagosomes and diurnal changes of lysosomes in rabbit retinal pigment epithelium // Korean J. Ophthalmol. 1996. Vol. 10. N 2. P. 82—91.

12. Julien S., Schraermeyer U. Lipofuscin can be eliminated from the retinal pigment epithelium of monkeys // Neurobiol. Aging. 2012. P. 1—8.

13. Яковлева М.А., Сакина Н.Л., Канонихин А.С., Фельдман Т.Б., Николаев Е.Е., Донцов А.Е., Островский М.А. Обнаружение и исследование продуктов фотоокисления N-ретинилиден-N-ретинилэтанол-амин (A2E) — флуорофора липофусциновых гранул из клеток пигментного эпителия глаза человека // Докл. АН. 2006. № 3. С. 411—414.

14. Kennedy C.J., Rakoczy P.E., Constable I.J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review // Eye. 1995. N 9. P. 763—771.

15. Лушников Е.Ф., Абросимов Ф.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина, 2001. 190 с.

16. Lauber J.K. Retinal pigment epithelium: ring mitochondria and lesions induced by continuous light // Curr. Eye Res. 1982—1983. Vol. 2. N 12. P. 855—862.

17. Liang H., Crewther S.G., Crewther D.P. A model for the formation of ring mitochondria in retinal pigment epithelium // Yan Ke Xue Bao. 1995. Vol. 11. N 1. P. 9—15.

18. Almsheerqi Z., McLachlan C.S., Tay S.K., Deng Y. Chronic phenobarbital-induced mitochondrial pleomorphism in the rat liver // Toxicol. Pathol. 2007. Vol. 35. N 6. P. 833—835.

19. Островский М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Боултон М., Джарвис-Эванс Дж. Способность липофусциновых гранул из ретиального пигментного эпителия глаза человека к фотосенсибилизированному перекисному окислению липидов при действии видимого света // Сенсорные системы. 1992. Т. 6. № 3. С. 51—54.

20. Островский М.А. Фотобиологический парадокс зрения // Усп. биол. химии. 2005. Т. 45. С. 173—204.

21. Boulton M., Dontsov A., Ostrovsky M., Jarvis-Evans J., Sivistunen D. Lipofuscin is a photoinducible free radical generator // J. Photochem. Photobiol. 1993. Vol. 19. P. 201—204.

22. Dontsov A.E., Glickman R.D., Ostrovsky M.A. Retinal pigment and epithelium pigment granules stimulate the photo-oxidation of unsaturated fatty acids // Free Radic. Biol. Med. 1999. Vol. 26. N 11—12. P. 1436—1446.

23. Wassel J., Davis S., Bardesley W., Boulton M. The photoreactivity of the retinal age pigment lipofuscin // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 23828—23832.

24. Abran D., Dickson D.H. Biogenesis of myeloid bodies in regenerating newt (*Notophthalmus viridescens*) retinal pigment epithelium // Cell Tissue Res. 1992. Vol. 268. N 3. P. 531—538.

25. Dickson D.H., Harvey H.L. Myeloid body development in the chick retinal pigment epithelium // Curr. Eye Res. 1992. Vol. 11. N 2. P. 147—152.

26. Fite K.V., Bengston L., Cousins F. Drusen-like deposits in the outer retina of Japanese quail // Exp. Eye Res. 1994. Vol. 59. N 4. P. 417—424.

27. Bonilha V.L. Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium // Clin. Ophthalmol. 2008. Vol. 2. P. 413—424.

28. Wang L., Clark M.E., Crossman D.K., Kojima K., Messinger J.D., Mobley J.A., Curcio C.A. Abundant lipid and protein components of drusen // PLoS One. 2010. Vol. 5. N 4. P. 1—12.

29. Johnson P.T., Lewis G.P., Talada K.C., Brown M.N., Kappel P.J., Johnson L.V. Drusen-associated degeneration in the retina // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003. Vol. 44. N 10. P. 4481—4488.

30. Birch D.G., Liang F.Q. Age-related macular degeneration: a target for nanotechnology derived medicines // Intern. J. nanomedicine. 2007. Vol. 2. N 1. P. 65—77.

31. Johnson L.V., Forest D.L., Banna C.D., Radeke C.M., Maloney M.A., Hu J., Spencer C.N., Walker A.M., Tsie M.S., Bok D., Radeke M.J., Anderson D.H. Cell culture model that mimics drusen formation and triggers complement activation associated with age-related macular degeneration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. Vol. 108. N 45. P. 18277—18282.

Поступила в редакцию
15.11.12

SUBCELLULAR AGING MARKERS OF JAPANESE QUAIL *COTURNIX JAPONICA* RETINAL PIGMENT EPITHELIUM (ELECTRON-MICROSCOPIC INVESTIGATION)

N.B. Seryoznikova, P.P. Zak, L.S. Pogodina, N.N. Trofimova, T.V. Lipina, M.A. Ostrovsky

It is known that aging of retina of humans and quails is very similar by a number of parameters, so the Japanese quail *Coturnix japonica* is considered as one of the most successful experimental ani-

mal models of accelerated aging of retina. Structural changes of pigment epithelium in the central area of retina were examined in Japanese quails (age 9, 25, 39—40, 52 weeks) by transmission electron microscopy and morphometric analysis. Our study revealed that in addition to accumulation of lipofuscin granules and ultrastructure changes in Bruch's membrane, demonstrative subcellular markers of retinal pigment epithelium cell state at aging are alteration of mitochondria and nuclei shapes, decrease in myeloid bodies quantity and disorganization of basal infoldings.

Key words: *Japanese quail, retinal pigment epithelium, lipofuscin, mitochondria, aging.*

Сведения об авторах

Серезжникова Наталья Борисовна — аспирантка кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-262-30-87; e-mail: natalia.serj@yandex.ru

Зак Павел Павлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН. Тел.: 8-916-949-48-93; e-mail: pavelzak@mail.ru

Погодина Лариса Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-917-511-38-65; e-mail: lpogod@mail.ru

Трофимова Наталья Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН. E-mail: ntrofimova@mail.ru

Липина Татьяна Владимировна — канд. биол. наук, доц. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-920-26-49; e-mail: tlipina@mail.ru

Островский Михаил Аркадьевич — докт. биол. наук, акад. РАН, зав. кафедрой молекулярной физиологии биологического факультета МГУ, зав. лабораторией физико-химических основ рецепции ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН. Тел.: 8-499-939-73-57; e-mail: ostrovsky@sky.chph.ras.ru

УДК 578.2

НОВЫЙ ФИТОВИРУСНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ СУПЕРЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ В РАСТЕНИИ

Е.В. Путляев, А.А. Смирнов, Е.А. Лазарева, Г.В. Клинок,
О.В. Карпова, И.Г. Атабеков

(кафедра вирусологии; e-mail: putlegor@mail.ru)

Ранее нами был получен новый вирусный вектор на основе генома вируса мозаики альтернантеры штамма MU, ген целевого белка в составе которого находился под контролем двух субгеномных промоторов. Вирусный вектор обеспечивал суперэкспрессию белка оболочки и ряда целевых белков медицинского назначения в листьях *Nicotiana benthamiana*. В настоящей работе с целью увеличения продукции целевого белка вирусный вектор был модифицирован и ген белка оболочки поставлен под контроль трех субгеномных промоторов. Полученный вирусный вектор (AltMV triple1) также обеспечивал суперэкспрессию целевого белка в агротрансформированных листьях. Содержание целевого белка составляло более 50% от всего растворимого белка клетки. Проведено сравнение эффективности экспрессии целевого белка в листьях *Nicotiana benthamiana*, трансформированных вирусными векторами, содержащими два и три субгеномных промотора потексвирусов.

Ключевые слова: вирусы растений, растительный вирусный вектор, субгеномный промотор.

Современная медицина все шире использует фармакологические препараты на основе рекомбинантных белков [1]. Так, основным компонентом различных вакцин являются иммуногенные белки патогенов человека. Кроме того, для лечения многих заболеваний используются физиологически активные белки — цитокины, гормоны, ферменты и т.д. [1]. Таким образом, современная биотехнологическая промышленность нуждается в эффективном и низком по себестоимости методе производства различных рекомбинантных белков.

По сравнению с другими подходами накопление целевых рекомбинантных белков в растениях имеет ряд существенных преимуществ [2]: растения не требуют сложного оборудования для культивирования и поддержания стерильности, что значительно снижает затраты на производство; растения не имеют общих с человеком патогенов, что обеспечивает высокую биобезопасность конечного продукта и производственного процесса; растения могут обеспечить высокий уровень накопления целевого белка.

Для экспрессии различных целевых белков в растениях чаще всего используют вирусные векторы на основе геномов вирусов растений. Таким образом, создание новых эффективных растительных вирусных векторов является актуальной задачей современной биотехнологии [3].

Целью данной работы было создание нового вирусного вектора на основе генома вируса мозаики альтернантеры для суперэкспрессии целевых белков в растениях.

Материалы и методы

В данной работе использовались штаммы *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene, USA) и *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 из коллекции кафедры вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. ДНК-олигонуклеотиды были синтезированы фирмой “Синтол” (Россия). Клонирование рекомбинантной ДНК в клетках *Escherichia coli* XL-1 Blue проводилось с помощью стандартных методов [4]. В работе использовались эндонуклеазы рестрикции фирмы “Сибэнзим” (Россия), ДНК лигаза фага T4 фирмы “Ферментас” (Литва) и наборы реактивов Encyclo PCR kit и Mint universal cDNA synthesis kit фирмы “Евроген” (Россия).

Получение вирусных векторов. Для получения конструкции p(AltMV-triple1) были проведены две ПЦР на матрице p(AltMV-double) с парами праймеров Al2019 (caccagagaccatcagggctct)/Al2022(agaatctgcagaatttgcggagag) и Al2012(gagagagagcttcaggatgattgagcag)/Al2023(gagccctgatggctctctgggtgatgacttttaactaagataagactagg). Полученные продукты (PCR1 и PCR2 соответственно) были слиты в ходе ПЦР с частичным перекрытием матриц с праймерами Al2012/Al2022. Полученный продукт был клонирован в p(AltMV-double) по сайтам узнавания эндонуклеазами рестрикции ApaI и SpeI.

Для получения конструкции p(AltMV-triple2) была проведена ПЦР на матрице p(AltMV-double) с парой праймеров Al2012/Al2025 (gtatcaatggaaactaacgggttcagagggttaataaagtgattcgtctttggg). Полученный продукт (PCR3) использовался в качестве матрицы для ПЦР с парой праймеров Al2012/Al2026 (tgctagctgggtgct gacgtcttcgagtatcaatggaaactaacgggttc). Продукт реакции (PCR4) ис-

пользовался в качестве матрицы для ПЦР с парой праймеров Al2012/Al2027 (gagccctgatggtctctggtgtgtagctggtgctgacgtctttcg). Полученный продукт (PCR5) был слит с PCR1 с помощью ПЦР с частичным перекрытием матриц с парой праймеров Al2012/Al2022. Итоговый продукт был клонирован в р(AltMV-double) по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции AраI и SpeI. Структура полученных плазмид была проверена с помощью рестрикционного анализа и секвенирования (Евроген).

Агроинъекция листьев *Nicotiana benthamiana*. Агроинъекцию вирусных векторов в листья *Nicotiana benthamiana* проводили, как описано в работе [5].

Анализ накопления белка оболочки (БО) AltMV-MU в листьях *Nicotiana benthamiana*. На 12-й день после инфильтрации (д.п.и.) листовой материал гомогенизировали в трех объемах 10 мМ Трис-НСl буфера с рН 8,0. Полученный образец центрифугировали при 16 000 g 15 мин при 40°C. К супернатанту (S16 фракция) добавляли равный объем буфера нанесения (200 мМ Трис-НСl с рН 6,8; 8% додецилсульфата натрия; 40% глицерина; 20% β-меркаптоэтанола; 1% бромфенолового синего). Полученный образец прогревали при 95°C 15 мин и анализировали методом электрофореза в градиентном (8—20%) полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ). Окрашивали с помощью Ку-массы G-250.

Получение вирусоподобных частиц. На 12 д.п.и. трансформированные вирусным вектором листья гомогенизировали в трех объемах 10 мМ Трис-НСl буфера с рН 8,0. Полученный образец центрифугировали при 16 000 g 15 мин при +4°C. К супернатанту добавляли 20 мМ цитратный буфер с рН 4,0, доводя до концентрации 10 мМ, после чего выдерживали 40 мин при 0°C, далее еще 40 мин при комнатной температуре. Затем добавляли раствор I (20 мМ цитратный буфер с рН 4,0; 20%-й полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ); 5%-й NaCl), доводя до 8% ПЭГ и 2% NaCl. Далее образец выдерживали 15 ч при +5°C, после чего центрифугировали при 16 000 g 15 мин при +5°C. Полученный осадок ресуспендировали в 20 мМ цитратном буфере с рН 4,0. Далее центрифугировали при 16 000 g 15 мин при +5°C. Полученный супернатант анализировали методом просвечивающей электронной микроскопии.

Просвечивающая электронная микроскопия. Исследование препаратов вирусоподобных частиц методом просвечивающей электронной микроскопии проводили, как описано в работе [6].

5'-RACE ОТ-ПЦР. Образование субгеномных РНК при экспрессии вирусного вектора в трансформированных листьях исследовали с помощью метода 5'-RACE ОТ-ПЦР. РНК из трансформированных вирусным вектором листьев (3 д.п.и.) выделяли с помощью реактива "TRI REAGENT" (Molecular research center) по методике производителя. Для получения кДНК копий субгеномных РНК вирусных векторов

выделенную РНК исследовали методом 5'-RACE ОТ-ПЦР с помощью набора реактивов Mint universal cDNA synthesis kit (Евроген) по методике производителя с небольшими изменениями. Так, для синтеза первой цепи кДНК использовали праймер AltMVC-Prev (tgtgtcgactcagtgatggtgatggtgatgctccggtggaggattga), комплементарный последовательности 3'-концевой части гена БО AltMV-MU. Для амплификации двухцепочечной кДНК использовали праймеры AltMV CPrev и "ПЦР праймер М1" (Евроген). Далее продукты 5'-RACE ОТ-ПЦР исследовали методом электрофореза в агарозном геле и определяли их первичную структуру.

Результаты и обсуждение

Вирус мозаики альтернантеры (AltMV, ВМАльт) относится к роду *Potexvirus* [7]. Геном вируса состоит из одной молекулы РНК положительной полярности (6606 нт длиной), несущей гены 5 белков — РНК-зависимой РНК-полимеразы, транспортных белков 1, 2, 3 и белка оболочки [8]. В нашей лаборатории был описан новый штамм вируса мозаики альтернантеры AltMV-MU (GeneBank FJ822136.1) [8] (рис. 1, А). Было показано, что выделенный из препарата AltMV-MU БО способен образовывать ВПЧ in vitro в отсутствие вирусной РНК [6].

Ранее нами был получен вирусный вектор (AltMV-double) на основе кДНК-копии геномной РНК AltMV-MU, лишенной тройного блока генов. Ген белка оболочки в составе AltMV-double находился под контролем двух субгеномных промоторов (сгп1 и 3) вируса мозаики альтернантеры. Это первый случай использования двух субгеномных промоторов для контроля одного гена в растительных вирусных векторах. AltMV-double обеспечивал эффективную экспрессию БО AltMV-MU и различных белков медицинского

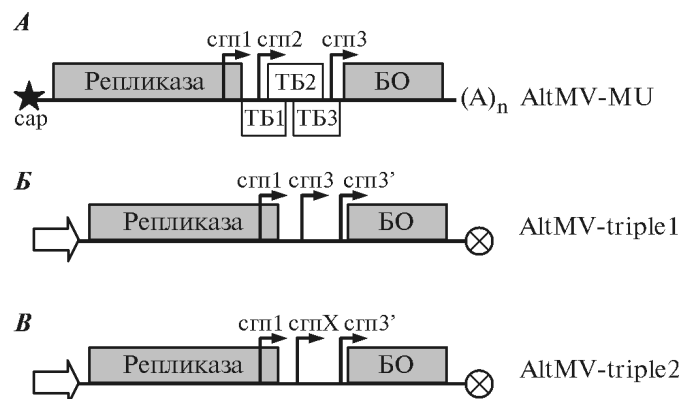


Рис. 1. Схема генома AltMV-MU и созданных на его основе вирусных векторов: А — геном AltMV-MU; Б — AltMV-triple1; В — AltMV-triple2.

ТБ 1, 2, 3 — гены трех транспортных белков; БО — ген белка оболочки; сгп1,2 — вероятное местоположение субгеномных промоторов 1 и 2 соответственно; сгп3,X — субгеномные промоторы 3 AltMV [14] и ХВК [11] соответственно; — 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; X — терминатор гена нопалинсинтазы; (A)_n — поли(А) последовательность

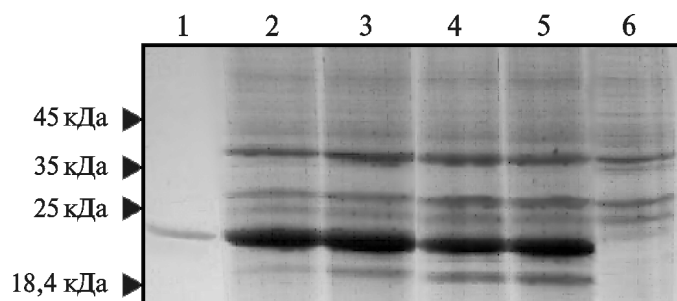


Рис. 2. Изучение экспрессии БО AltMV-MU в листьях *N. benthamiana*, агроинъецированных AltMV-triple1,2 и AltMV-double: 1 — 1 мкг БО AltMV-MU; S16-фракции, выделенные из разных половинок одного листа агроинокулированного: 2 и 3 — AltMV-double и AltMV-triple1 соответственно, 4 и 5 — AltMV-double и AltMV-triple2 соответственно, 6 — только р19. Положение маркеров молекулярной массы показано стрелками. Электрофорез в 8–20% ДСН ПААГ. Окраска Кумасси G-250

назначения в трансформированных листьях *Nicotiana benthamiana*.

В данной работе с целью дальнейшего увеличения уровня продукции целевых белков в растениях AltMV-double был модифицирован. Получен новый вирусный вектор (AltMV-triple1) на основе кДНК-копии геномной РНК AltMV-MU, лишенной тройного блока генов (рис. 1, Б). Для увеличения уровня экспрессии ген белка оболочки в составе AltMV-triple 1 находился под контролем трех субгеномных промоторов (сгп1 и двух сгп3). Аналогично AltMV-double данная конструкция была клонирована в бинарный вектор pCambia1300(CAMBIA) под контроль 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и терминатора гена нопалин-синтазы (nos-терминатор). AltMV-triple1 был агроинъецирован в листья растения *Nicotiana benthamiana*. Для увеличения уровня накопления целевого белка все агроинъекции проводились в присутствии рекомбинантной агробактерии, несущей ген р19-супрессор умолкания генов вируса кустистой карликовости томатов [9]. Результаты исследования S16 фракции, выделенной из листьев трансформированных AltMV-triple1 (рис. 2, дорожка 3), свидетельствуют об эффективном накоплении БО ВМАлт. Количество целевого белка составляло более 50% от всех растворимых белков клетки (определяли, как описано в работе [3]).

Однако уровни экспрессии БО AltMV-MU в агроинъецированных AltMV-triple1 и AltMV-double листьях *Nicotiana benthamiana* близки (рис. 2, дорожки 3, 2). Таким образом, добавление третьего субгеномного промотора в состав вирусного вектора не привело к существенному увеличению уровня экспрессии целевого белка.

Из литературных данных известно, что повторяющиеся последовательности геномов вирусных векторов могут выщепляться вследствие репликативной рекомбинации [10]. Данный факт может быть причиной отсутствия значительного увеличения эффективности экспрессии БО AltMV-MU в транс-

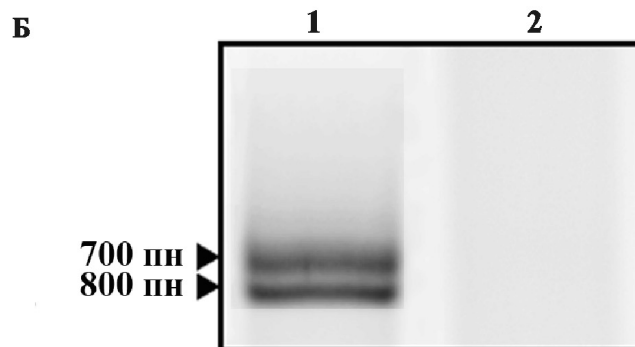
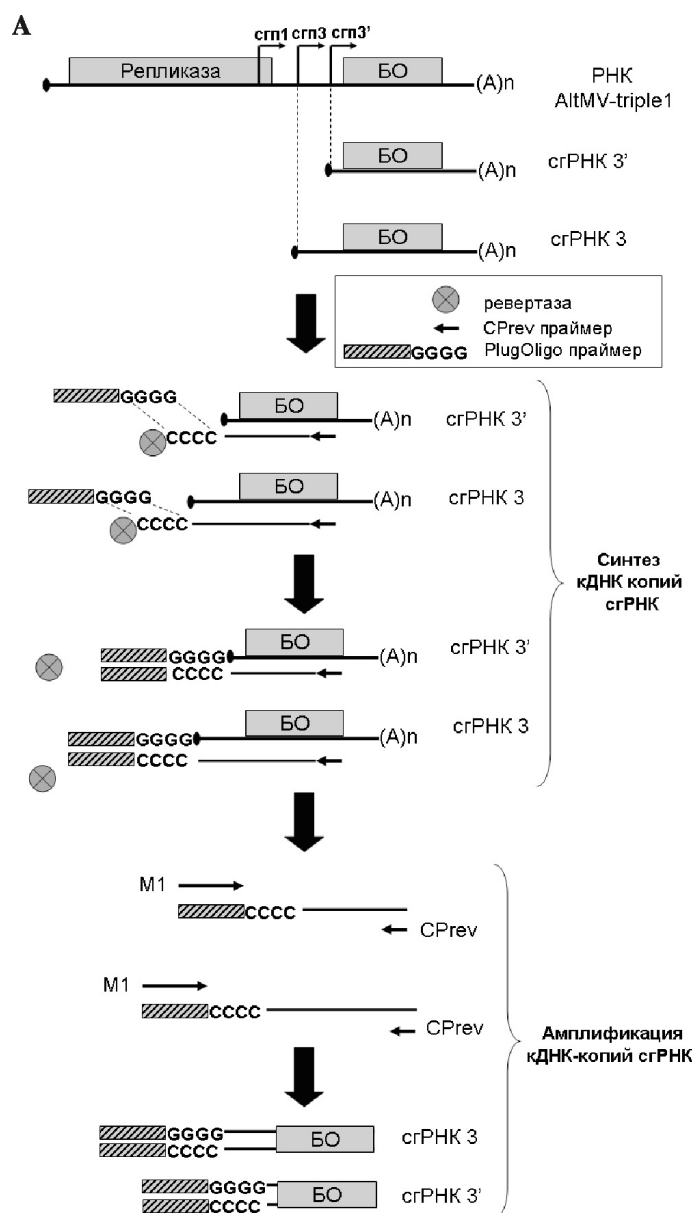


Рис. 3. Анализ crPHK, синтезируемых AltMV-triple1 в листьях *N. benthamiana*, методом 5'-RACE ОТ-ПЦР:

А — схема эксперимента, Б — анализ продуктов 5'-RACE ОТ-ПЦР. Исследовали РНК, выделенную из листьев агроинъецированных: 1 — AltMV-triple1, 2 — только р19.

Положение маркеров молекулярной массы указано стрелками. Электрофорез в 1%-м агарозном геле. Окраска бромидом этидия

формированных AltMV-triple1 листьях по сравнению с AltMV-double. Для проверки этой гипотезы один из сгп3 AltMV-triple1 был заменен на гетерологичный сгп3 X-вируса картофеля (ХВК) [11]. Идентичность последовательностей сгп3 AltMV-MU и ХВК составляла 30,2%, что уменьшало вероятность их рекомбинационного выщепления. Полученный вирусный вектор был назван AltMV-triple2 (рис. 1, *В*). Исследование S16 фракции агроинъецированных AltMV-triple2 листьев *Nicotiana benthamiana* методом электрофореза ДСН-ПААГ показало эффективное накопление БО AltMV-MU (рис. 2, дорожка 5). Однако уровни экспрессии БО AltMV-MU в трансформированных AltMV-double и AltMV-triple2 листьях были близки (рис. 2, дорожки 4, 5).

Для того чтобы выяснить, все ли сгп в составе вирусного вектора обеспечивают инициацию транскрипции, были исследованы состав и первичная структура субгеномных (сг) РНК, образующихся в зараженных AltMV-triple1 листьях. Для этого выделенную из трансформированных листьев РНК анализировали методом 5'-RACE ОТ-ПЦР (быстрая амплификация 5'-концов кДНК с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции) (схема представлена на рис. 3, *А*). Исследование методом электрофореза в агарозном геле позволило детектировать два продукта 5'-RACE ОТ-ПЦР, соответствующих исходя из электрофоретической подвижности сгРНК 3 и 3' AltMV-triple1 (рис. 3, *Б*, дорожка 1). Анализ нуклеотидной последовательности полученных фрагментов ДНК подтвердил этот вывод (данные не представлены). Продукт, соответствующий сгРНК1, зафиксировать не удалось. Это свидетельствует о том, что эффективность накопления сгРНК1 в трансформированных вирусным вектором листьях значительно ниже, чем сгРНК3 и 3'. Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что сгп3 и 3' обес-

печивают синтез субгеномных РНК при экспрессии AltMV-triple1. Представленные данные также свидетельствуют об отсутствии эффективного рекомбинационного выщепления повторяющихся сгп3 и 3' при экспрессии AltMV-triple1 в листьях *Nicotiana benthamiana*.

Таким образом, добавление третьего субгеномного промотора в состав AltMV-triple1 не привело к существенному увеличению уровня экспрессии БО AltMV-MU. Причиной такого эффекта может являться низкий уровень накопления сгРНК1 при экспрессии вирусного вектора в листьях *Nicotiana benthamiana*.

Вирусоподобные частицы (ВПЧ), образованные белками оболочки различных растительных вирусов, широко используются в современной биотехнологии [12]. Так, одним из перспективных подходов для производства вакцин является создание ВПЧ, несущих на своей поверхности антигенные детерминанты различных патогенов [13]. Подобные вакцинные препараты отличается высокая иммуногенность и биобезопасность.

На следующем этапе работы была изучена возможность образования ВПЧ в экстрактах трансформированных AltMV-triple1 листьев *Nicotiana benthamiana*. Препараты выделенных ВПЧ исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии. Исходя из полученных результатов (рис. 4, *А*) можно сделать вывод, что количество экспрессированного AltMV-triple1 БО AltMV-MU достаточно для эффективного образования ВПЧ. Полученные ВПЧ близки по морфологии к нативным вирионам AltMV-MU (рис. 4, *А*, *Б*). Таким образом, AltMV-triple1 может быть использован для накопления целевых белков в растении и получения ВПЧ, активно применяющихся в современной нанобиотехнологии для разработки новых вакцин и наноматериалов.

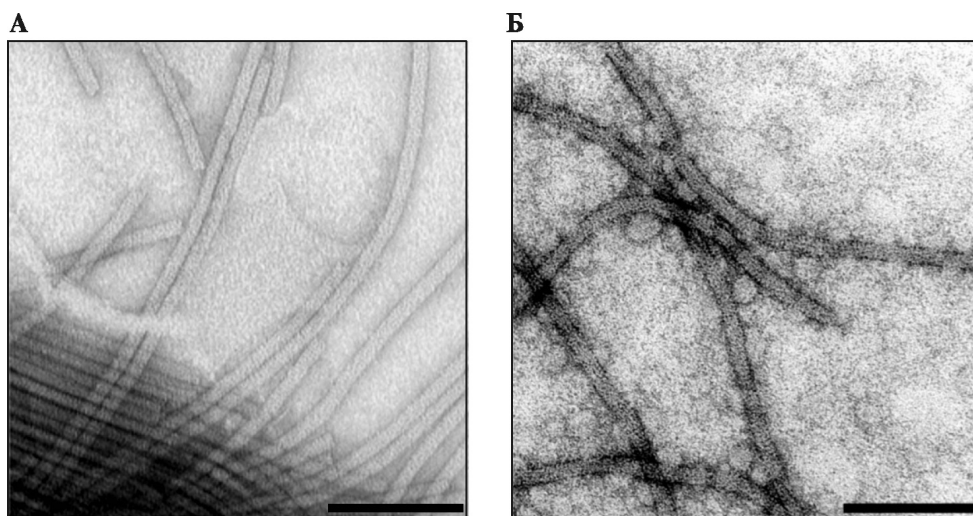


Рис. 4. Исследование методом просвечивающей электронной микроскопии:

А — ВПЧ образованных БО AltMV-MU экспрессированным AltMV-triple1 в листьях *N. benthamiana*; **Б** — нативных вирионов AltMV-MU. Масштабная линейка 100 нм. Образцы контрастированы 2%-м уранилацетатом

Выводы

1. Получен новый вирусный вектор на основе генома вируса мозаики альтернантеры штамм МУ. Целевой ген в составе вирусного вектора находился под контролем трех субгеномных промоторов. Это первый случай использования трех субгеномных промоторов для экспрессии одного гена в растительных вирусных векторах.

2. Вирусный вектор обеспечивал суперэкспрессию белка оболочки вируса мозаики альтернантеры в листьях *Nicotiana benthamiana*. Количество образующегося белка было достаточным для эффективного образования ВПЧ.

3. Добавление третьего субгеномного промотора, контролирующего целевой ген, в состав вирус-

ного вектора не привело к существенному увеличению уровня экспрессии целевого белка. Показано, что эффективность накопления субгеномной РНК 1 вирусного вектора в трансформированных листьях *Nicotiana benthamiana* значительно ниже, чем субгеномных РНК3 и 3'.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (номер проекта мол_а_вед 12-04-33228) и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (соглашение 8564).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crommelin D.J., Storm G., Verrijck R., Leede L., Jiskoot W., Hennink W.E. Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs // *Inter. J. Pharm.* 2003. Vol. 266. N 1—2. P. 3—16.
2. Lico C., Chen Q., Santi L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants // *J. Cell Physiol.* 2008. Vol. 216. N 2. P. 366—377.
3. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. Vol. 18. N 2. P. 134—141.
4. Sambrook J., Russel D. Molecular cloning: A laboratory manual. N.Y.: CSHL Press, 2001.
5. Zvereva A.S., Petrovskaya L.E., Rodina A.V., Frolova O.Y., Ivanov P.A., Shingarova L.N., Komarova T.V., Dorokhov Y.L., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Atabekov J.G. Production of biologically active human myelocytokines in plants // *Biochemistry (Moscow)*. 2009. Vol. 74. N 11. P. 1187—1194.
6. Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Arkhipenko M.V., Ivanov P.A., Chirkov S.N., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. Characterization of Alternanthera mosaic virus and its Coat Protein // *Open Virol. J.* 2011. Vol. 5. P. 136—140.
7. Hammond J., Reinsel M.D., Maroon-Lango C.J. Identification and full sequence of an isolate of Alternanthera mosaic potexvirus infecting *Phlox stolonifera* // *Arch. Virol.* 2006. Vol. 151. N 3. P. 477—493.
8. Ivanov P.A., Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. The complete nucleotide sequence of Alternanthera mosaic virus infecting

Portulaca grandiflora represents a new strain distinct from phlox isolates // *Virus Genes*. 2010. Vol. 42. N 2. P. 268—271.

9. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus // *Plant J.* 2003. Vol. 33. P. 949—956.

10. Sempere R.N., Gómez P., Truniger V., Aranda M.A. Development of expression vectors based on pepino mosaic virus // *Plant Methods*. 2011. Vol. 7. N 6.

11. Chapman S., Kavanagh T.A., Baulcombe D.C. Potato virus X as a vector for gene expression in plants // *Plant J.* 1992. Vol. 2. N 4. P. 549—557.

12. Singh P., Gonzalez M.J., Manchester M. Viruses and their uses in nanotechnology // *Drug develop. res.* 2006. Vol. 67. N 1. P. 23—41.

13. Leclerc D., Beauseigle D., Denis J., Morin H., Pare C., Lamarre A., Lapointe R. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells // *J. Virol.* 2007. Vol. 81. P. 1319—1326.

14. Lim H.S., Vaira A.M., Reinsel M.D., Bae H., Bailey B.A., Domier L.L., Hammond J. Pathogenicity of Alternanthera mosaic virus is affected by determinants in RNA-dependent RNA polymerase and by reduced efficacy of silencing suppression in a movement-competent TGB1 // *J. Gen. Virol.* 2010. Vol. 91. N 1. P. 277—287.

Поступила в редакцию
13.09.12

NEW PHYTOVIRAL VECTOR FOR SUPEREXPRESSION OF TARGET PROTEINS IN PLANTS

E.V. Putlyaev, A.A. Smirnov, E.A. Lazareva, G.V. Klink, O.V. Karpova, I.G. Atabekov

Previously, we obtained a new viral vector, based on the Alternanthera mosaic virus strain MU (AltMV-MU). The gene of interest was placed under control of two subgenomic promoters (sgp). Viral vector provided the superexpression of target proteins in *Nicotiana benthamiana*. In the present work, to increase the level of protein expression this viral vector was modified and the coat protein gene was placed under control of three sgp. The new viral vector provided superexpression of pro-

tein of interest in plants and its amount was more than 50% of the total soluble protein of cells. The comparison of the target protein expression efficiency in plants transformed by viral vectors contained two and three sgp, was done.

Key words: *plant virus, plant viral vector, subgenomic promoter.*

Сведения об авторах

Путляев Егор Валерьевич — аспирант 2-го года кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-903-184-51-40; e-mail: putlegor@mail.ru

Смирнов Александр Алексеевич — канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-939-81-93, 8-495-939-33-47; e-mail: smirovir@gmail.com

Лазарева Екатерина Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: lazareva-katrina@mail.ru

Клинк Галина Викторовна — аспирантка 1-го года биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-47; e-mail: galkaklink@gmail.com

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, акад. РАН, зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru

ГЕНЕТИКА

УДК 575.852:575.174.015.3

О СООТНОШЕНИИ ФЕНОТИПА И ГЕНОТИПА СОБОЛЯ И ЛЕСНОЙ КУНИЦЫ В ЗОНЕ СИМПАТРИИ НА СЕВЕРНОМ УРАЛЕ

В.В. Рожнов¹, С.Л. Пищулина¹, И.Г. Мещерский¹, Л.В. Симакин²¹ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва;² Печора-Илычский государственный природный биосферный заповедник, Республика Коми, пос. Якша; e-mail: molecoldna@gmail.com)

Анализ частот встречаемости аллелей 9 микросателлитных локусов яДНК соболя (*Martes zibellina*) и лесной куницы (*M. martes*) показал, что эти виды из аллопатрических частей ареалов различаются с высокой степенью достоверности, в то время как в зоне симпатрии на Северном Урале между ними регулярно происходит гибридизация. В целом популяции соболя и лесной куницы в зоне симпатрии сохраняют генетическую обособленность, однако фенотипы особей не всегда коррелируют с их видовой (или гибридной) принадлежностью, определяемой генетическим методом.

Ключевые слова: микросателлиты, соболь, лесная куница, гибридизация.

Соболь (*Martes zibellina* L.) и лесная куница (*M. martes* L.) — два вида, самостоятельность которых не вызывает сомнений у зоологов. Однако в зоне симпатрии этих видов встречаются особи, характеризующиеся промежуточными фенотипическими признаками, — кидасы, которых считают гибридами соболя и лесной куницы. В середине XX в. предпринимались попытки найти подтверждение гибридного происхождения кидасов и выявить диагностические признаки, позволявшие бы отличать гибридные особи от особей родительских видов.

Сама возможность гибридизации соболя и лесной куницы была подтверждена экспериментально: в условиях неволи были получены гибриды первого поколения от скрещивания самца соболя и самки лесной куницы (но не наоборот), а также потомство от спаривания самки кидаса с самцом куницы (но не соболя). Плодовитость самцов кидасов осталась недоказанной, хотя в одном случае в семенниках самца были отмечены живые сперматозоиды. В итоге был сделан вывод о частичной плодовитости кидаса [1–5].

Однако подобные эксперименты носили единичный характер и не могли служить основой для оценки интенсивности гибридизации в естественных условиях. В отношении этого процесса сформировались две точки зрения: П.Б. Юргенсон [6] считал гибридное происхождение кидасов доказанным, тогда как В.Н. Павлинин [7] показал, что диагностические признаки, приводимые разными авторами, зачастую противоречивы, и убедительно обосновал сомнения в гибридном происхождении большей части особей кидасов.

Позже применение молекулярно-генетических методов [8] позволило констатировать, что в популяциях рода *Martes* в зоне симпатрии перенос мтДНК идет в обе стороны (т.е. потомство может получаться как от скрещивания самок куниц с самцами соболя, так и наоборот), однако анализ нерекombинирующей части генома не давал представления о динамике этого процесса во времени.

В коллекции Печоро-Илычского государственного природного биосферного заповедника хранятся экземпляры представителей рода *Martes*, добытые в зоне их симпатрии на Северном Урале. По совокупности фенотипических признаков (общий габитус, окраска, структура меха, число хвостовых позвонков, особенности строения *os penis* и ряд краниологических признаков) сотрудники заповедника относят экземпляры к тому или иному виду или классифицируют их как кидаса (гибрид).

В связи с отсутствием в литературе единого мнения о диагностических признаках кидасов и трудностями, возникающими при определении исходных видов в зоне совместного обитания, задача настоящего исследования состояла в том, чтобы сравнить определение особей рода *Martes* из зоны симпатрии по фенотипическим, в частности по краниометрическим, признакам с результатами молекулярно-генетического анализа с использованием маркеров ядерной ДНК.

Материалы и методы

Мы исследовали дентоматериал от 66 экземпляров — 25 соболей, 25 лесных куниц и 16 “кидасов” из коллекции Печоро-Илычского государственного

природного биосферного заповедника. В качестве контроля были проанализированы образцы из аллопатричных частей ареалов — 26 соболей (из Якутии — 9 экз., спиртовой материал, образцы предоставлены В.М. Сафроновым и с Дальнего Востока — 18 экз., коллекция ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, образцы предоставлены в том числе А.Р. Груздевым и О.В. Шпак) и 21 лесная куница (из Кавказского заповедника — 5 экз., дентоматериал, коллекции Зоологического музея МГУ имени М.В. Ломоносова и Института экологии горных территорий КБНЦ РАН; из Белгородской 3 экз., Московской 3 экз. и Тверской 2 экз. областей России — дентоматериал, коллекция ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, а также образцы, предоставленные Е.М. Литвиновой и В.М. Малыгиным; из Польши 3 экз., спиртовой материал, образцы предоставлены М. Вользаном; из Ленинградской 1 экз., Пензенской 1 экз., Тверской 2 экз., Челябинской 1 экз. областей России, спиртовой материал, образцы предоставлены А.В. Абрамовым).

Выделение ДНК из дентоматериала проводили с помощью набора реагентов QIAamp DNA Mini Kit (Германия).

Проводили оценку аллельного состава по 9 микросателлитным локусам: Mel 10 [9]; Ma1, Ma3, Ma8, Ma15, Ma18, Ma19 [10]; а также Mvis072 и Mer041 [11]. Аллели микросателлитных локусов амплифицировали с использованием праймеров, модифицированных (F-праймер) наличием на 5'-конце флуоресцентной метки. Синтез праймеров осуществлен НПК СИНТОЛ. Параметры постановки полимеразной цепной реакции по [9]: 1) предварительная денатурация ДНК при 94°C в течение 3 мин (1 цикл); 2) 35 циклов, состоящих из следующих этапов: денатурация — 40 с при 94°C; отжиг праймеров — 40 с при 58°C; элонгация — 40 с при 72°C; 3) заключительная элонгация — 30 мин при 72°C.

Для оценки длин фрагментов применяли метод капиллярного электрофореза с применением автоматического анализатора Genetic Analyzer AB3130 (Applied Biosystems). В качестве размерного стандарта был взят GeneScan TM 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). Расшифровку хроматограмм осуществляли с помощью программы GeneMapper v3.5 (Applied Biosystems). Математическую обработку результатов проводили с помощью программы Structure v 2.3.3 [12]. Степень отличий в частотах встречаемости аллелей (*FST*-критерий) рассчитывали в программе Arlequin v.3.11 [13].

Результаты и обсуждение

Анализ на основе частот аллелей методом кластеризации (рис. 1) показал, что все соболей из аллопатричной части ареала с вероятностью более 98% относятся к груп-

пе “соболей”, а все куницы из аллопатричной части ареала — с вероятностью более 98% ко второй группе — группе “куниц”. В зоне симпатрии из 25 уральских “куниц” 3 (12%) относятся к соболям, а для 4 (16%) вероятность отнесения к одному из родительских видов составляла менее 75% (гибриды первого и/или второго поколения — кидасы). Из 25 “соболей” только 2 (8%) относятся к кидасам, а все остальные — к группе “соболей”. Из 16 “кидасов” 10 (62,5%) с вероятностью более 75% относятся к группе соболей, а 2 (12,5%) — к группе куниц. Всего из 66 экземпляров, происходящих из зоны симпатрии, выявлено 20 (30,3%) куниц, 36 (54,5%) соболей и 10 (15,2%) кидасов.

Между выборками “кидасов” и уральских соболей, составленных по совокупности фенотипических признаков, не было выявлено статистически достоверных различий ($F_{st} = 0,002$, $p = 0,37$), что еще раз говорит о том, что генофонд “кидаса” наиболее близок уральскому соболю.

Полученные результаты хорошо согласуются с результатами пошагового дискриминантного анализа краниометрических признаков, проведенного ранее для тех же образцов [14]: 14 из 23 (60,8%) особей, фенотипически классифицированных как кидасы, по совокупности краниометрических признаков с вероятностью более 67% относятся к группе соболей, 6 особей (26,1%) — к группе куниц, и только 3 (13,0%) были отнесены к группе вероятных гибридов. Всего в выборке из 83 экземпляров, включавшей по изначальной классификации по 37,5% соболей и куниц и 25% кидасов, было выявлено 55,4% соболей, 41,0% куниц и только 3,6% кидасов. Следует отметить, однако, что, несмотря на сходство результатов двух независимых методов анализа в целом, для целого ряда (более 30%) конкретных особей обнаруживаются и несоответствия, вплоть до прямо противоположных (рис. 2).

Как уже было сказано, факт гибридизации был показан анализом мтДНК [8], не дающим, однако, представления о динамике этого процесса во времени. Данные, полученные нами, свидетельствуют о том, что гибридизация в этом регионе происходит постоянно. При этом популяции соболя и лесной куницы

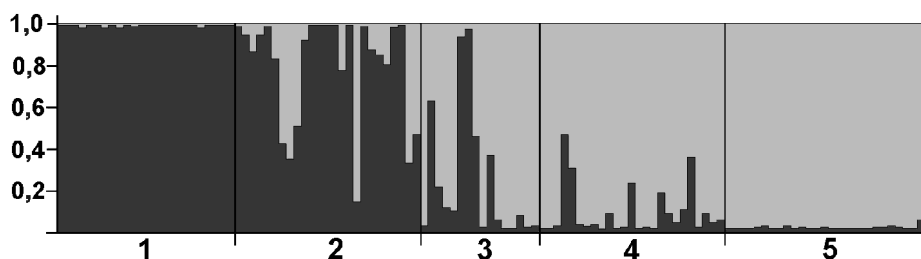


Рис. 1. Вероятность принадлежности особей лесной куницы из аллопатрических частей ареала (1), куниц с Северного Урала (2), кидасов (3), соболей с Северного Урала (4) и особей соболя из аллопатрических частей ареала (5) к кластеру “куниц” (темно-серый цвет) или “соболей” (светло-серый цвет) по результатам анализа частот аллелей 9 микросателлитных локусов. Метод кластеризации (программа Structure v 2.3.3), модель “Admixture”, 300 000 реплик

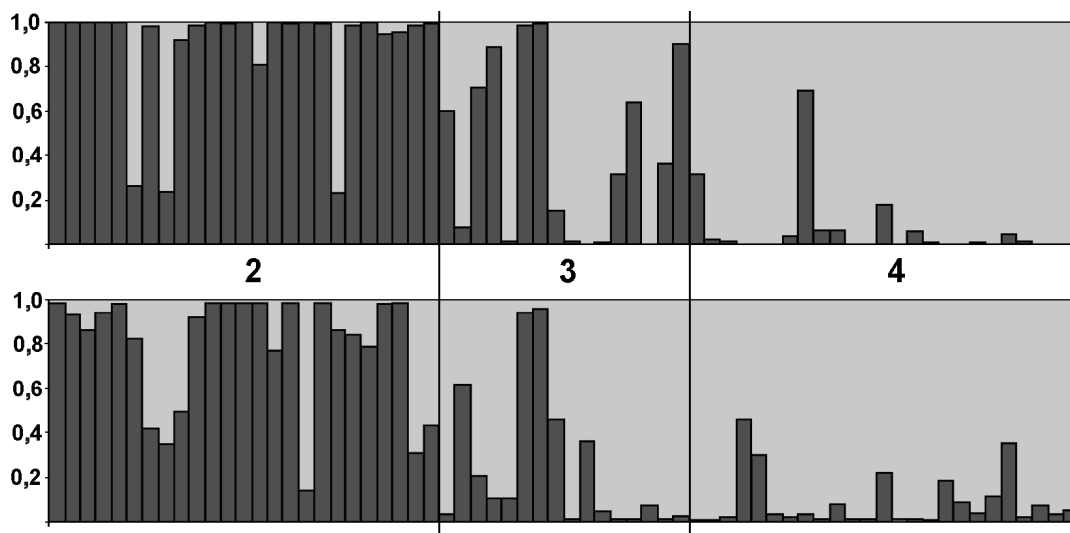


Рис. 2. Сравнение индивидуальных значений вероятности принадлежности особей куниц (2), кидасов (3) и соболей (4) Северного Урала к кластеру “куниц” (темно-серый цвет) или “соболей” (светло-серый цвет) по результатам краниометрического (вверху, метод — см. [14]) и генетического (внизу, метод — см. рис. 1) анализа. Порядок группировки особей одинаков и соответствует приведенному на рис. 1

в зоне симпатрии сохраняют генетическую обособленность: их выборки, составленные на основании фенотипических признаков, высокодостоверно отличаются и по частотам встречаемости аллелей ряда локусов яДНК. Также не выявлено достоверных отличий между выборками фенотипических кидасов и уральских соболей, что говорит о том, что генофонд “кидаса” на Урале наиболее близок к генофонду соболя. Как и предполагал ранее В.Н. Павлинин [7], за кидасов в основном принимают особей родительских видов, уклонившихся по морфологическим признакам от типичного большинства. В то же время часть генетических гибридов не попадает в поле зрения исследователей, фенотипически не отличаясь от одной из родительских форм. Надежно отнести

экземпляр рода *Martes* из зоны симпатрии на Северном Урале к тому или иному виду или гибриду можно только на основании молекулярно-генетического анализа. Краниометрический анализ при анализе серийного материала позволяет судить о соотношении в выборках гибридов и особей родительских видов, но не позволяет делать заключения в отношении видовой или гибридной принадлежности конкретных особей.

* * *

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кошевой И. Кидас // Бюллетень Зоопарков и Зоосадов. 1935. № 10—11.
2. Портнова Н. Размножение кидаса // Каракулеводство и звероводство. 1941. № 6.
3. Пономарев А.Л. Кидас // Бюл. МОИП. 1946. Т. 51. № 4—5. С. 79—83.
4. Граков Н.Н. О видовой самостоятельности лесной куницы и соболя // Сб. научно-технической информации ВНИИОЗ. 1974. Вып. 46. С. 11—14.
5. Граков Н.Н. Лесная куница. М.: Наука, 1981. 108 с.
6. Юргенсон П.Б. Кидас — гибрид соболя и куницы // Тр. Печоро-Илычского заповедника. 1947. Вып. 5. С. 145—179.
7. Павлинин В.Н. Тобольский соболь // Тр. Ин-та биологии. Свердловск, 1963. Вып. 34. С. 1—112.
8. Рожнов В.В., Мещерский И.Г., Пищулина С.Л., Симакин Л.В. Генетический анализ популяций соболя и лесной куницы в районах совместного обитания на Северном Урале // Генетика. 2010. Т. 46. № 4. С. 488—492.
9. Domingo-Roura X. Genetic distinction of marten species by fixation of a microsatellite region // J. Mamm. 2002. Vol. 83. N 3. P. 907—912.
10. Davis C., Strobeck C. Isolation, variability and cross-species amplification of polymorphic microsatellite loci in the family Mustelidae // Mol. Ecol. 1998. Vol. 7. P. 1776—1778.
11. Fleming M.A., Ostrander E.A., Cook J.A. Microsatellite markers for American mink (*Mustela vison*) and ermine (*Mustela erminea*) // Mol. Ecol. 1999. Vol. 8. P. 1351—1362.
12. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. Vol. 155. P. 945—959.
13. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evolutionary Bioinformatics Online. 2005. Vol. 1. P. 47—50.
14. Пищулина С.Л., Мещерский И.Г., Рожнов В.В. Сравнительно-краниометрическая характеристика собо-

ля, лесной куницы и кидаса Северного Урала // Животный мир горных территорий: Мат-лы конф. / Под ред.

В.В. Рожнова, Ф.А. Темботовой, В.И. Ланцова, К.Г. Михайлова. М.: Т-во научных изданий КМК, 2009. С. 412—416.

Поступила в редакцию
31.05.12

ON THE PHENOTYPE AND GENOTYPE CORRELATION OF SABLE AND PINE MARTEN IN SYMPATRIC ZONE IN THE NORTHERN URALS

V.V. Rozhnov, S.L. Pishchulina, I.G. Meschersky, L.V. Simakin

Analysis of alleles frequencies of 9 microsatellite loci of nuclear DNA of sables and pine martens revealed that this species from allopatric parts of species range highly significantly distinguish but in the sympatric zone in the Northern Urals interspecific hybridization is common. Sable and pine marten populations in sympatric zone keep their genetic isolation, but phenotypes of individuals not always correlate with their species (or hybrid) belonging, defined by genetic method.

Key words: *microsatellites, sable, pine marten, hybridization.*

Сведения об авторах

Рожнов Вячеслав Владимирович — чл.-корр. РАН, докт. биол. наук, зав. лабораторией поведения и поведенческой экологии млекопитающих ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-495-952-73-05; e-mail: rozhnov.v@gmail.com

Пищулина Софико Левановна — аспирантка, мл. науч. сотр. лаборатории поведения и поведенческой экологии млекопитающих ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-495-952-77-97; e-mail: molecoldna@gmail.com

Мещерский Илья Григорьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-495-952-77-97; e-mail: molecoldna@gmail.com

Симакин Леонид Владимирович — науч. сотр. Печоро-Илычского государственного природного биосферного заповедника. E-mail: leonidsimakin@yandex.ru

ЭКОЛОГИЯ

УДК 595.733:574.24:57.031

**ФЛУКТУИРУЮЩАЯ АСИММЕТРИЯ ЖИЛКОВАНИЯ КРЫЛА
У СТРЕКОЗ *ISCHNURA ELEGANS* (V.D. LIND.)
(ODONATA, COENAGRIONIDAE) И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ЕЕ В КАЧЕСТВЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ИНДИКАТОРА
ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДОЕМОВ****Г.И. Рязанова, А.С. Полыгалов***(кафедра энтомологии; e-mail: RyazanovaGI@mail.ru)*

В целях биоиндикации среды в 2010—2011 гг. изучена флуктуирующая асимметрия (ФА) жилкования крыльев пяти популяций равнокрылой стрекозы *Ischnura elegans* (V.d. Lind.). Оценены ее сезонная и половая особенности. Обнаружено отсутствие корреляции разных характеристик ФА крыльев. Для объяснения разнонаправленных изменений ФА стрекоз изученных популяций под влиянием температурно-кислородного стресса 2010 г. предложена гипотеза дифференцированной смертности особей с расшатанной стабильностью развития. Поставлена под сомнение возможность использования ФА в настоящее время в качестве инструмента биомониторинга экологического состояния водоемов.

Ключевые слова: *стрекозы, флуктуирующая асимметрия, стресс, биоиндикация.*

Флуктуирующая асимметрия (ФА) — это незначительные и ненаправленные отклонения от строгой билатеральной симметрии биообъектов, являющиеся итогом стохастических микроскопических процессов. Возрастание величины случайной изменчивости развития является, видимо, следствием нарушения стабильности индивидуального развития в целом. Изучение ФА открывает возможности для оценки онтогенетических механизмов эволюционных преобразований [1—4]. Высказано мнение, что оценка ФА представляет собой простейший способ формализации степени отклонений природных популяций от нормы [5]. Показано, что ФА оказывается минимальной лишь при оптимальных условиях среды и неспецифически возрастает при любых стрессовых воздействиях [6, 7].

Такая связь ФА с экзогенными стрессами кажется удобной для решения практических задач в области охраны природы (как метод биомониторинга) [1].

В настоящее время системы мониторинга поверхностных пресных вод претерпели существенные изменения. Основа этих изменений — переход от чисто химического контроля к биологическому. Концепция предельно допустимой концентрации (ПДК) в системе экологического контроля уступает место системе использования биотестов [5, 8].

Большинство современных методов биоиндикации состояния водоемов основано на анализе видового состава макрозообентоса. Этот метод требует серьезных предварительных региональных исследований для установления состава фауны и ее дина-

мики при различных изменениях среды. Биоиндикация же по ФА кажется весьма заманчивым и относительно простым методом.

Однако точки зрения разных исследователей на возможности использования флуктуирующей асимметрии как биоиндикатора среды различаются. Экспериментальные данные в области связи ФА со средовыми стрессами весьма ограничены. Работы такого рода проводят чаще всего на насекомых, а в отношении водной среды — на стрекозах. Наряду с мнениями, поддерживающими такое использование ФА, существуют обоснованные возражения.

В частности, описана связь средового стресса и ФА некоторых морфологических черт *Drosophila* [7]. Делали попытки использования ФА для измерения стрессового состояния личинок стрекоз [9], имаго стрекоз [10, 11], клопов-солдатиков (*Pyrrhocoris apterus* L.) [12]. В то же время результаты исследования, проведенного на взрослой поденке (*Hexagenia rigida*), позволяют полагать, что влияние загрязнения на ФА сложно определить в поле [13]. Показано, что уровень загрязнения среды инсектицидом не связан с ФА крыла у стрекоз [14]. На основании развернутых экспериментов высказано мнение, что общепринятое использование у дрозофилы ФА как индикатора средового стресса должно применяться с осторожностью [15]. Что касается ФА крыльев у стрекоз, то скупы и противоречивы также литературные данные о сезонной и половой ее специфике.

В настоящей работе мы предполагали решить ряд вопросов, связанных с проблемой использо-

вания ФА в биомониторинге среды, в частности оценить половые особенности ФА крыльев и особенности ее сезонной динамики у стрекоз *Ishnura elegans*, определить сравнительную ФА крыльев у избранного вида в разных водоемах в два разных сезона на фоне температурно-кислородного стресса 2010 г. и оценить возможность использования ФА стрекоз как биоиндикатора экологического состояния водоема.

Материалы и методы

Основное место работы — водоемы Москвы, что связано с продолжающимся циклом исследований по фауне мегаполиса. Для изучения флуктуирующей асимметрии (ФА) крыльев стрекоз был избран вид *Ischnura elegans* (Van der Linden), широко распространенный в Москве и обладающий высокой плотностью популяционных группировок [16]. Эти стрекозы в природе не разлетаются от места выплода далее 400 м [17].

В работе использовали водоемы, расположенные в разных районах города и удаленные друг от друга не менее чем на 10 км: оз. Бездонное (Серебряный бор), Борисовский пруд и Большой Очаковский пруд. Кроме московских водоемов работу проводили на двух прудах, расположенных в сельской местности близ дер. Машково и в дачном поселке Терра Жуковского р-на Калужской обл. Московские пруды в разной степени подверглись инженерным преобразованиям, находятся в районах города, имеющих разную степень атмосферного и автотранспортного загрязнения, загрязнения бытовыми и промышленными стоками.

Сбор имаго стрекоз у каждого водоема проводили в последнюю декаду июля и первую декаду августа 2010 и 2011 гг. Из крыльев стрекоз были изготовлены тотальные препараты, которые с использованием сканирования переведены в цифровой формат и все дальнейшие подсчеты проведены с экрана

компьютера. Измерения линейных величин крыла проводили с использованием компьютерной программы ImageJ 1.40g.

Подсчитывали число ячеек крыльев. От использования в исследовании длины целого крыла и отдельных его частей пришлось отказаться, поскольку наблюдающаяся ФА длины очень мала и не выходит за пределы технических ошибок измерения. Подсчет ячеек крыла проводили по схеме, предложенной в работе академика А.В. Яблокова с соавторами [18]; по отдельным полям крыла, ограниченным продольными жилками и имеющим название расположенной впереди жилки. Крыло содержит 13 таких полей, и в 11 из них обнаружена ФА с различием в числе ячеек на правом и левом крыле от 1 до 9. Всего описано около 1500 крыльев более 350 особей стрекоз.

Из изученных характеристик ФА мы остановились на частоте ее встречаемости — числе асимметричных пар (левое-правое) полей относительно их общего числа в рассмотренных крыльях, и на степени асимметрии — числе случаев различий в асимметричных полях только на одну или на большее число ячеек. Чем больше различий на 1 ячейку, тем меньше степень асимметрии.

Результаты и их обсуждение

Характер ФА крыльев самцов *Ischnura elegans* из популяции “Терра” за 2011 г. свидетельствует о том, что ФА жилкования крыльев этих стрекоз не зависит от времени вылета в сезоне (табл. 1). Самцы, вылетающие в начале летного сезона — в середине июля, имеют достоверно большие линейные размеры крыльев и большее число ячеек в них, чем самцы конца сезона — середины августа. Тем не менее ФА этих стрекоз остается неизменной.

Полученные данные о половых особенностях изученных характеристик ФА неоднозначны для разных водоемов (табл. 2). В Борисовском пруду не об-

Таблица 1

Характеристики крыла у стрекоз *Ishnura elegans* популяции пруда Терра в начале и в конце сезонного лета имаго

Характеристика крыльев	Выборка от 14.07.2012 (n)	Выборка от 13.08.2012 (n)	Достоверность различия выборок
Число асимметричных пар полей — частота ФА	129 (220)	96 (176)	$\chi^2 = 0,7$ $P > 0,05$
Число полей с асимметрией в 1 ячейку — степень ФА	94 (220)	70 (176)	$\chi^2 = 0$ $P > 0,05$
Среднее общее число ячеек в переднем крыле особи — $M \pm m$ (число особей)	$142,7 \pm 1,4$ (40)	$125,6 \pm 1,9$ (32)	$P < 0,001$ $t_{st} = 6,21, P < 0,001$
Среднее общее число ячеек в заднем крыле особи — $M \pm m$ (число особей)	$139,3 \pm 2,8$ (40)	$122,7 \pm 2,6$ (32)	$P < 0,001$ $t_{st} = 6,4, P < 0,001$
Длина переднего крыла в пикселях — $M \pm m$ (число особей)	$725,47 \pm 6,3$ (40)	$658,6 \pm 7,8$ (32)	$t_{st} = 6,7, P < 0,001$
Длина заднего крыла в пикселях — $M \pm m$ (число особей)	$680,2 \pm 6,0$ (40)	$615,1 \pm 6$ (32)	$t_{st} = 7,6, P < 0,001$

Примечание. n — общее число рассмотренных пар полей крыльев.

Таблица 2

**Флуктуирующая асимметрия крыла
у самцов и самок стрекоз *Ishnura elegans* разных водоемов**

Водоемы	Характеристика крыльев		Достоверность различий
Борисовский пруд	Число асимметричных пар полей (n)	самцы	286 (440)
		самки	288 (418)
	Из них с различием в 1 ячейку	самцы	188
		самки	172
Оз. Бездонное	Число асимметричных пар полей (n)	самцы	220 (396)
		самки	162 (286)
	Из них с различием в 1 ячейку	самцы	167
		самки	101
Большой Очаковский пруд	Число асимметричных пар полей (n)	самцы	97 (179)
		самки	151 (235)
	Из них с различием в 1 ячейку	самцы	70
		самки	92

Примечание. n — общее число рассмотренных пар полей.

наружено значимых половых различий ФА. В то же время в водоеме Серебряного бора самки и самцы, не различаясь по количеству асимметричных полей, значимо различаются по степени асимметрии: у самок она больше. Напротив, в Б. Очаковском пруду самки и самцы достоверно различаются по количеству асимметричных полей (у самок их больше), но не различаются достоверно по степени асимметрии. Эти противоречивые данные подчеркивают необходимость сравнительного изучения ФА стрекоз в пределах каждого пола раздельно. Для стрекоз *Lestes viridis* также было показано, что самки более асимметричны, чем самцы [19]. Интересно, что эти данные расходятся с данными, полученными для

дрозофил, где самцы всегда более чувствительны к стрессам и имеют большую ФА [15].

Изучаемые характеристики ФА у самцов стрекоз разных водоемов также не дают однозначных результатов. Если согласиться с существующим в литературе мнением, что ФА тем больше, чем более условия существования популяции отличны от оптимума, то в 2010 г. Борисовский пруд, судя по частоте встречаемости ФА, оказался достоверно хуже оз. Бездонного и Б. Очаковского пруда (табл. 3). В то же время таких отличий по ФА Борисовского пруда — наихудшего водоема из изученных московских — от сельских водоемов не обнаружено. Пруд в Машкове по показателям ФА, так же как и Борисовский, оказался достоверно худшим, чем водоем Серебряного бора и Б. Очаковский пруд. Однако характеристика прудов как места обитания стрекоз по степени ФА дает отличные

результаты. По этому признаку Борисовский пруд также хуже оз. Бездонного, но, не отличаясь от Б. Очаковского, достоверно хуже обоих сельских прудов.

Таким образом, даже всего две характеристики ФА не позволяют однозначно распределить места обитания стрекоз по степени приближенности к экологическому оптимуму.

Особенности метеорологических условий 2010 г. позволили нам оценить природный эксперимент со средовым стрессом, воздействующим на популяцию изучаемого вида. Июль и август 2010 г. отличались рекордно высокими температурами, а лето в целом — засухой. В прудах, за которыми мы вели наблюдение, сильно понизился уровень воды и под-

Таблица 3

**Особенности частоты встречаемости флуктуирующей асимметрии жилкования крыльев
у самцов стрекоз *Ishnura elegans* разных популяций в 2010 г.**

№	Водоемы	Число пар полей	Число асимметричных пар полей (%)	Достоверность различий*	Число полей с асимметрией в одну ячейку (%)	Достоверность различий
I	Борисовский пруд	440	286 (65)	(I—II) $\chi^2 = 7,8$ $P < 0,01$ (I—III) $\chi^2 = 6,3$ $P < 0,05$ (II—V) $\chi^2 = 4,1$ $P > 0,05$ (III—V) $\chi^2 = 4,0$ $P > 0,05$	188 (66)	(I—II) $\chi^2 = 6,2$ $P < 0,05$ (I—IV) $\chi^2 = 3,8$ $P = 0,05$ (I—V) $\chi^2 = 5,1$ $P < 0,05$
II	Серебряный бор	396	220 (56)		167 (76)	
III	Большой Очаковский пруд	179	97 (54)		70 (72)	
IV	Пруд Терра	157	90 (57)		69 (77)	
V	Пруд Машково	165	107 (65)		83 (78)	

*В таблице приведены только достоверные различия, рассчитанные по абсолютным величинам; % приведены для наглядности различий.

нялась ее температура, что привело к сокращению количества растворенного кислорода и увеличению концентрации растворенных вредных веществ. То, что этот стресс сильно повлиял на популяции изучаемого вида, подтверждает значительное сокращение численности имаго на следующий год.

В литературе показано, что у стрекоз асимметрия крыльев не изменяется при влиянии стресса на последние возрасты личинок [14, 21]. В нашем случае стресс не повлиял на ФА имаго 2010 г., так как под его воздействие попали только старшие возрасты личинок. Но в том же 2010 г. этот стресс влиял на имаго стрекоз в период гаметогенеза, на эмбриогенез и на ранние возрасты личинок. Очевидно, что его воздействие на ФА крыльев можно было бы ожидать в следующем сезоне 2011 г., когда эти личинки превратились во взрослых насекомых. Но в 2011 г., в отличие от 2010 г., ни частота встречаемости, ни степень ФА крыльев стрекоз в разных водоемах достоверно не различалась (табл. 4). Таким образом, после влияния среднего стресса на стрекоз ФА крыльев у разных популяций сблизились.

Мы ожидали обнаружить послестрессовое увеличение ФА крыльев стрекоз во всех пяти водоемах. Однако оказалось, что частота ее встречаемости имеет значимое увеличение только у стрекоз Серебряного бора ($\chi^2 = 4,7$, $P < 0,05$). Такого изменения степени ФА не наблюдали даже у стрекоз Серебряного бора. В остальных прудах произошли только небольшие и разнонаправленные изменения.

Единственное объяснение наблюдаемому явлению, которое мы можем предложить, основано на различной смертности особей с расшатанной стабильностью развития еще на стадии личинки в сложных условиях стресса. Гипотеза о дифференцированной смертности особей насекомых с нарушенной в разной степени стабильностью развития уже была высказана в литературе, хотя экспериментальных подтверждений этой гипотезы получить не удалось [22]. Нам она помогает понять вероятные механизмы парадоксальных изменений ФА стрекоз в разных водоемах

в связи со стрессом. Смертность особей с более расшатанной стабильностью развития в хороших экологических условиях Серебряного бора ниже, чем в других прудах, что приводит к повышению здесь частоты встречаемости ФА. В неблагоприятных же водоемах такие особи не выживают, и относительное число их становится даже меньше. В итоге частота встречаемости ФА после стресса может упасть. Отсюда и сближение после стресса ФА крыльев у стрекоз Борисовского пруда и Серебряного бора.

Гипотеза дифференцированной смертности особей с расшатанной в разной степени стабильностью развития позволяет понять и наблюдаемую нами специфику половых различий ФА стрекоз. Не исключено, что существуют различия в смертности самок и самцов при одинаковой степени нарушения стабильности развития в зависимости от благоприятности среды. Как показано для дрозофилы [15], самцы более чувствительны к неблагоприятным условиям, их развитие легче поддается средовым нарушениям. При большей смертности самцов их остается меньше, чем самок с такой же ФА. В итоге ФА самок оказывается больше, чем у самцов.

Таким образом, две изученные характеристики ФА одной морфологической черты крыльев стрекоз (числа ячеек), очевидно, определяются многими факторами, если сильнейший кислородно-температурный стресс 2010 г. значимо не изменил общую ФА крыльев стрекоз в большинстве изученных водоемов. При этом на различные характеристики (частоту и степень), по-видимому, влияют разные факторы, так что они нередко заставляют делать противоположные выводы о степени близости условий обитания вида к оптимуму. Вероятно, ФА зависит от внешних влияний не столь прямо, как предполагают. Очевидно, непонимание механизмов ФА, которое существует в настоящий момент [22, 23], незнание, какие “стохастические микроскопические процессы” ее определяют, не дают возможности однозначно связывать ее со средовыми стрессами, тем более что у таких долго развивающихся насекомых,

Таблица 4

Флуктуирующая асимметрия жилкования крыльев у самцов стрекоз *Ishnura elegans* разных популяций в 2011 г.*

№	Водоемы	Число рассмотренных пар полей	Число асимметричных пар полей (%)	Число полей с асимметрией в одну ячейку (%)
I	Борисовский пруд	550	344 (62)	238 (69)
II	Серебряный бор	594	371 (62)	271 (73)
III	Большой Очаковский пруд	220	130 (59)	100 (77)
IV	Пруд Терра	373	235 (63)	164 (70)
V	Пруд Машково	132	81 (61)	56 (69)

*Достоверные различия между ФА водоемов не обнаружены, всегда $\chi^2 < 3,8$; $P > 0,05$.

как стрекозы, последствия стрессов окружающей среды отдалены от момента воздействия почти на год. Совершенно очевидно, что большую роль в понимании воздействия таких стрессов на ФА должно играть знание закономерностей дифференцированной смертности особей с разной степенью нарушения стабильности развития в отличающейся от оптимума среде обитания. Так что в области взаимодействия средовых стрессов и ФА крыльев стрекоз остается еще слишком много вопросов, что ставит под сомнение существующие предложения по использованию ФА стрекоз в качестве инструмента биомониторинга экологического состояния водоемов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров В.М. Асимметрия животных (популяционно-феногенетический подход). М.: Наука, 1987. 216 с.
2. Захаров В.М. Здоровье среды. М.: Центр экологической политики России, 2000. 30 с.
3. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И., Валецкий А.В., Кряжева Н.Г., Чистякова Е.К., Чубинишвили Ф.Т. Здоровье среды: методика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000. 68 с.
4. Гелашвили Д.Б., Чупурнов Е.В., Иудин Д.И. Структурные и биоиндикационные аспекты флуктуирующей асимметрии билатерально-симметричных организмов // Журн. общ. биол. 2004. Т. 65. № 5. С. 433—441.
5. Булгаков Н.Г. Индикация состояния природных экосистем и нормирование факторов окружающей среды: обзор существующих подходов // Усп. совр. биол. 2002. Т. 122. № 2. С. 115—135.
6. Parsons P.A. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress // Heredity. 1992. Vol. 68. P. 361—364.
7. Trotta V., Calboli F.C.F., Garoia F., Grifoni D., Cavicchi S. Fluctuating asymmetry as a measure of ecological stress in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) // Eur. J. Entomol. 2005. N 102. P. 195—200.
8. Семенченко В.П. Принципы и системы биоиндикации текучих вод. Минск: Орех, 2004. 124 с.
9. Chang X., Zhai B., Liu X., Wang M. Effects of temperature stress and pesticide exposure on fluctuating asymmetry and mortality of *Copera annulata* (Selys) (Odonata: Zygoptera) larvae // Ecotoxicol. and Environ. Safety. 2007. Vol. 67. N 1. P. 120—127.
10. Семенова В.Ф., Голуб В.Б. Результаты оценки состояния придонного слоя Воронежского водохранилища по показателям стабильности развития тест-объекта — стрекозы *Ischnura elegans* (Odonata, Coenagrionidae) // Проблемы водной энтомологии России и сопредельных стран: III Всерос. симпозиум по амфибиот. и водным насекомым. Воронеж: ВГУ, 2007. С. 296—302.
11. Carchini G., Chiarotti F., Domenico V. di, Paganotti G. Fluctuating asymmetry, size and mating success in males of *Ischnura elegans* (Van der Linden) (Odonata: Coenagrionidae) // Animal Behaviour. 2000. Vol. 59. N 3. P. 177—182.
12. Хорольская Е.Н. Экологический анализ флуктуирующей асимметрии в изменчивости элементов меланизированного рисунка покрова клопа-солдатика (*Pyrrhocoris apterus* L.) в различных экосистемах (на примере Белгородской области): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Белгород: БГУ, 2006. 24 с.
13. Dobrin M., Corkum L.D. Can fluctuating asymmetry in adult burrowing mayflies (*Hexagenia rigida*, Ephemeroptera) be used as a measure of contaminant stress? // J. Great Lakes Res. 1999. Vol. 25. N 2. P. 339—346.
14. 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. Applied Ecology. 1999. N 36. P. 534—543.
15. Vishalakshi C., Singh B.N. Effect of environmental stress on fluctuating asymmetry in certain morphological traits in *Drosophila ananassae*: nutrition and larval crowding // Canad. J. Zool. 2008. Vol. 86. N 9. P. 1084.
16. Рязанова Г.И., Устинова В.В. Стрекозы (Insecta, Odonata) в мегаполисе (на примере Москвы) // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2009. Т. 114. Вып. 4. № 55—62.
17. Conrad K.F., Willson K.H., Whitfield K., Harvey I.F., Thomas C.J., Sherratt Th.N. Characteristics of dispersing *Ischnura elegans* and *Coenagrion puella* (Odonata): age, sex, size, morph and ectoparasitism // Ecography. 2002. Vol. 25. P. 439—445.
18. Yablokov A.V., Eatin V.Ja., Pritikina L.N. Variability of wing venation of the dragonfly // Beitr. Ent. 1970. Vol. 5. N 6. P. 503—526.
19. De Block M., Campero M., Stocks R. Developmental costs of rapid growth in a damselfly // Ecol. Entomol. 2008. Vol. 33. N 2. P. 313—318.
20. Hardersen S., Frampton C.M. Effects of short term pollution on the level of fluctuating asymmetry — a case study damselflies // Entomol. Experiment appl. 1999. Vol. 92. N 1. P. 1—7.
21. Hardersen S., Wratten S.D. The effects of carbaryl exposure of the penultimate larval instars of *xanthocnemis zealandica* on emergence and fluctuating asymmetry // Ecotoxicology. 1998. Vol. 7. N 5. P. 297—304.
22. Hardersen S. The role of behavioural ecology of damselflies in the use of fluctuating asymmetry as a bioindicator of water pollution // Ecol. Entomol. 2000. Vol. 25. P. 45—53.
23. Dongen S.V. Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future // J. Evol. Biol. 2006. Vol. 19. N 6. P. 1727—1743.

Поступила в редакцию
19.06.12

**FLUCTUATING ASYMMETRY OF WING VENATION IN DAMSELFLIES
ISCHNURA ELEGANS (V.d. LIND.) (ODONATA: COENAGRIONIDAE)
AND PROSPECTS OF ITS USE AS A BIOLOGICAL INDICATOR
OF ECOLOGICAL QUALITY OF FRESH-WATER RESERVOIRS**

G.I. Ryzanova, A.S. Polygalov

For the bioindication of environment in 2010 and 2011 fluctuating asymmetry (FA) of wing venation in five populations of damselfly *Ischnura elegans* (V.d. Lind.) is studied. The seasonal and sexual features of FA are estimated. Absence is found of correlation to different descriptions in FA of wings. For explaining to of the differently directed changes FA of damselflies of the studied populations under influence of temperature-oxygen stress 2010 year the hypothesis of the differentiated

death rate of individuals is offered with shaky stability of development. Direct connection of FA of damselfly wings with environment stresses are called in a question as well as possibility to use her as an instrument of biomonitoring of the ecological quality of reservoirs.

Key words: *damselfly, fluctuating asymmetry, environment stress, bioindication.*

Сведения об авторах

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

Полыгалов Андрей Сергеевич — студент кафедры энтомологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-16-95; e-mail: ves_1982@mail.ru

УДК 574.587; 591.9(28) (571.14)

ФАУНА И СООБЩЕСТВА РЕОФИЛЬНОГО МАКРОБЕНТОСА ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ: ЭФФЕКТЫ КРУПНОМАСШТАБНОГО ЭКОТОНА

М.В. Чертопруд, Д.М. Палатов

(кафедра гидробиологии; e-mail: lymnaea@yandex.ru)

На оригинальных данных показано, что восточная часть Новосибирской обл. по реофильной фауне беспозвоночных является пограничным регионом между Западной и Восточной Палеарктикой, причем в его равнинных районах преобладает западнопалеарктическая фауна, а на Салаирском кряже западные и восточные элементы широко сочетаются. Наблюдается также расхождение этих фаун по типам сообществ и биотопов: в пело- и фитофильных сообществах преобладают виды Западной Палеарктики, и эти сообщества аналогичны европейским. В литофильных (ритральных) сообществах, напротив, доминируют восточносибирские виды. Описано 17 типов реофильных сообществ региона.

Ключевые слова: макробентос, реофильные сообщества, биогеография, Новосибирская область.

Правобережье Оби в Новосибирской обл. — во многих отношениях специфический регион, но не за счет собственных ландшафтных особенностей (это довольно типичная возвышенность средней полосы), а в контексте своего географического положения. Здесь граничат: огромный массив заболоченных низменностей Западной Сибири (с северо-запада), равнинные степи и соленые озера Казахстана (с юго-запада) и таежные предгорья Алтая. Между ними расположена относительно узкая полоса равнинных березняков и полей, похожих на таковые в южном Подмосковье. Таким образом, целый ландшафт помещен в условия крупномасштабного экотона, что может приводить к интересным экологическим и фаунистическим эффектам.

Фаунистические исследования отчасти отражают такое положение региона: примерно здесь многие авторы [1, 2] проводят границу Западной и Восточной Палеарктики (в зоогеографии это обычно граница подобластей). Здесь пролегают западные границы ареалов многих восточносибирских видов. Как правило, это горно-таежные, а из водных беспозвоночных — холодноводные ритральные виды, обитающие в быстрых реках и ручьях с каменистым дном. К западу на многие сотни километров (до Урала) нет ни горной тайги, ни быстрых чистых рек, так что этот эффект вполне очевиден. Кроме того, вдоль долины Оби встречаются относительно тепловодные виды ориентального происхождения, которых почти или совсем нет в Восточной Сибири, но есть на юге Дальнего Востока России и в Маньчжурии. Это, в частности, стрекозы *Macromia amphigena*, *Shaogomphus postocularis*, *Sympetrum croceolum* [3], ручейники *Gumaga orientalis*, *Oecetis brachyura* [4]; известны такие виды и для ряда других групп. Считается [5], что эти виды про-

никали сюда с юго-востока в периоды более мягкого климата, а затем вымерли во многих более восточных областях. Таким образом, кроме экотона здесь имеется и рефугиум восточноазиатской фауны.

В этой связи возникает вопрос, имеющий, по нашему мнению, общеэкологический интерес: как будут делить экологические ниши встречающиеся здесь фаунистические комплексы — равнинный лесостепной западносибирский (т.е. почти европейский), горно-таежный восточносибирский и равнинный дальневосточный? Будут ли они взаимодействовать в пределах одних сообществ, делить между собой биотопы одних и тех же водоемов или расходиться по разным водоемам и районам, образуя жесткую фаунистическую границу? Кроме того, интересно сравнить формирующийся здесь набор реофильных сообществ с таковым для “типичного” региона средней полосы — центра Европейской России, для которого у нас имеются соответствующие данные [6].

К сожалению, нам пока неизвестны фаунистические работы по пресноводным беспозвоночным региона, охватывающие все их группы; лишь частично этот пробел восполняют работы по равнинной части Алтайского края [7, 8]. Нет и работ по особенностям и структуре водных сообществ.

Цель настоящей работы — на собственных данных изучить разнообразие и особенности фауны и сообществ реофильного макробентоса востока Новосибирской области и проанализировать эти особенности путем сравнения с сообществами других изученных нами регионов.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили около 90 количественных и 40 качественных проб макробентоса,

собранных в мае—июне 2009 г. в ходе маршрутных исследований в бассейнах рек Ояш, Ташара, Порос на северо-востоке Новосибирской обл. (Мошковский и Болотнинский р-ны) и в бассейнах рек Бердь, Чем, Ик, Коен, Тальменка на юго-востоке области (Искитимский р-н). Количественные сборы проводились отдельно для всех донных и растительных субстратов каждого водотока с помощью скребка площадью 0,02 м², площадь пробы составляла 0,1 или 0,2 м² в зависимости от плотности бентоса. При качественных сборах (с целью поиска редких видов) биотопы не выделялись. Определение большинства форм проведено до видов; в некоторых группах — до родов. В качестве основного показателя обилия видов применялась интенсивность метаболизма, рассчитанная на основе биомассы и численности; фаунистическое сходство регионов оценивалось индексом Симпсона (только по качественным данным). Для классификации сообществ (по количественным данным) использовался модифицированный нами [6] метод Браун—Бланке.

Нужно кратко описать особенности изученного района и его водотоков. На большей части территории это холмистая равнина с перемежающимися мелколиственными (береза, осина) лесами, лугами и полями (часто заброшенными). Увлажненность местности невысокая, болот и озер мало, изредка встречаются сельские плотинные пруды, а также бобровые пруды на ручьях. Малые водотоки размывают плодородные темные почвы (вплоть до черноземов); песка и глины в размываемых породах мало (в отличие от Подмосковья). Вследствие этого водотоки относительно маловодны, но подвержены сильным паводкам, в целом мутны, глубоки и сильно заилены, а на перекатах заиленная галька встречается чаще, чем песок. Макрофиты развиваются слабо даже в довольно крупных реках. Повсеместно встречаются бобры, превращающие значительные участки водотоков в каскады узких мелких прудов, заваленных упавшими деревьями и ветками. В Восточной Европе водотоки подобного типа характерны для Калужской, Брянской, Липецкой и других “околочерноземных” областей. Только на юго-востоке района, у Салаирского края, дно малых рек становится отчасти каменистым, а сами водотоки — быстрыми и прозрачными, приобретая предгорный характер.

Результаты и обсуждение

Фауна и биогеография региона

В общей сложности в водотоках региона нами встречен 251 вид макробентоса, главным образом насекомых (198) и моллюсков (36). По типам ареалов наиболее разнообразны западнопалеарктические виды (около 120), но также довольно много восточнопалеарктических (45), а также транспалеарктов и голарктов (около 40, не считая таксоны, определенные только до рода). Среди “восточных” видов мож-

но выделить сибирские виды, характерные для Алтая и Прибайкалья и имеющие здесь западный край распространения (41 вид), и 3 вида с разорванными ареалами, характерные для Приамурья и Маньчжурии и имеющие здесь, видимо, островное местообитание (плавунец *Oreodytes jakovlevi*, стрекоза *Macromia amphigena*, ручейник *Gumaga orientalis*).

Для фаунистических сравнений мы используем базу данных, разработанную ранее для различных регионов Евразии [9, 10]. Фаунистическое сходство региона (индекс сходства Симпсона) с центром Европейской России составляет 0,76, с Тянь-Шанем — 0,06, с Алтаем — 0,46, с Приамурьем — 0,35. Таким образом, регион однозначно относится к Западной Палеарктике (сходство с Европейским регионом намного больше других). При этом целесообразно выделить здесь отдельной провинции по наличию существенного специфического элемента фауны (поскольку сходство ни с одним регионом не приближается даже к 0,9).

Однако можно рассматривать этот регион не как единый, а как имеющий границу между крупными биогеографическими выделами, т.е. как два субрегиона. По нашим наблюдениям, в северном субрегионе (район Ояш—Мошково) резко преобладают западные формы при общей бедности фауны. В южном субрегионе (район Искитим—Легостаево) и особенно у Салаирского края появляется крупная группировка сибирских ритральных видов. Фаунистическое сходство между субрегионами составляет 0,75, т.е. их различия довольно существенны, и уместно рассмотреть их биогеографическое положение отдельно.

Северный субрегион имеет фаунистическое сходство: с центром Европейской России 0,90, с Алтаем — 0,43, с Приамурьем — 0,26. Таким образом, это типичная Западная Палеарктика, и нет причин для выделения здесь даже провинции. Южный субрегион имеет сходство 0,68 с центром Европейской России, 0,53 — с Алтаем и 0,43 — с Приамурьем; именно он является переходным по фауне и тем не менее должен быть отнесен также к Западной Палеарктике (поскольку западный фаунистический комплекс в нем не замещен, а, скорее, дополнен восточным и преобладает по числу видов). Возможно, здесь имеет смысл выделить особой экотонной провинции. К сожалению, пока у нас нет достаточных фаунистических данных по другим районам Западной Сибири, чтобы подробнее рассмотреть биогеографию пресных вод этого региона.

Описание сообществ

Классификация методом Браун—Бланке позволила выделить в анализируемых пробах 17 вариантов сообществ, из которых шесть можно считать минорными (1—2 описания), а остальные встречаются достаточно часто. Большинство выделенных сообществ вполне однозначно связано с определенными комбинациями условий среды (биотопами), мы исполь-

зуем для них предложенную нами ранее [6, 11] биотопическую номенклатуру, но с некоторыми модификациями. Все выделенные сообщества сгруппированы в шесть классов: креналь (ручьевые сообщества смешанных грунтов), ритраль (сообщества плотных грунтов), фиталь (сообщества зарослей макрофитов), пелаль (сообщества мягких грунтов), рипаль (сообщества смешанных субстратов береговой зоны) и биаль (сообщества со сверхдоминированием эврибионтных видов). Все выделенные сообщества описаны ниже.

Креналь

Группа сообществ малых водотоков (ручьев и родников), преимущественно неспецифичных к типу донного субстрата. Все описанные сообщества региона ручьевые, а родниковых (эукренальных) сообществ обнаружено не было.

Гипокреналь (*Nemoura cinerea* — *Amphinemura* sp. — *Baetis ussuricus* — *Baetis feles*). Типичное сообщество маленьких (меженная ширина 0,3–1 м) постоянных ручьев, развивается на смешанных субстратах. При довольно высоком видовом разнообразии преобладают мелкие немуроидные веснянки (в целом те же, что в подобных сообществах Восточной Европы) и поденки рода *Baetis* (но восточносибирские виды). В отличие от европейской гипокренали здесь относительно редки ручейники-лимнефилиды. Кроме того, как и на Кавказе, во многих ручьях гипокреналь замещается сообществом гамма-рибиали (см. ниже).

Ксилокрень (*Gammarus lacustris* — *Halesus teselatus* — *Potamophylax rotundipennis* — *Baetis vernus*). Сообщество древесных объектов ручьев и малых рек характерно для северного субрегиона. Доминируют детритоядные ручейники сем. Limnephilidae европейского происхождения и эврибионтный бокоплав *Gammarus lacustris*; на второстепенных ролях довольно много поденок и веснянок.

Фитокреналь (*Cnetha* sp. — *Gammarus lacustris* — *Baetis vernus*). Сообщество малых водотоков, связанное с небольшими куртинами макрофитов на течении (обычно это *Veronica beccabunga*). Видовой состав обеднен; преобладают таксоны европейского происхождения. Сообщество близко к фитокренали Восточной Европы, за исключением большого влияния бокоплавов *G. lacustris*.

Палудокреналь (*Siphonurus alternatus* — *Cloeon dipterum* — *Nemoura cinerea*). Относительно редкий тип сообщества встречается в заболоченных ручьях на слабом течении и заиленных субстратах. Весной доминируют поденки рода *Siphonurus* при общей бедности видового состава, летом возможна деградация сообщества, связанная с полной потерей проточности. В Подмоскovie подобные сообщества также встречаются, но они заметно богаче видами, вероятно, в силу более мягкого климата и соответственно большего постоянства ручьев.

Ритраль

Группа сообществ на плотных (главным образом каменистых) субстратах в различных водотоках.

Эпиритраль (*Rhyacophila sibirica* — *Baetis* spp. — *Ephemerella triacantha* — *Rhithrogena cava* — *Amphinemura* sp. — *Gammarus lacustris*). Сообщество каменистых перекатов ручьев и самых малых рек (шириной примерно до 5 м, водорасходом до 0,5 м³/с). Доминирование выражено относительно слабо, видовой состав богат и довольно изменчив (только род *Baetis* представляют четыре вида), широко смешиваются западнопалеарктические эврибионтные виды (*Gammarus lacustris*, *Baetis vernus*, *Dicranota bimaculata*) и восточные ритральные (*Rhyacophila sibirica*, *Rhithrogena cava*, *Ephemerella triacantha*, *Epeorus pellucidus*, *Baetis ussuricus*, *B. ursinus* и др.). В целом восточносибирская группировка превалирует, а специфические ритральные виды представлены только ею. В Восточной Европе подобные сообщества укомплектованы европейскими видами тех же родов (*Baetis rhodani*, *Rhyacophila fasciata* и др.), а также не присутствующими в Сибири формами (улитка *Ancylus fluviatilis*, ручейники *Potamophylax latipennis*, *Silo pallipes*). Более близкие по структуре эпиритральные сообщества описаны нами [12] для низкогорий Западного Кавказа — в них также много поденок-гептагенид, характерно внедрение бокоплавов рода *Gammarus* и почти нет моллюсков.

Эурираль (*Ephemerella lenoki* — *Hydropsyche pellucidula* — *Ephemerella lepnevae* — *Atherix ibis* — *Rhyacophila angulata* — *Baetis ursinus* — *Orthocladus* spp.). Сообщество каменистых перекатов малых рек, встречается в районе Салаирского края в водотоках предгорного характера шириной 5–15 м и водорасходом до 5 м³/с. Видовой состав богат, большую роль играют два западных ритральных вида (*Hydropsyche pellucidula* и *Atherix ibis*), но гораздо более разнообразны и значимы восточносибирские виды поденок (особенно рода *Ephemerella*), ручейников и веснянок. Именно поденки *Ephemerella* (*E. lenoki*, *E. lepnevae*, *E. Triacantha*), снабженные плотными покровами и приспособленные к обитанию на омываемом быстрым течением камнях, замещают европейских панцирных ритральных соскребателей (моллюсков и ручейников). В остальном сибирские эуриральные сообщества довольно близки к таковым Европы и Кавказа.

Ксилоритраль (*Rhyacophila sibirica* — *Odagmia* sp. — *Rhithrogena cava* — *Epeorus pellucidus*). Сообщество древесных объектов малых рек, преимущественно в районе Салаирского края (южный субрегион). Имеет в основном восточносибирский фаунистический облик, структурно близко к сообществу эпиритрали этого района, а севернее обычно замещается сообществом ксилокрень с доминированием западнопалеарктических ручьевых видов.

Фиторитраль (*Baetis vernus* — *Odagmia* sp.). Сообщество макрофитов на быстром течении малых

рек, обедненное по видовому составу и укомплектованное не фитальными, а ритральными формами (доминируют плавающие поденки и личинки мошек, на вторых ролях поденки рода *Ephemerella*, ручейники *Hydroptila*, *Halesus*). Имеет близкие аналоги в Европейской России, хотя среди второстепенных видов есть и восточносибирские.

Лимногеноритраль (*Shoenbaueria pusilla* — *Baetis pseudothemicus* — *Orthocladinae* spp.). Развивается на камнях в ручьях и малых реках, вытекающих из крупных прудов, с относительно теплой и богатой фитопланктоном водой. Доминируют достигающие большой плотности личинки мошек, главным образом *Shoenbaueria pusilla*, фильтрующие фитопланктон. Кроме того, сообщество комплектуется более тепловодный вид поденок (*B. pseudothemicus*), в мощных обрастаниях камней много хирономид рода *Orthocladus* и встречаются шаровки *Sphaerium westerlundii*; остальные виды в целом типичны для местной эфиритрали.

Фиталь

Сообщества зарослей макрофитов на замедленном течении.

Эуфиталь (*Lymnaea fragilis* — *Bithynia tentaculata*). Довольно редкое в регионе сообщество, встречается в густых зарослях макрофитов в равнинных реках северного субрегиона. При довольно большом видовом разнообразии преобладают брюхоногие моллюски родов *Lymnaea*, *Bithynia*, *Anisus*. Из второстепенных видов характерны поденки *Cloeon dipterum*, стрекозы рода *Coenagrion*, клопы (*Plea minutissima*, *Cymatia coleoptrata*, *Ilyocoris cimicoides*) и жуки (*Laccophilus minutus*, *Noterus crassicornis*, *Haliphus* spp. и др.). Сообщество укомплектовано видами европейского происхождения и сходно с фитальными сообществами Восточной Европы.

Пелаль

Группа сообществ мягких (илистых и песчаных) грунтов.

Эпипелаль (*Fleuria lacustris* — *Sphaerium westerlundii* — *Pseudeupera* spp. — *Limnodrilus* sp. — *Cryptochironomus* sp.). Сообщество илистых грунтов малых рек на слабом течении, иногда в заводях. Преобладают широко распространенные таксоны хирономид, олигохет и горошинок, хотя конкретный видовой состав весьма изменчив. В Восточной Европе распространены похожие сообщества, но обычно с другими (хотя и близкими) доминирующими видами.

Псаммоэпипелаль (*Dicranota bimaculata* — *Ephemera orientalis* — *Pisidium amnicum* — *Odontomesa fulva* — *Prodiamesa olivacea*). Сообщество умеренно заиленного песчаного грунта малых рек, укомплектовано в основном общепалеарктическими видами инфауны; аналогично подмосковным сообществам

этого биотопа (за исключением замещения видов в роде *Ephemera*).

Рипаль

Группа сообществ, характерная для смешанных субстратов вдоль береговой линии рек и укомплектованная главным образом эврибионтами из других классов сообществ.

Ризорипаль (*Halesus tessellatus* — *Baetis pseudothemicus* — *Baetis vernus* — *Anabolia servata* — *Limnephilus rhombicus*). Сообщество береговой кромки подмываемых берегов, где среди субстратов преобладают корни и побеги наземной растительности. Доминируют ручейники-лимнефилиды и плавающие поденки рода *Baetis*; характерные для ризорипали Подмосквы стрекозы встречаются редко.

Пелорипаль (*Cloeon luteolum* — *Micronecta griseola* — *Siphonurus aestivalis*). Сообщество заиленной травянистой растительности на прибрежных мелководьях при ослабленном течении, часто обсыхающей летом. Преобладают подвижные поденки и клопы европейского происхождения. Аналогичное сообщество известно для Подмосквы.

Биаль

Так мы называем класс сообществ, сформированных не на основе конкретного биотопа, а в результате внедрения в водоток какого-либо эврибионтного вида макробентоса, склонного к образованию популяций высокой плотности (обычно из высших ракообразных или моллюсков). Для таких сообществ характерна высокая степень доминирования, высокая стабильная биомасса и способность населять различные биотопы [6, 11].

Гаммаробияль (*Gammarus lacustris*). Сообщество ручьев и малых рек северного субрегиона, развивается на различных субстратах, встречается очень часто. Отличается резким (обычно 60–90% суммарного метаболизма) доминированием бокоплава *Gammarus lacustris*. Другие виды не играют существенной роли. Подобные сообщества редки для средней полосы Восточной Европы, но характерны для ее южной (черноземной) полосы, и очень близкие сообщества (с доминированием других видов рода *Gammarus*) типичны для низкогорных районов Кавказа, Крыма, Карпат и других южноевропейских регионов [10].

Обская гаммаробияль (*Gmelinoides fasciatus* — *Gammarus lacustris* — *Heptagenia fuscogrisea*). Развито на заиленных корнях, траве и детрите вдоль береговой линии Оби, в основном укомплектовано двумя видами бокоплавов-гаммарид — местным *Gammarus lacustris* и акклиматизированным из Байкала *Gmelinoides fasciatus*. Как и типичная гаммаробияль, это сообщество с высоким обилием и доминированием, слабо привязано к конкретному биотопу.

Обская мизидобияль (*Neomysis awatchensis* — *Ephemera lineata*). Характерна для заиленных галеч-

ных грунтов на мелководье Оби, отличается резким доминированием акклиматизированной с Дальнего Востока мизиды *Neomysis awatchensis*. Прямые аналогии в других регионах нам неизвестны.

Заключение: особенности структуры реофильных сообществ региона

Как видно, описанные сообщества образуют две основные группы, региональные особенности которых проявляются принципиально по-разному. Первая группа — фито- и пелофильные сообщества, в составе которых доминируют западнопалеарктические виды, и сами эти сообщества близки к таковым Восточной Европы. Выявленный спектр разнообразия этих сообществ существенно меньше, чем в Подмоскovie; это объясняется отчасти недостаточным объемом наших данных по Новосибирской обл. (например, почти нет данных по средним рекам), отчасти ландшафтно-климатическими особенностями региона (в частности, хуже развиты песчаные грунты на дне рек и заросли макрофитов). Вторая группа — ритральные сообщества, в которых доминируют виды восточнопалеарктического комплекса. Они резко отличаются от сообществ аналогичных биотопов Восточной Европы, в первую очередь по видовому составу, но также и по роли, выполняемой основными ритральными семействами и родами. Например, здесь резко усиливаются позиции поденок семейств *Herptageniidae*, *Ephemerellidae* и мошек *Simuliidae*; но исчезают массовые в Европе моллюски *Ancylus* и ряд групп ручейников. Особенно специфичны так называемые лимногеноритральные сообщества с резким доминированием личинок мошек; по непонятной нам причине мошки в Сибири часто достигают высокой численности, а в Европе — нет. И в кренали и в ритрале Новосибирской обл. часто встречаются локусы с высокой (3000—6000 экз./м²) плотностью личинок мошек родов *Odagmia*, *Cnetha* и *Schoenbaueria*.

Мы отдельно оценили фаунистическое сходство с сопредельными регионами для фаунистических комплексов сообществ различных классов. Для фауны мягких грунтов, макрофитов и рипали сходство с центром Европейской России составляет в среднем 0,91, с Алтаем — 0,44 и с Приамурьем — 0,25. Для фауны ритрала эти значения равны соответственно 0,28, 0,67 и 0,69. Таким образом, фаунистически ритральные сообщества относятся к Восточной Палеарктике, и формальная биогеографическая граница здесь локализована экологически — между сообществами мягких грунтов (западными по структуре и фауне) и ритральными сообществами (имеющими восточнопалеарктическую природу). Впрочем, несколько европейских видов все же проникают в местную ритраль и придают ей заметные отличия от таковой Алтая и более восточных регионов.

Биогеография кренальных (а также биальных) сообществ не поддается однозначной трактовке. В них западные и восточные виды комбинируются в различных пропорциях, но чаще всего доминирует эврибионтный западнопалеарктический бокоплав *Gammarus lacustris*, формируя собственный тип сообществ (так называемую гаммаробиаль). Сообщества с доминированием разных видов рода *Gammarus* встречаются по ручьям и малым рекам всего юга Палеарктики, главным образом в предгорьях и невысоких горах. Кроме того, в Новосибирской обл. не удалось выявить эукренальные (родниковые) сообщества; возможно, они очень редки или специфично локализованы.

Строго говоря, сравнение сообществ Новосибирской обл. с подмосковными не позволяет полностью отделить биогеографические эффекты от ландшафтно-климатических. Как показано выше, эти регионы не резко, но заметно различаются по климату, рельефу, геологии и гидрологии водотоков. Чтобы проработать этот вопрос более корректно, нужны данные по реофильным фаунам и сообществам других регионов умеренной зоны, которыми мы пока не располагаем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Старобогатов Я.И. Фауна моллюсков и зоогеографическое районирование континентальных водоемов земного шара. Л.: Наука, 1970. 371 с.
2. Moor F., Ivanov V. Global diversity of caddisflies (Trichoptera: Insecta) in freshwater // Hydrobiologia. 2008. Vol. 595. P. 393—407.
3. Kosterin O. Western range limits and isolates of eastern odonate species in Siberia and their putative origins // Odonatologica. 2005. Vol. 34. N 3. P. 219—242.
4. Beketov M., Ivanov V. New data on the caddisflies (Trichoptera) of south-western Siberia // Braueria. 2004. Vol. 31. P. 26—28.
5. Мартынов А.В. Экологические предпосылки для зоогеографии пресноводных бентонических животных // Рус. Зоол. журн. 1929. Т. 12. Вып. 3. С. 3—34.
6. Чертопруд М.В. Разнообразие и классификация реофильных сообществ макробентоса средней полосы Европейской России // Журн. общ. биологии. 2011. Т. 72. № 1. С. 51—73.
7. Безматерных Д.М. Зообентос как индикатор экологического состояния водных экосистем Западной Сибири (аналитический обзор). Новосибирск: Изд-во Ин-та водных и экологических проблем СО РАН, 2007. 87 с.
8. Безматерных Д.М. Зообентос равнинных притоков Верхней Оби. Барнаул: Изд-во Алтайск. ун-та, 2008. 186 с.
9. Чертопруд М.В. Биогеографическое районирование пресных вод Евразии по фауне макробентоса // Журн. общ. биологии. 2010. Т. 71. № 2. С. 144—162.
10. Чертопруд М.В., Песков К.В. Биогеография реофильного макробентоса Юго-Восточной Европы // Журн. общ. биологии. 2007. Т. 68. № 1. С. 52—63.
11. Чертопруд М.В. Альтернативные стратегии формирования реофильных сообществ макробентоса: Тез. Всерос. конф. “Экология малых рек в XXI веке: биоразно-

образии, глобальные изменения и восстановление экосистем”. Тольятти: Изд-во ИБВВ РАН, 2011. С. 84.

12. Чертопруд М.В. Реофильные сообщества макробентоса Северо-Западного Закавказья // Мат-лы IV Все-

рос. симпози. по амфибиотическим и водным насекомым и X Трихоптерологического симпози. Владикавказ: Изд-во СОГУ, 2010. С. 131–135.

Поступила в редакцию
01.06.10

MACROSCALE ECOTON EFFECTS FOR THE STREAM MACROBENTHIC FAUNA AND COMMUNITIES OF THE EAST NOVOSIBIRSK REGION

M.V. Chertoprud, D.M. Palatov

We propose on the original data that the east part of the Novosibirsk region is boundary region between Western and Eastern Palearctic for the stream and river invertebrates. The western (European) faunistical elements are prevails in the flat areas, and the East-Siberian and western species are widely coexistent in the Salair elevation. Moreover, the western species prevails in the soft-bottom and phytal communities, and these communities are similar to the European. The East-Siberian species prevails in the rhithral (hard-bottom) communities, and partly in krenal communities. We describe the 17 regional types of the stream communities.

Key words: *macrobenthos, stream communities, biogeography, Novosibirsk region.*

Сведения об авторах

Чертопруд Михаил Витальевич — канд. биол. наук, доц. кафедры гидробиологии МГУ. Тел.: 8-910-414-47-67, 8-499-201-75-70, 8-495-939-25-73; e-mail: lymnaea@yandex.ru

Палатов Дмитрий Михайлович — науч. сотр. кафедры гидробиологии МГУ. Тел.: 8-916-556-94-96, 8-495-706-61-69, 8-495-939-25-73; e-mail: ametropus@gmail.com

ФЛОРА, ФАУНА

УДК 581.815

**АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ
ЛИСТЬЕВ *LOLIUM PERENNE* L., СФОРМИРОВАВШИХСЯ
ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИДРАЗИДА МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ****И.А. Тиханков***(кафедра физиологии и интродукции растений**Днепропетровского национального университета им. О. Гончара; e-mail: 24traven@ukr.net)*

Показано, что при обработке семян райграса гидразидом малеиновой кислоты глубина и диапазон реакции основных структурных элементов возрастают с увеличением порядкового номера листа и определяются стадией его развития на момент аппликации препарата. Установлено, что изменение продолжительности обработки более эффективно, чем увеличение концентрации препарата, и может приводить как к угнетению, так и к усилению развития листа и его проводящей системы. Обсуждается связь между анатомическими изменениями структуры листа под действием ГМК и работой генома.

Ключевые слова: проводящая система, флоэма, ксилема, морфогенез, гидразид малеиновой кислоты, райграсс.

Изучение закономерностей формирования тканей и органов растительных организмов является одной из наиболее актуальных задач физиологии растений. Такие исследования открывают возможность управления процессом морфогенеза, что позволяет получать организмы с желаемыми свойствами. Реализовать этот подход можно, обрабатывая растения физиологически активными веществами в определенные моменты их развития [1, 2]. Глубина таких преобразований зависит от способа воздействия на регуляторные системы, его избирательности и силы, а также от состояния самого растения на момент обработки.

Одним из инструментов такого воздействия могут быть вещества, оказывающие влияние на генетическую систему регуляции. Поскольку сам по себе морфогенез является следствием последовательного переключения генов [3], то результат обработки будет во многом определяться временем и продолжительностью аппликации препарата.

Особый интерес представляют проводящие пучки, так как их развитие контролируется разными группами генов, которые последовательно включаются в этот процесс, начиная с момента закладки примordia и заканчивая формированием структуры мезофилла, присущего развитым листовым пластинкам [3]. Следует также учитывать, что в обкладках проводящих пучков синтезируется микроРНК, которая принимает непосредственное участие в морфогенезе и роль которой в этом процессе остается еще недостаточно изученной [4]. Кроме того, путем изменения строения транспортной системы можно косвенно влиять на развитие и функционирование других структурных элементов растений.

Целью настоящей работы было изучение возможностей регуляции формирования проводящих пучков в листьях *Lolium perenne* L. путем предварительной обработки семян слабым мутагеном — гидразидом малеиновой кислоты (ГМК).

Объекты и методы

Объектом исследования стала проводящая система трех первых листьев райграса (*L. perenne*), начинающих свое формирование в разные периоды онтогенеза [5]. В качестве инструмента воздействия на генную систему регуляции был выбран гидразид малеиновой кислоты — препарат, обладающий слабыми мутагенными и кластогенными свойствами [6]. Выбор *L. perenne* обусловлен тем, что это растение имеет определенные преимущества по сравнению с традиционно используемыми в исследованиях арабидопсисом, рисом, кукурузой и др. [7].

Опыты проводились на сортах Rapid и Saki-ni, отличающихся друг от друга по реакции на ГМК [8]. Растворы препарата готовились в концентрации 0,0005 и 0,008%. Обработка семян проводилась в течение 24 и 48 ч. Для контроля семена выдерживались в дистилляте. Условия обработки, выращивания растений и методика подготовки препаратов к микроскопии описаны ранее [8]. Постоянные препараты изучались на микроскопе “Биолам” с микрофотонасадкой МФН-12. После оцифровки изображения проводилась морфометрия с использованием программы ImageJ. Определялась площадь центрального и латерального проводящих пучков, их внешних обкладок, а также проводящих элементов

ксилемы и флоэмы. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась в программе Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В листьях *L. perenne* обычно находится пять продольных проводящих пучков, отличающихся между собой размерами и степенью развития структурных элементов. Наиболее развит центральный пучок. Он формируется раньше других [5] и достигает наиболее высокого уровня дифференциации. Латеральный пучок значительно меньшего диаметра, а на его поперечных срезах иногда тяжело идентифицировать отдельные типы клеток. Расположенный между ними 2-й пучок чрезвычайно слабо дифференцирован. Кроме того, в зерновках *L. perenne* находятся два листа, начавших свое формирование в эмбриональном периоде, а третий представлен только слабо развитым примордием [5]. Все это дает возможность предположить, что варьирование продолжительности обработки препаратом приведет к тому, что под воздействием ГМК окажутся разные группы генов, обеспечивающих формирование проводящей системы в отдельных листьях и их частях.

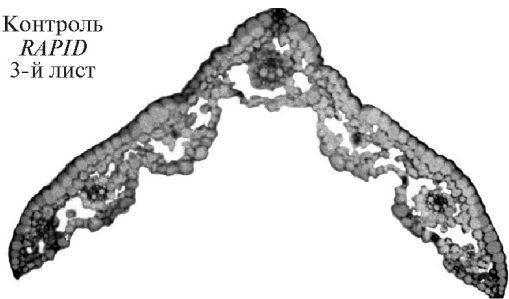
Первым свидетельством правильности такого подхода стал факт изменения количества проводящих пучков в зависимости от концентрации раствора ГМК и продолжительности его аппликации (табл. 1).

Количество проводящих пучков в листьях *L. perenne*

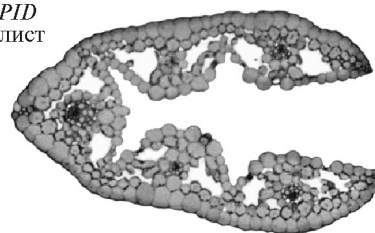
Сорт	Лист	Вариант обработки			
		контроль	ГМК 0,0005 × 24	ГМК 0,008 × 24	ГМК 0,008 × 48
Rapid	1-й	5	5	5	5
	2-й	5—6	5—6	5—6	6
	3-й	5—6	5—6	6	9
Sakini	1-й	3—4	3—4	3—4	3—4
	2-й	5	5	5	6
	3-й	5	6	6	6

Эти данные показывают, что 1-й лист оказался нечувствительным к действию препарата, а наиболее значительные изменения произошли в 3-м листе, который на момент обработки еще не начал формироваться. Промежуточное положение занимает 2-й лист, у которого количество проводящих пучков увеличивалось только в случае интенсивной обработки семян, предполагающей сочетание высокой концентрации препарата и длительной 48-часовой обработки. В 3-м листе наблюдалось возрастание количества пучков уже при использовании низкой концентрации ГМК в течение 24 ч (сорт Sakini). Все эти изменения сводились к стабильному формированию чрезвычайно слабо дифференцированного пучка малого диаметра в крайней дистальной зоне листовой пластинки, сразу за латеральным пучком. Наиболее поразитель-

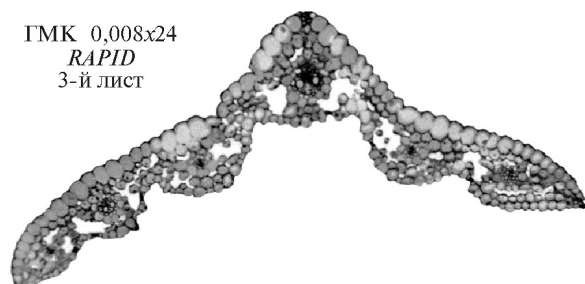
Контроль
RAPID
3-й лист



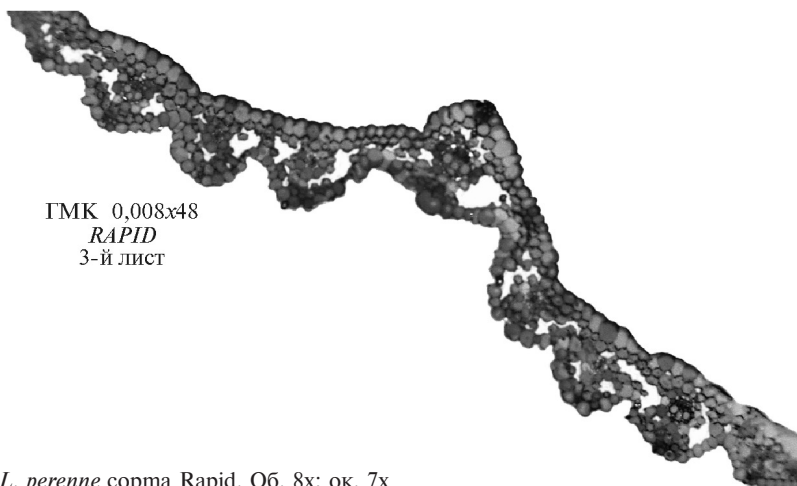
ГМК 0,0005x24
RAPID
3-й лист



ГМК 0,008x24
RAPID
3-й лист



ГМК 0,008x48
RAPID
3-й лист



ный результат был получен для 3-го листа сорта Rapid: при интенсивной обработке количество пучков возросло до девяти (рисунок). Все они были малого диаметра и слабо дифференцированы.

Таким образом, препарат наиболее эффективен тогда, когда его аппликация совпадает с начальными этапами формирования/развития примордия 3-го листа. Хорошо известно, что место закладки проводящих пучков у однодольных определяется именно в этот момент работой генов *PNH* [3], которые несколько позднее переходят в состояние молчания, а вместо них подключаются гены группы *TERMINAL EAR 1*, *KNOX* и др. [3, 9], определяющие характер развития отдельных структурных элементов, но не саму возможность появления пучка. Поэтому можно предположить, что в 1-м листе *L. perenne* на момент обработки экспрессия генов типа *PNH* уже завершилась. Отсутствует она и во 2-м листе, но возможно, что при определенных условиях некото-

рые из этих генов могут оказаться под воздействием ГМК. В 3-м листе эти гены находятся в активном состоянии, благодаря чему доступны молекулам ГМК. Что касается межсортных отличий по 3-му листу, то их можно объяснить, исходя из временных различий в закладке проводящих пучков у Rapid и Sakini и генетически обусловленной чувствительности к препарату.

Для анализа реакции отдельных тканей на действие ГМК удобно пользоваться не абсолютными величинами площади структурных элементов на поперечных срезах, а относительными. Для этого вводится коэффициент физиологической активности препарата (КФА), который определяется делением площади конкретной структуры в опытном варианте к ее площади в контроле [10].

Полученные результаты (табл. 2) демонстрируют зависимость реакции проводящей системы от способа обработки семян, стадии развития проводящих

Таблица 2

Коэффициент физиологической активности ГМК по отношению к проводящим пучкам *L. perenne*

Лист	Сорт	Параметр	Вариант обработки					
			ГМК 0,0005 × 24		ГМК 0,008 × 24		ГМК 0,008 × 48	
			центр. пучок	латер. пучок	центр. пучок	латер. пучок	центр. пучок	латер. пучок
1-й	Rapid	Весь пучок	0,85	0,89	0,85	1,12	0,87	0,86
		Обкладка пучка	0,88	0,66	0,91	0,75	0,98	0,88
		Ксилема	0,95	0,94	0,81	1,64	1,03	0,95
		Флоэма	0,85	0,61	0,70	0,52	1,02	0,54
	Sakini	Весь пучок	0,94	0,82	0,77	0,78	0,85	0,63
		Обкладка пучка	0,75	0,75	0,73	0,75	0,86	0,72
		Ксилема	0,81	0,58	0,70	0,50	0,51	0,29
		Флоэма	0,78	0,73	0,59	0,57	0,45	0,57
2-й	Rapid	Весь пучок	1,15	0,74	1,08	0,85	1,00	1,06
		Обкладка пучка	0,93	1,11	0,92	1,41	0,85	1,66
		Ксилема	0,96	—	0,82	—	0,90	—
		Флоэма	1,28	0,81	1,42	0,87	1,09	0,72
	Sakini	Весь пучок	0,67	1,16	0,99	1,24	0,85	0,97
		Обкладка пучка	0,60	0,99	0,92	0,93	0,81	0,79
		Ксилема	0,69	—	0,94	—	0,79	—
		Флоэма	0,60	0,75	0,82	1,05	0,78	1,01
3-й	Rapid	Весь пучок	0,97	0,76	1,02	0,69	1,35	—
		Обкладка пучка	1,07	1,28	1,20	1,09	1,12	—
		Ксилема	0,64	—	0,85	—	1,39	—
		Флоэма	0,83	0,82	0,83	0,57	1,50	—
	Sakini	Весь пучок	1,02	0,92	1,03	0,96	0,88	0,89
		Обкладка пучка	0,79	1,02	0,94	1,29	0,63	0,85
		Ксилема	0,96	0,88	1,00	0,88	0,70	0,71
		Флоэма	0,83	0,71	1,13	1,24	0,95	0,99

пучков и листьев на момент аппликации препарата, а также сортовых особенностей растений.

В первую очередь необходимо отметить, что иногда структурный элемент может реагировать только на само присутствие ГМК, но не на изменение его концентрации или продолжительность обработки. Это касается, например, центрального пучка 1-го листа *Rapid*, площадь которого уменьшилась приблизительно на 15%. Подобную ригидность проявляет в этом листе того же сорта менее дифференцированный латеральный пучок. Однако при определенной концентрации ГМК (0,008%) и непродолжительной обработке наблюдалось увеличение его размеров по сравнению с контролем на 12%. Длительная обработка такой эффект нивелировала. Вероятно, для достижения положительного результата необходима точная подборка концентрации и узкий временной интервал обработки, что, вероятно, связано с последовательной работой генов в онтогенезе. Для сорта *Sakini* характерна большая лабильность проводящих пучков 1-го листа, особенно менее дифференцированного латерального. Однако с повышением порядкового номера листа наблюдалось отсутствие реакции либо на изменение концентрации ГМК (флоэма центрального пучка 3-го листа *Rapid*), либо на продолжительность обработки (флоэма латерального пучка 2-го листа *Sakini*). Как правило, изменение продолжительности аппликации было более эффективным, чем изменение концентрации, что максимально проявилось в 3-м листе обоих сортов, который в момент обработки, в отличие от первых двух листьев, был представлен примордием. Учитывая полученные ранее результаты [8], сводить увеличение продолжительности обработки к простому повышению содержания препарата в тканях нельзя.

Концентрация 0,008% является пороговой, ее превышение ведет к резкому угнетению развития независимо от длительности аппликации ГМК и сортовых особенностей растений [8]. Следствием длительной (48-часовой) обработки этим раствором был слабый ретардантный эффект (*Sakini*), усиливающийся с повышением порядкового номера листа, но также наблюдалась значительная стимуляция развития (3-й лист *Rapid*). Важным моментом является то, что с возрастанием порядкового номера листа увеличивается разнообразие и диапазон реакции на ГМК. То есть препарат наиболее эффективен при его применении на ранних этапах развития органов.

Что касается проводящих элементов ксилемы и флоэмы, то их реакция часто не является идентич-

ной. В зависимости от способа обработки более сильное влияние испытывала или ксилема, или флоэма. Если сравнивать реакцию этих тканей на ГМК в отдельных листьях, то в 1-м и 3-м их площадь на поперечных срезах как в центральном, так и в латеральном пучке изменялась одинаково — уменьшалась или возрастала. Но для 2-го листа было характерно усиление развития, например, флоэмы в одном пучке и его угнетение в другом. Это может свидетельствовать о том, что гены, отвечающие за формирование флоэмы, наиболее уязвимы по отношению к ГМК в том узком временном интервале, в котором находился 2-й лист на момент обработки.

Следует отметить, что при значительном уменьшении площади этих двух тканей площадь самого пучка может измениться в значительно меньшей степени (центральный пучок 3-го листа обоих сортов). Это указывает на особую роль паренхимных элементов и внутренней обкладки в стабилизации размеров пучка. Такой результат может свидетельствовать о защитной реакции растения на действие чужеродного фактора, что проявляется на анатомическом уровне. Этот эффект отсутствует в 3-м листе при длительной обработке семян. Очевидно, что 48-часовая обработка дестабилизирует системы регуляции морфогенеза тем сильнее, чем больше порядковый номер листа. У сорта *Sakini* такая дестабилизация проявилась в сильном угнетении развития, а у сорта *Rapid* — в чрезвычайно интенсивном развитии 3-го листа [8] и его структурных элементов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что применение ГМК на ранних стадиях формирования органов и тканей приводит к более значительным перестройкам их структуры, чем на более поздних этапах, что проявляется в увеличении количества проводящих пучков, увеличении глубины и ширины диапазона реакции тканей, с возрастанием порядкового номера листа. Для достижения максимального эффекта необходима точная подборка интервала обработки препаратом. Так, наибольшее значительные изменения количества проводящих пучков произошли в 3-м листе, а наибольшее разнообразие реакции проводящих элементов наблюдалось во 2-м. Определенные структуры могут проявлять индифферентность по отношению к изменению концентрации ГМК и/или продолжительности обработки. Но наиболее глубокие изменения произошли в 3-м листе при 48-часовой аппликации ГМК. При этом для сорта *Rapid* наблюдалось усиление развития, а для *Sakini* — его угнетение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beggs A. Special report: Plant growth regulators: What does the future hold? // *Int. Turfgrass Bull.* 2002. Vol. 216. P. 5—6.
2. Shibaoka H. Promotion of adventitious root formation by heliangine and its removal by cysteine // *Plant Cell Physiol.* 1967. Vol. 8. P. 161—170.
3. Kwiatkowska D. Structural integration at the shoot apical meristem: models, measurements, and experiments // *Am. J. Bot.* 2004. Vol. 91. P. 1277—1293.
4. Eckardt N. A *CLASSY* RNA silencing signaling mutant in *arabidopsis* // *Plant Cell.* 2007. Vol. 19. P. 1439.

5. Тіханков І.О. Різноманітність анатомічної структури листової пластинки *Lolium perenne* L. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2008. Вип. 48. С. 59—68.

6. Gichner T., Menke M., Stavreva D. et al. Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no DNA damage detectable by the Comet assay in tobacco and field beans // Mutagenesis. 2000. Vol. 15. N 5. P. 385—389.

7. Тіханков І.О. Представники роду *Lolium* у фізіологічних дослідженнях // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2008. Вип. 48. С. 174—188.

8. Тіханков І.О. Морфо-фізіологічна характеристика листків *Lolium perenne* L. після попередньої обробки насіння гідразидом малеїнової кислоти // Питання біоіндикації та екології. 2008. Вип. 13. № 1. С. 33—45.

9. Veit B., Briggs S., Schmidt R. et al. Regulation of Leaf Initiation by the TERMINAL EAR 1 gene of maize // Nature. 1998. Vol. 393. P. 166—168.

10. Тіханков І.О. Розвиток колеоптиля пажитниці під впливом гідразиду малеїнової кислоти у різних температурних умовах // Вісник Дніпропетровського університету. Серія біологія, екологія. 2006. Вип. 3. С. 175—180.

Поступила в редакцію
26.06.12

ANATOMICAL PECULIARITIES OF VASCULAR SYSTEM OF *LOLIUM PERENNE* L. LEAVES, GROWING UNDER MALEIC HYDRAZIDE INFLUENCE

I.A. Tikhankov

It was founded, that ryegrass seeds treatment by maleic hydrazide leads to deep and different transformation of basic structural components of leaves anatomy. The results of this transformation depend from leave development stage and increase with growing of leave number. The prolongation of treatment is more efficient than increasing of drug concentration and may as suppress the development of leaves and there vascular system so promote one. The connection between leaf anatomy transformation after maleic hydrazide treatment and genome function was discussed.

Key words: vascular system, phloem, xylem, morphogenesis, maleic hydrazide, ryegrass.

Сведения об авторе

Тіханков Ігорь Александрович — ассистент кафедры физиологии и интродукции растений факультета биологии, экологии и медицины Днепропетровского национального университета им. Олеся Гончара. Тел.: +38-056-776-57-29; e-mail: 24traven@ukr.net

УДК 592

СТРОЕНИЕ ПОКРОВОВ ТЕЛА KAMPTOZOA НА ПРИМЕРЕ ВИДА *BARENTSIA DISCRETA* BUSK, 1886

А.О. Борисанова, В.В. Малахов

(кафедра зоологии беспозвоночных; e-mail: borisanovaa@mail.ru)

Исследовано строение покровов тела колониального вида *Barentsia discreta*. Покровы на большем своем протяжении представлены однослойным нересничным эпителием, одетым слоем микровиллярной кутикулы. Дно атриальной полости и фронтальная поверхность щупалец выстланы ресничным эпидермисом, покрытым протокутикулой. В эпидермисе присутствуют чувствительные и секреторные клетки.

Ключевые слова: *Kamptozoa*, *Lophotrochozoa*, кутикула, эпидермис, покровы тела.

Систематическое положение Kamptozoa в пределах животного царства до сих пор остается не до конца определенным. Исследователи разных лет сближали представителей данного таксона с многими группами, в том числе с мшанками [1], аннелидами [2], моллюсками [3], циклиофорами [4]. В последние годы все большую популярность приобретает высказанная в конце XX в. экдизозойно-лофотрохозойная теория, в соответствии с которой Kamptozoa относятся к группе Lophotrochozoa — животных, имеющих личинку трохофорного типа. Строение кутикулы — одно из главных отличий между Lophotrochozoa и Ecdysozoa. Подробное изучение строения покровов тела Kamptozoa дает возможность подтвердить принадлежность этой группы к Lophotrochozoa и предположить возможные родственные связи Kamptozoa с другими таксонами Lophotrochozoa.

Материалы и методы

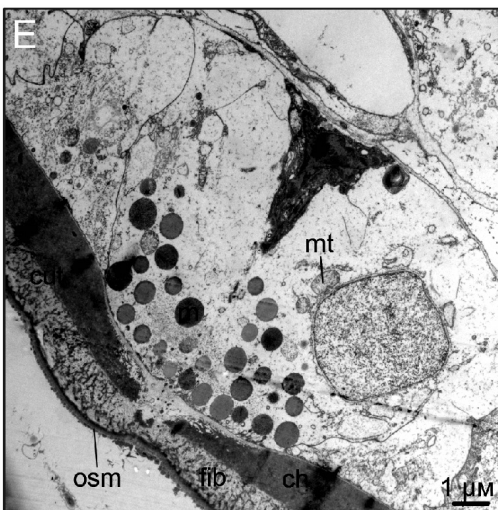
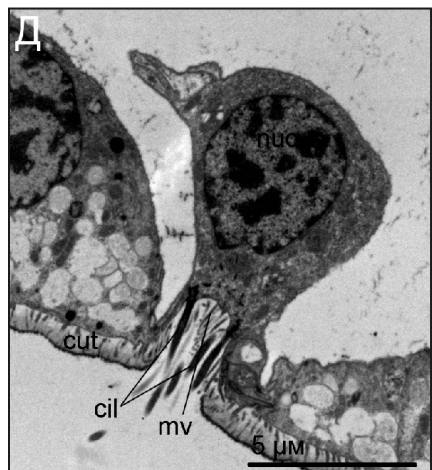
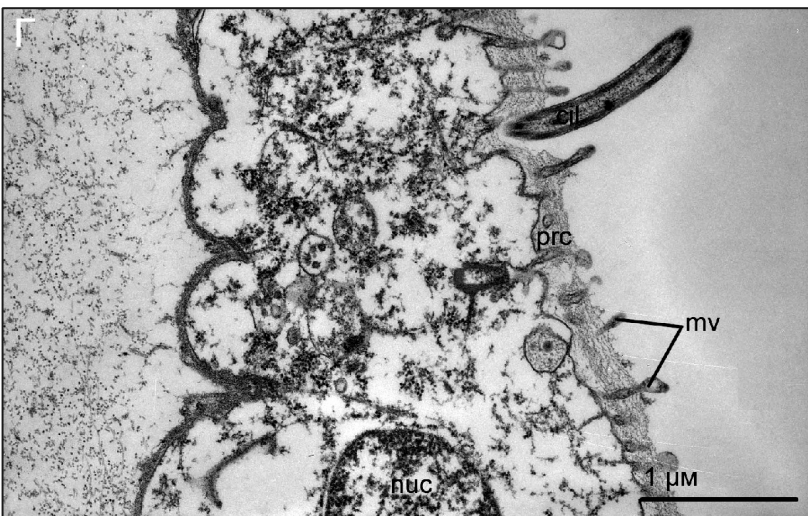
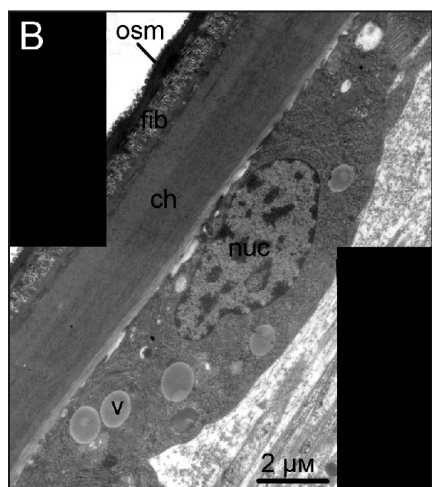
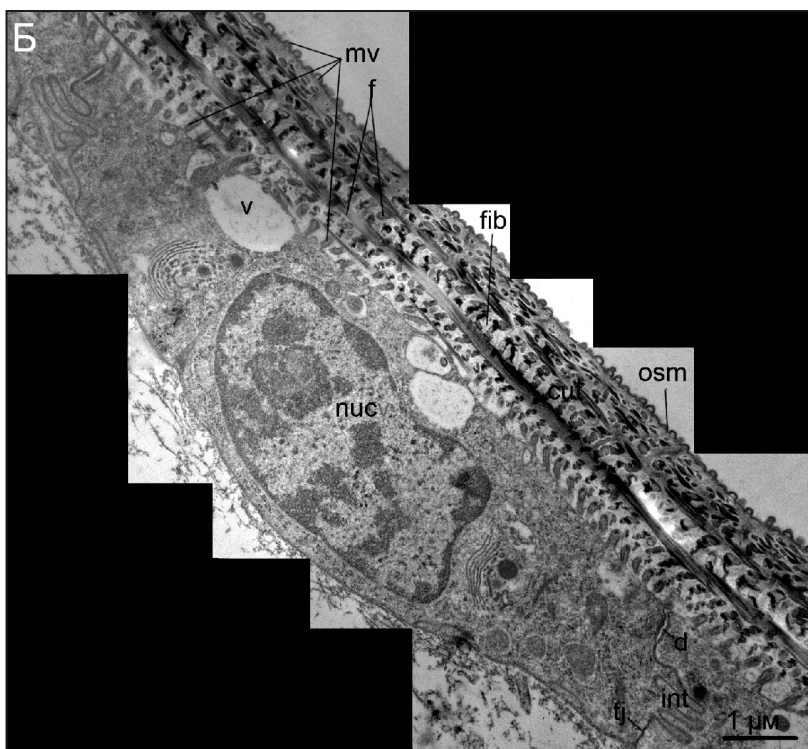
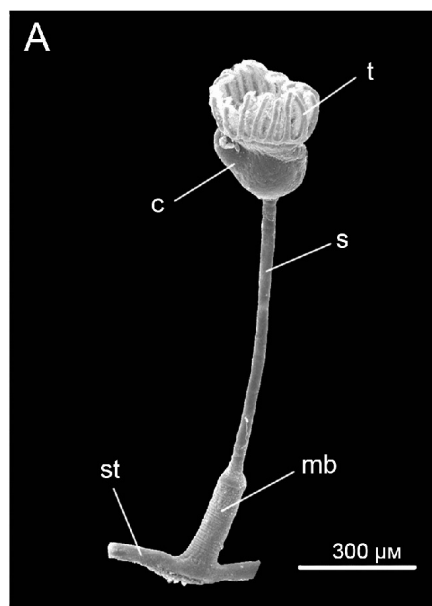
Работа проводилась на колониальном виде *Barentsia discreta* (Busk, 1886). Материал собран в заливе Восток Японского моря (Находкинский р-н Приморского края) с раковин моллюска *Modiolus difficilis*, на глубинах 3–10 м и зафиксирован в 2,5%-м растворе глутаральдегида на какодилатном буфере для исследования ультраструктур.

Результаты и обсуждение

Тело особи *B. discreta* разделено на чашечку, несущую по краю венчик ресничных щупалец, и ножку, состоящую из тонкого жесткого несократимого стебелька и расширенного мышечного основания, от которого отходит стелющийся столон (рисунк, А).

Покровы *B. discreta* на большем своем протяжении представлены уплощенным или кубическим нересничным эпидермисом, покрытым слоем микровиллярной кутикулы (рисунк, Б). В базальной час-

ти клеток лежат ядра овальной формы, цитоплазма темная, с хорошо развитым эндоплазматическим ретикулумом, заметными митохондриями и сосредоточенными в апикальной зоне вакуолями с прозрачным содержимым. Соседние клетки соединяются друг с другом при помощи интердигтаций, плотных контактов и десмосом. Апикальная поверхность клеток несет многочисленные микроворсинки, которые пронизывают всю толщину кутикулы и выступают над ее поверхностью в виде вздутий. Кутикула чашечки и мышечного основания двухслойная. Толща кутикулы образована рыхло-волокнистым слоем, в котором можно выделить несколько ярусов поперечно срезанных толстых волокон. Организация толстых волокон в рыхловолокнистом слое кутикулы *B. discreta* совпадает с организацией коллагеновых волокон кутикулы кольчатых червей [5, 6], что позволяет предположить коллагеновую природу толстых волокон *B. discreta*. Выше рыхловолокнистого слоя лежит тонкий (около 30 нм) осмиофильный слой. Микровиллярная кутикула сходного строения характерна для таких таксонов, как Mollusca и Annelida, относящихся к Lophotrochozoa [7]. В кутикуле стебелька и столона кутикула трехслойная: в ней присутствует дополнительный внутренний слой толщиной 2–2,5 мкм, представленный плотным гомогенным веществом хитиноидной природы (рисунк, В). Кутикула одиночных представителей Kamptozoa, описанная в работе Нильсена и Джесперсена [8], по строению совпадает с кутикулой, характерной для афронтальной стороны щупалец и верхней части чашечки *B. discreta*, где толстые волокна отсутствуют или образуют всего 1–2 яруса. Утолщенная многослойная кутикула *B. discreta*, возможно, является адаптацией к неподвижному образу жизни в колонии в условиях, когда чашечка относительно высоко поднята над поверхностью и подвергается большому числу воздействий, чем чашечка одиночных Loxosomatidae, и, следовательно, нуждается в лучшей защите и опоре.



- А: внешняя морфология особи *B. discreta*, SCAN: с — чашечка, mb — мышечное основание, s — стебелек, st — столон, t — щупалец.
- Б: уплощенная эпидермальная клетка на продольном срезе чашечки *B. discreta*, TEM: cut — кутикула, d — десмосома, f — толстые волокна, fib — рыхловолокнистый слой кутикулы, int — интердигитации, mv — микроворсинки, nuc — ядро, osm — осмиофильный слой кутикулы, tj — плотный контакт, v — вакуоль.
- В: уплощенная эпидермальная клетка на продольном срезе стебелька *B. discreta*, TEM: ch — внутренний хитиноидный слой кутикулы, fib — рыхловолокнистый слой кутикулы, nuc — ядро, osm — осмиофильный слой кутикулы, v — вакуоль.
- Г: ресничная эпидермальная клетка дна атриальной полости *B. discreta*, продольный срез чашечки, TEM: cil — ресничка, mv — микроворсинки, nuc — ядро, prc — протокутикула.
- Д: чувствительная клетка аборальной стороны щупальца *B. discreta*, поперечный срез, TEM: cil — ресничка, cut — кутикула, mv — микроворсинки, nuc — ядро.
- Е: секреторная клетка на поперечном срезе стебелька *B. discreta*, TEM: ch — внутренний хитиноидный слой кутикулы, cut — кутикула, fib — рыхловолокнистый слой кутикулы, mt — секреторная гранула, osm — осмиофильный слой кутикулы

Покровы фронтальной стороны щупалец и дна атриальной полости, лежащей между щупальцами, отличаются от строения покровов других частей тела *B. discreta* и представлены ресничным эпителием, покрытым слоем протокутикулы — прилегающим к клеточной мембране рыхловолокнистым слоем толщиной 0,2 мкм, сквозь который проходят микроворсинки клеток (рисунок, Г). Наличие ресничных клеток, покрытых тонким слоем экстраклеточного вещества — протокутикулой, характерно в первую очередь для личиночных форм Lophotrochozoa и для половозрелых особей таких таксонов, как, например, Cyclophora или Rotifera, которые считаются неотеническими группами. Присутствие ресничного эпидермиса у взрослых особей Kamptozoa является признаком сохранения ими личиночной организации и одним из доказательств возможного неотенического происхождения этой группы.

К видоизмененным клеткам эпидермиса относятся чувствительные и секреторные клетки. Бокаловидные чувствительные клетки лежат на афронтальной стороне щупалец (рисунок, Д). Поверхность клетки не покрыта кутикулой. В клетке лежит ядро диаметром 3—4 мкм, цитоплазма плотная, с большим количеством митохондрий и развитой эндоплазматической сетью. Апикальная поверхность несет микроворсинки и пучок ресничек. В стебельке

присутствуют крупные эпидермальные клетки овальной формы, заполненные секреторными гранулами, сосредоточенными около апикальной поверхности клетки (рисунок, Е). Цитоплазма клеток светлая, с отдельными митохондриями и цистернами эндоплазматической сети. До настоящего времени считалось, что секреторные клетки нехарактерны для колониальных Kamptozoa и являются отличительной особенностью Loxosomatidae как более примитивной группы [8].

Выводы

На основании полученных результатов и проведенного сравнительного анализа можно сделать вывод, что Kamptozoa — неотеническая группа беспозвоночных животных, строение покровов представителей которой подтверждает принадлежность данного таксона к Lophotrochozoa, в пределах которого можно предположить их родство с Annelida и Mollusca.

* * *

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-04-31778мол_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nielsen C. The relationships of Entoprocta, Ectoprocta and Phoronida // Amer. Zool. 1977. Vol. 17. N 1. P. 149—150.
2. Emschermann P. Les Kamptozoaires. État actuel de nos connaissances sur leur anatomie leur development, leur biologie et leur position phylogénétique // Soc. Zool. Fr. 1982. Vol. 107. N 2. P. 317—344.
3. Haszprunar G., Wanninger A. On the fine structure of the creeping larva of Loxosomella murmanica: additional evidence for a clade of Kamptozoa (Entoprocta) and Mollusca // Acta Zoologica. 2008. Vol. 89. P. 137—148.
4. Funch P., Kristensen R.M. Cyclophora is a new phylum with affinities to Entoprocta and Ectoprocta // Nature. 1995. Vol. 378. P. 711—714.
5. Gustavsson L.M., Erseus Ch. Cuticular ultrastructure in some marine oligochaetes (Tubificidae) // Invertebrate Biology. 2000. Vol. 119. N 2. P. 152—166.
6. Hausen H. Comparative structure of the epidermis in polychaetes (Annelida) // Hydrobiologia. 2005. Vol. 535—536. P. 25—35.
7. Руннепэ Э.Э., Фокс Р.С., Барнс Р.Д. Зоология беспозвоночных: функциональные и эволюционные аспекты. М.: Академия, 2008. 448 с.
8. Nielsen C., Jespersen E. Entoprocta // Microscopic anatomy of invertebrates. N.Y.: Chichester etc., 1997. P. 13—43.

Поступила в редакцию
17.05.11

INTEGUMENT OF KAMPTOZOAN *BARENTSIA DISCRETA* BUSK, 1886*A.O. Borisanova, V.V. Malakhov*

The integument of colonial kamptozoan *Barentsia discreta* is investigated in present work. Epidermis consists of monolayered unciliated epithelium which is covered by a microvillous cuticle composed of several layers. The floor of the atrial cavity and the frontal surface of tentacles are covered by a ciliated epithelium with a protocuticle. Sensory and secretory cells are present at the epidermis.

Key words: *Kamptozoa, Lophotrochozoa, cuticle, epidermis, integument.*

Сведения об авторах

Борисанова Анастасия Олеговна — аспирантка кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-925-051-91-08; e-mail: borisanovaao@mail.ru

Малахов Владимир Васильевич — проф., чл.-корр. РАН, зав. кафедрой зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-36-56; e-mail: vmalakhov@inbox.ru

УДК 582.394.724:581.332:58.087

МОРФОЛОГИЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРА СОВРЕМЕННЫХ И ИСКОПАЕМЫХ СПОР ПАПОРОТНИКОВ ПОРЯДКА SCHIZAEALES SCHIMP

С.В. Полевова, А.С. Авраменко*

(кафедра высших растений биологического факультета МГУ; spolevova@gmail.com)

С помощью светового, электронных сканирующего и трансмиссионного микроскопов исследованы морфология и ультраструктура современных и ископаемых спор представителей порядка Schizaeales. Изученные споры по особенностям ультраструктуры и скульптуры спородермы объединены в две группы: у спор *Anemia* и *Klukia* экзоспорий формирует шипы, у спор *Lygodium* экзоспорий гладкий, периспорий формирует бугорки.

Ключевые слова: споры, ультраструктура спородермы, *Schizaeales*, *Anemia*, *Klukia*, *Lygodium*.

Схизейные — морфологически разнообразная и древняя группа папоротников, которые в далеком прошлом были широко распространены по всему земному шару. Об этом свидетельствуют многочисленные находки отпечатков их листьев и спор в отложениях юрского и мелового (200—65 млн лет) периодов. В настоящее время схизейные встречаются в основном в тропических областях, и только некоторые виды заходят в более северные районы [1].

Традиционно в составе группы выделяют пять современных родов: *Anemia* Sw., *Lygodium* Sw., *Mohria* Sw. и *Schizaea* Sm., *Actinostachys* Wallich [2]. Самые крупные из этих родов настолько разнообразны по типам ветвления жилок листьев, строению проводящей системы корневища и другим признакам, что иногда их рассматривали как самостоятельные семейства, что нашло свое подтверждение в современных молекулярно-филогенетических исследованиях [3]. Таким образом, порядок Schizaeales включает 3 семейства: *Lygodiaceae* M. Roem. с единственным современным родом *Lygodium*; *Schizaeaceae* Kaulf. с двумя современными родами *Actinostachys* и *Schizaea*; *Anemiaceae* Link с единственным современным родом *Anemia*, в который включают виды, ранее относимые к *Mohria*.

Немаловажное значение для выявления филогенетических взаимоотношений и систематики папоротников имеют исследования внешнего и внутреннего строения спор, обладающих таксономически значимыми признаками. Споры менее подвержены влиянию внешних условий при жизни растения и хорошо сохраняются в отложениях, что дает возможность связать современные и ископаемые таксоны. Однако установление систематической близости спор, рассеянных в породе и зачастую принадлежащих уже вымершим растениям, со спорами таксонов естест-

венной системы бывает затруднительно. Палеопалинологи, занимающиеся изучением спор и пыльцы древних растений, часто бывают вынуждены использовать искусственную классификацию, относя встречающиеся палиноморфы к формальным родам. Вместе с тем изучение инситных спор, выделенных из спорангиев ископаемых папоротников, помогает установить их систематическое положение.

Несмотря на общие признаки в строении спорангиев, морфология спор представителей группы схизейных, как современных, так и ископаемых, весьма разнообразна. Так, представители рода *Schizaea* с бобовидной формой монолетных спор имеют ребристую или бугорчатую скульптуру. Для трилетних спор родов *Anemia* и *Mohria* характерна ребристая скульптура, для рода *Lygodium* — гладкая и бугорчатая, но в каждом из этих трех родов есть виды с сетчатой скульптурой. Среди вымерших родов, имеющих трилетные споры, сетчатая скульптура характерна для одного из древнейших представителей семейства — рода *Klukia* Raciborski [4]. Разобраться в филогенетических отношениях родов и видов семейства помогает изучение современных и ископаемых спор с применением новейших методов (прежде всего электронной микроскопии) исследования [1, 4].

Целью настоящей работы явилось детальное изучение спор некоторых современных видов родов *Anemia*, *Lygodium*, *Schizaea* и инситных спор ископаемого рода *Klukia* для выявления их морфологических особенностей.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили споры из гербарных коллекций, имеющиеся в распоряжении авторов: 6 видов рода *Lygodium* (*L. scan-*

* Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток.

dens (L.) Sw. — Ботанический сад, Португалия; *L. volubile* Swartz — Ботанический сад Кью, Англия; *L. polystachium* Wallich, № 126, *L. japonicum* (Thund.) Sw. № 125, *L. conforme* C. Chr. № 127, *L. flexuosum* (L.) Sw., № 124 — Вьетнам), 2 видов рода *Anemia* (*A. dregeana* Kunze, *A. phyllitidis* (L.) Sw. — Ботанический сад БИН РАН, Санкт-Петербург) и 1 вида рода *Schizaea* (*S. dichotoma* (L.) Sm., № 123 — Вьетнам). Изученные образцы современных спор, переданные в коллекцию М.С. Чичаговой, хранятся в палинотеке кафедры высших растений биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

Ископаемые споры были извлечены из спорангиев папоротника *K. tyganensis*. Образцы с отпечатками папоротника были отобраны из отложений берриасского возраста (145,5—140,2 млн лет) Тырминской впадины Буреинского бассейна. Материал с отпечатками фертильных перышек был передан авторам В.А. Красиловым для изучения с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ). Образцы с отпечатками *K. tyganensis* № 550-117, постоянные препараты с инситными спорами хранятся в коллекции Биолого-почвенного института ДВО РАН, г. Владивосток.

Современные споры для световой микроскопии подвергались ацетолизной обработке по стандартной методике [5]. Для изучения при помощи сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) споры

отбирали из сухого гербарного материала и без специальной обработки наклеивали на покрытые лаком металлические столики, которые напылялись в вакуумной установке золотом. Изучение материала и фотографирование спор проводилось с помощью микроскопа Samscan в общефакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Здесь же исследовались и фотографировались с помощью ТЭМ (JEM-100-B и JEM-1011) срезы спор, подготовленные для изучения по стандартным методикам [6].

Обработка ископаемых спор и приготовление постоянных глицерин-желатиновых препаратов проводились по общепринятым методикам [7]. Готовые препараты исследовались с помощью светового микроскопа (СМ) Axioplan 40 в иммерсионной жидкости при увеличении $\times 2000$ в Центре коллективного пользования (ЦКП) БПИ ДВО РАН. Для изучения в СЭМ ископаемые споры обрабатывали щелочью и иглой под бинокуляром Leica переносили на покрытые лаком металлические столики, которые затем напыляли золотом. Изучение микроморфологии спор проводилось с помощью СЭМ Zeiss EVO 40 (ЦКП БПИ ДВО РАН). Для трансмиссионной электронной микроскопии ископаемый материал был подготовлен по стандартным методикам [6]. На ультратоме Leica EM UC5 получали ультратонкие срезы, которые контрастировали водным раствором ура-

Морфологические признаки спор некоторых современных видов родов *Anemia* Swartz, *Lygodium* Swartz и *Schizaea* Smith

Виды	Полярный диаметр, мкм	Экваториальный диаметр, мкм	Длина луча, мкм	Толщина спородермы, мкм	Диаметр бугорков, мкм	Высота шипов, мкм	Толщина периспория, мкм	Толщина экзоспория, мкм
<i>Anemia dregeana</i> Kunze	48—51	50—53	26—28	3,0—3,4	—	6—7	0,2—0,4 (0,3) между шипами	0,8—2,0 (1,53) без учета шипов
<i>Anemia phyllitidis</i> (L.) Swartz	45—51	58—63	23—27	2,5—2,8	—	10—11	0,3—0,5 (0,4) между шипами	1,5—2,0 (1,78) без учета шипов
<i>Lygodium polystachium</i> Wallich	68—69	80—93	28—35	4,5—5,3	3—4	—	*	*
<i>Lygodium japonicum</i> (Thunberg) Swartz	67—71	74—80	33—41	5,1—7,2	4—4	—	наружный: 0,6—0,9 (0,76) без учета бугорков; внутренний: 0,7—1,3 (0,94)	1,0—3,0 (2,08)
<i>Lygodium conforme</i> Christensen	74—76	79—84	29—30	5—6	5,5—6,2	—	*	*
<i>Lygodium flexuosum</i> (L.) Swartz	78—83	87—90	35—38	6,0—6,3	—	—	наружный: 0,4—0,8 (0,6) без учета бугорков; внутренний: 0,6—1,0 (0,8)	2,5—4,0 (3,25)
<i>Lygodium scandens</i> (L.) Swartz	63—67	84—87	29—38	3,5—5,5	4—5	—	наружный: 0,4—1,5 (0,83) без учета бугорков; внутренний: 0,6—1,5 (0,98)	1,8—3,6 (2,25)
<i>Lygodium volubile</i> Swartz	78—102	90—107	38—52	5—8	2,3—2,8	—	наружный: 0,15—0,5 (0,31) без учета бугорков; внутренний: 0,4—1,3 (0,78)	3,2—5,0 (4,24)
<i>Schizaea dichotoma</i> (L.) Smith	26—29	51—53	25—28	2,1—3,0	—	—	*	*

Примечание: — — признак отсутствует, * — нет данных.

нилацетата. Изучали и фотографировали срезы, используя трансмиссионные микроскопы JEM-100-B и JEM-1011, в общефакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Для описания спор использовали терминологию, предложенную Л.А. Куприяновой и Л.А. Алешиной [8].

Результаты и обсуждение

Внутреннее и внешнее строение спор некоторых современных представителей семейства схизейных изу-

чено достаточно детально [9]. Наиболее интересные результаты получаются при комплексном изучении современных и ископаемых спор одного семейства с использованием одинаковых подходов к изучению материала.

Исследование современных спор с помощью СМ, СЭМ и ТЭМ позволило выявить их характерные особенности (таблица). Споры современных *Anemia* трехлучевые, с экваториальным диаметром 50–63 мкм, скульптура ребристая, на ребрах располагаются высокие шипы (таблица; рис. 1, б, д, е, и). Споры *Lygodium* трехлучевые с экваториальным диа-

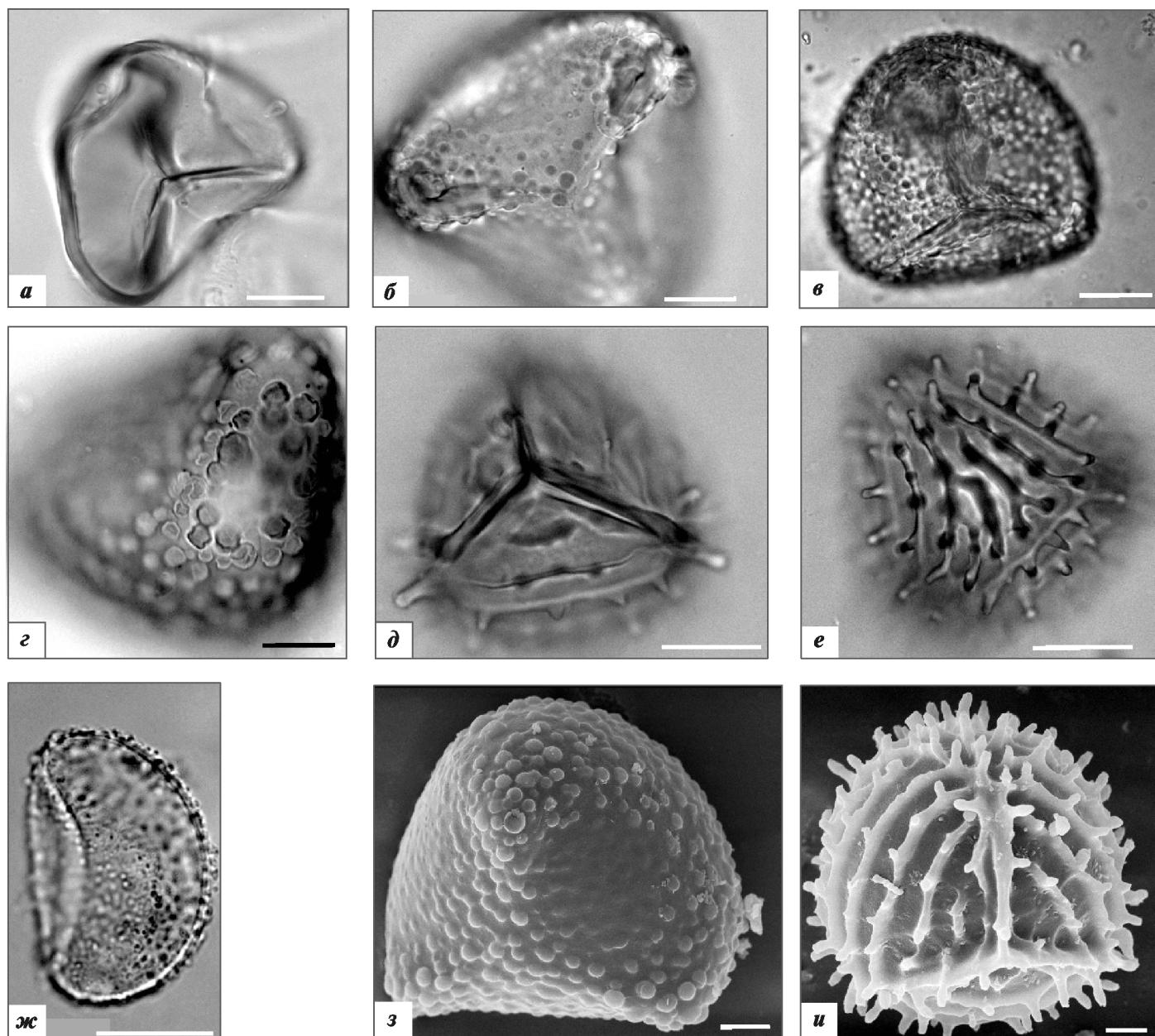


Рис. 1. Споры современных папоротников родов *Anemia* Swartz, *Lygodium* Swartz и *Schizaea* Smith: а–ж — СМ, з–и — СЭМ: а — *Lygodium flexuosum* (Linnaeus) Swartz, оптическое сечение в полярной проекции, без периспория; б — *Lygodium flexuosum* (Linnaeus) Swartz, вид с проксимального полюса; в — *Lygodium polystachium* Wallich, вид с проксимального полюса; г — *Lygodium conforme* Christensen, вид с дистального полюса; д — *Anemia phyllitidis* (Linnaeus) Swartz, вид с дистального полюса; е — *Anemia phyllitidis* (Linnaeus) Swartz, вид с проксимального полюса; ж — *Schizaea dichotoma* (Linnaeus) Smith, поверхность в экваториальной проекции; з — *Lygodium flexuosum* (Linnaeus) Swartz, проксимальная сторона; и — *Anemia phyllitidis* (Linnaeus) Swartz, проксимальная сторона. Масштабная линейка: а–о — 20 мкм, н–и — 10 мкм

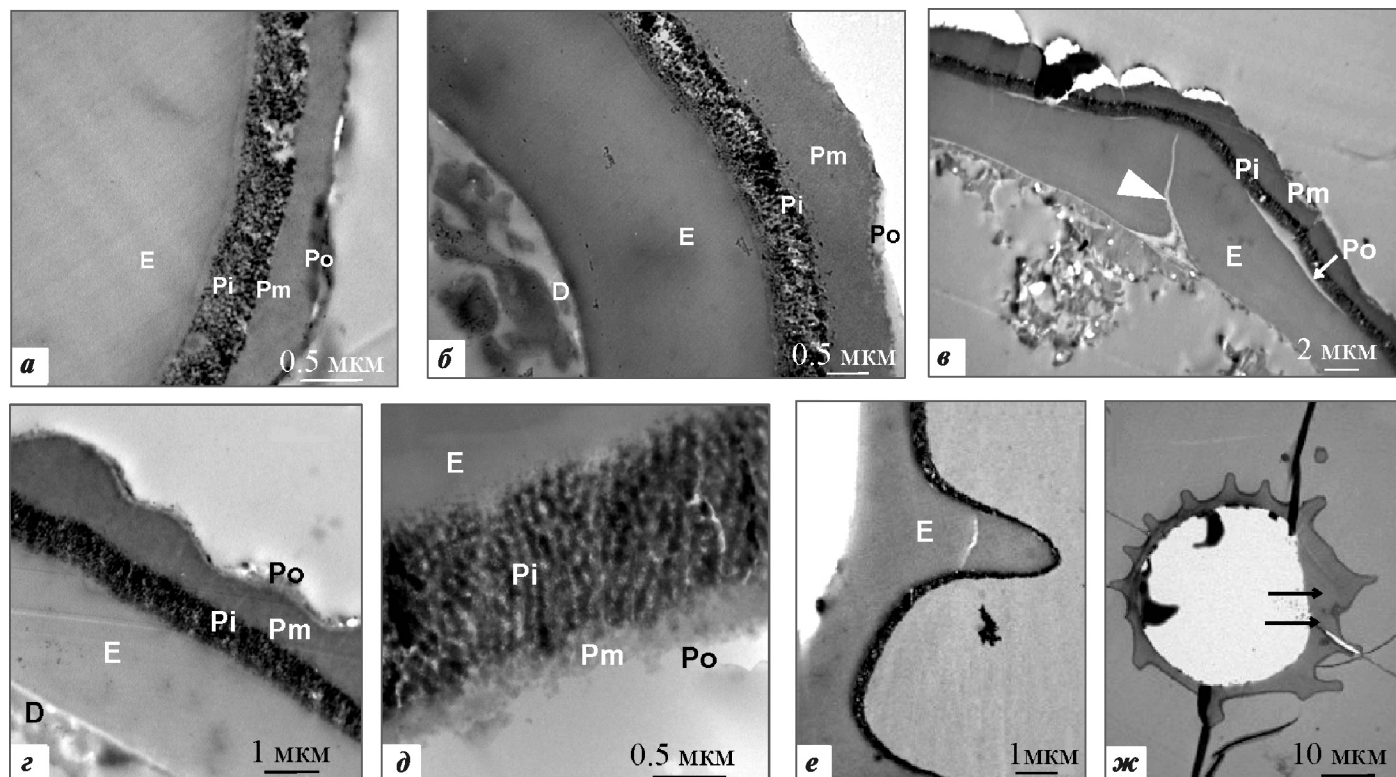


Рис. 2. Ультраструктура спородермы спор современных папоротников родов *Anemia* Swartz и *Lygodium* Swartz, ТЭМ: а — *Lygodium flexuosum* (Linnaeus) Swartz; б — *Lygodium scandens* (Linnaeus) Swartz; в, г — *Lygodium japonicum* (Thunberg) Swartz, шель разрезания (треугольник); д — *Lygodium volubile* Swartz; е — *Anemia phyllitidis* (Linnaeus) Swartz, экзоспорий гомогенный, электронно-прозрачный, с очень высокими выростами; ж — *Anemia dregeana* Kunze, экзоспорий гомогенный, электронно-прозрачный, с очень высокими выростами, с небольшими полостями (стрелки)

метром 79–107 мкм, скульптура бугорчатая, бугорки широкие, ровные, полусферические (таблица; рис. 1, а–г, з). Споры *Schizaea* билатерально-симметричные, однолучевые, с экваториальным диаметром 51–53 мкм (таблица; рис. 1, ж). Исследование при помощи ТЭМ показало, что спородерма представителей рода *Anemia* состоит из тонкого электронно-плотного, гранулярного периспория и гомогенного, электронно-прозрачного экзоспория с очень высокими выростами, иногда с небольшими полостями (таблица; рис. 2, е, ж). Толстый периспорий спор рода *Lygodium* трехслойный, образован тонким, гомогенным внутренним, электронно-плотным, гранулярным средним и формирующим скульптуру поверхности наружным периспорием. Экзоспорий толстый, гомогенный, гладкий (таблица; рис. 2, а–д).

Ископаемые споры, извлеченные из спорангиев *K. tyganensis*, ранее изучались при помощи СМ и СЭМ В.А. Красиловым [4, 10]. Было установлено, что споры *K. tyganensis* трехлучевые, экваториальный контур округло-треугольный, средний диаметр 60 мкм. Дистальная сторона сильновыпуклая, имеет сетчатую скульптуру с ячейками неправильно-эллиптической или закругленно-многоугольной формы. Размеры ячеек варьируют в пределах 3–6 мкм. Стенки ячеек толстые, пологие, выступающие в виде бугорков на стыке трех ячеек. Высота стенок около 3–5 мкм. Местами две ячейки разделены очень тонкой, за-

точной стенкой. Проксимальная сторона умеренно выпуклая, с выступающим рубцом и плоскими контактными площадками, покрытыми одиночными или слившимися папиллами высотой около 3 мкм. Длина лучей около 3/4 радиуса споры. Ретикулум заходит на проксимальную сторону, нависая над окончаниями лучей.

Детальное изучение морфологии спор *K. tyganensis* в СМ и СЭМ, выполненное авторами, позволило внести дополнения в описание Красилова. Так, добавлены сведения об изменчивости размеров спор (экваториальный диаметр 38,8–63,9 мкм, полярный диаметр 35–53,7 мкм), толщины спородермы (1,9–3,1 мкм), размеров папилл (высота 0,3–2,8 мкм, диаметр 0,8–5,5 мкм) проксимальной поверхности (рис. 3, а–в). Впервые по результатам изучения спор при помощи ТЭМ получены сведения об ультраструктуре спородермы (рис. 3, г, д). Установлено, что споры имеют очень тонкий электронно-плотный, слоистый и мелкогранулярный периспорий, толщина которого изменяется от 0,05 до 0,4 мкм, который зачастую представлен тонкими прерывистыми участками. Экзоспорий электронно-плотный, гомогенный, с высокими выростами, его толщина в выростах 2,0–2,8 мкм, между выростами 0,3–0,7 мкм.

Сравнительный анализ данных о морфологии спор, полученных с помощью СМ и СЭМ, двух видов рода *Klukia* — *K. tyganensis* и *K. exilis* (Phill.) Ra-

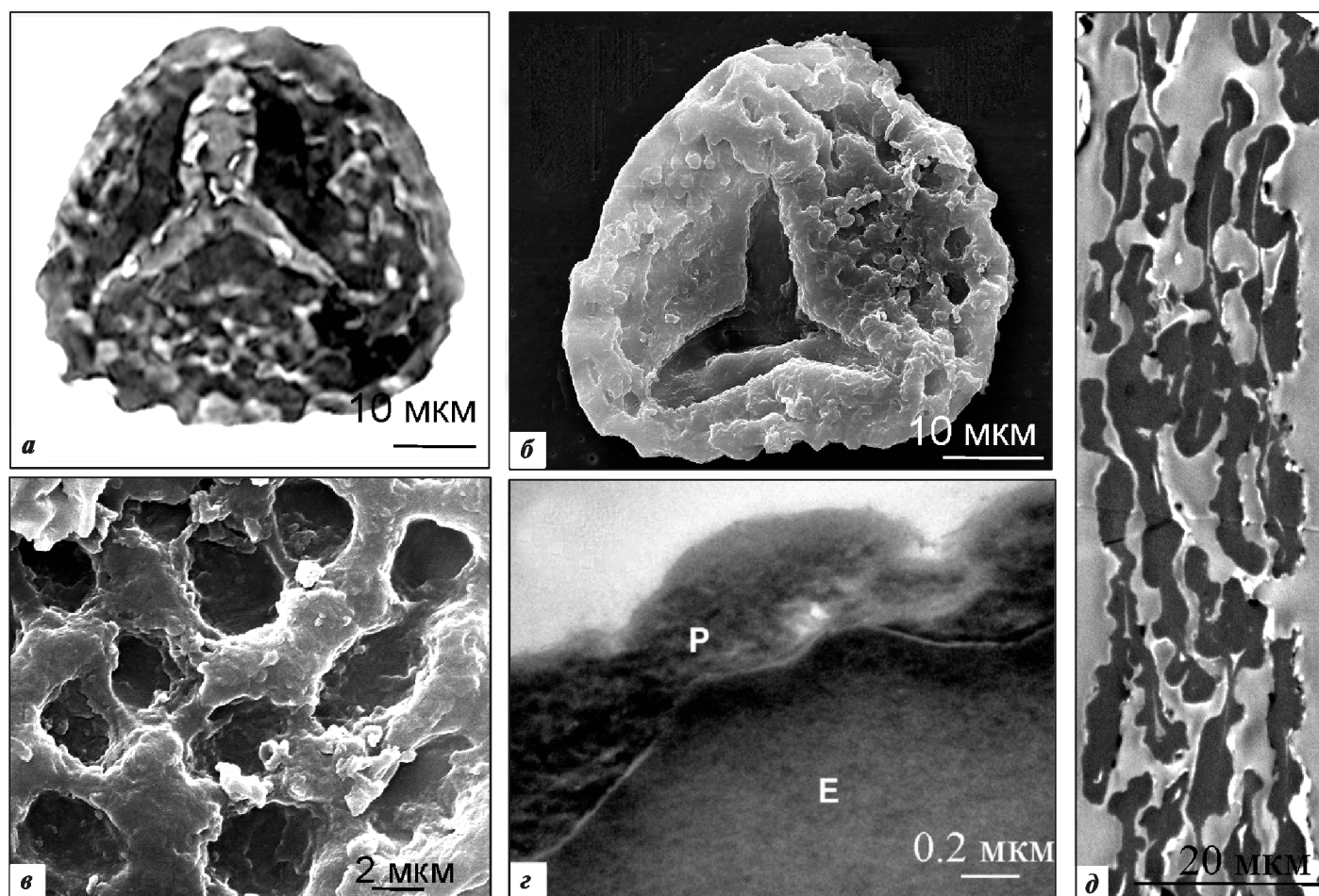


Рис. 3. Споры папоротника *Klukia tyganensis* Krassilov, а — СМ; б, в — СЭМ; г, д — ТЭМ: а, б — дистальная сторона; в — проксимальная сторона; г — ультраструктура спородермы (периспорий, экзоспорий); д — ультраструктура спородермы (периспорий, экзоспорий) спор в спорангии. Обозначения: Е — экзоспорий, Р — периспорий

сib. — из более древних среднеюрских отложений Йоркшира [11] и Закавказья [12], не выявил существенных различий. Это свидетельствует об устойчивости морфологических признаков спор папоротников этого рода.

По мнению В.А. Красиловой [4], по морфологии спор род *Klukia* тяготеет к современному роду *Lygodium* с преимущественно бугорчатой или сетчатой скульптурой, который стоит особняком от родов *Anemia*, *Mohria* и *Schizaea* с ребристой скульптурой. Аналогичный вывод делает и Сурова [13], основываясь на сходстве скульптуры спор современного *Lygodium reticularum* Schkuhr и ископаемого рода *Klukia*.

Исследования ультраструктуры спородермы с помощью ТЭМ позволили объединить изученные споры по особенностям формирования скульптуры в две группы: у представителей родов *Anemia* и *Klukia* скульптуру формирует экзоспорий, а у видов рода *Lygodium* — периспорий. По ультраструктуре спородермы споры *Klukia tyganensis* и *Anemia* (*A. dregeana*, *A. phyllitidis*) сходны по строению экзоспория, гомогенного, электронно-плотного с высокими выростами, которые отличаются у этих родов лишь высотой (у спор *Anemia* они выше). У представите-

лей обоих родов периспорий тонкий, гранулярный или более или менее ламеллярный покрывает спору снаружи. Экзоспорий формирует ультраскульптуру у спор рода *Schizaea* [14]. У представителей рода *Lygodium* (*L. scandens*, *L. volubile*, *L. polystachium*, *L. japonicum*, *L. conforme*, *L. flexuosum*) скульптуру поверхности спор формирует трехслойный периспорий, а экзоспорий — толстый, гомогенный — имеет ровную поверхность.

Скульптура поверхности спородермы, образованная периспорием, отмечается у некоторых современных папоротников из разных групп, например у *Adiantopsis* Fée, *Hemionitis* Linnaeus (Pteridaceae Kirchner), *Alsophila* Brown, *Sphaeropteris* Brown ex Wallich, *Nephrolepis* Tryon (Cyatheaceae Kaulfuss), *Dennstaedtia* Bernhardt (Dennstaedtiaceae Ching), *Selliguea* Bory (Polypodiaceae J. Presl et C. Presl) [14]. Как видно, такой тип формирования скульптуры не уникален и встречается в разных порядках папоротников.

Таким образом, установлено, что по ультраструктуре спородермы к спорам современного рода *Anemia* ближе всего споры *K. tyganensis*, в то время как споры рода *Lygodium* отличаются не только от спор рода *Klukia*, но и от остальных представителей по-