

А. Д. Куликова, Т. И. Андреевко, А. А. Солдатов

Цветовой полиморфизм раковины и активность аминотрансфераз тканей *Mytilus galloprovincialis* Lam.

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Г. Е. Шульманом)

*Методом фотографирования и цифровой обработки снимков раковин однозначно идентифицированы четыре цветовые группы *Mytilus galloprovincialis*: черные, переходные, темно-коричневые, светло-коричневые. Между ними отмечены существенные отличия в активности аланин- и аспаратаминотрансфераз, задействованных в процессах анаэробного метаболизма. Наибольшие расхождения (1,5–2,8 раза) выявлены между крайними группами: с черной и светло-коричневой окраской раковины. Допускается, что они могут быть связаны с адаптацией моллюсков к условиям скальных и донных экотопов.*

Двустворчатый моллюск *Mytilus galloprovincialis* Lam. является массовым для черноморского региона, его поселения отмечаются на иловых и скальных субстратах, принципиально отличающихся по условиям абиотического окружения [1]. Для иловых поселений характерно преобладание моллюсков со светло-коричневой окраской раковины, для скальных — с окраской черно-фиолетового цвета [1, 2].

Разделение мидий на цветовые группы, как правило, производится визуально. Количество выделяемых фенотипов варьирует. Отсутствие единого критерия, применяемого для дифференциации цветовых морф, затрудняет исследования. В последнее время для описания интенсивности и характера окраски биологических объектов широкое применение получил метод цифровой обработки фотографий. Он позволяет описать цвет количественно [3]. На этой основе нами была разработана новая методика дифференциации цветовых морф мидии [4].

Считается, что окраска створок мидий генетически детерминирована. Об этом свидетельствуют распределение фенотипов в популяции [5] и результаты гибридологического анализа [6]. Однако схема наследования данного признака, обсуждаемая в ряде работ, окончательно не принята [5–7].

Сравнительная оценка абиотических условий скальных и иловых биотопов позволяет предположить, что основным фактором, определяющим направление действия естественного отбора, является содержание кислорода в морской среде. Отсюда следует, что поиск различий на популяционном уровне должен быть сосредоточен на молекулярных системах, ответственных за толерантность моллюска к условиям гипоксии и аноксии.

Аспаратаминотрансфераза (АСТ, КФ 2.6.1.1) и аланинаминотрансфераза (АЛТ, К.Ф.2.6.1.2) — эндогенные ферменты класса трансфераз. АСТ определяет устойчивость моллюсков к экстремальным формам гипоксии и аноксии, так как сопрягает процессы белкового и углеводного обменов (аспартат-сукцинатное направление метаболизма) [8]. АЛТ контролирует сукцинаттиокиназную реакцию [9], направленную на образование в процессе гликолиза менее токсичных метаболитов [10].

Для АСТ принята шестиаллельная схема наследования, объясняющая высокое фенотипическое разнообразие [11]. Она допускает существование 21 возможного варианта генотипа, из которых 13 обнаружено экспериментально [11]. Отсюда следует, что система АСТ

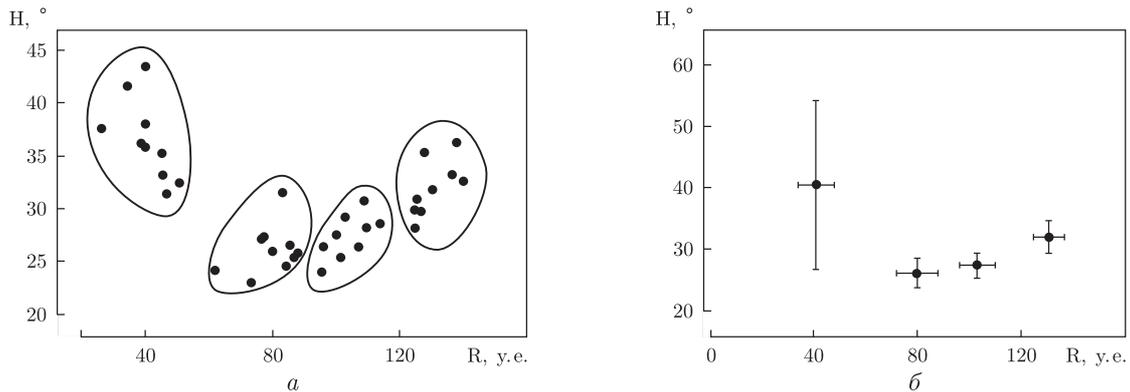


Рис. 1. Распределение цветовых характеристик створок раковин *M. galloprovincialis* в системе координат Red-Hue (Adobe Photoshop CS-3): *a* — полигон распределения; *б* — результаты статистической обработки, $\bar{x} \pm S_x$

может являться удобной моделью для изучения популяционной структуры *M. galloprovincialis*. Относительно АЛТ такая информация отсутствует.

Цель настоящей работы — сравнить активность АСТ и АЛТ в тканях четырех цветовых групп *M. galloprovincialis*, выявленных на основе цифровой обработки фотографий створок моллюска.

Объектом исследований служили половозрелые особи моллюска *M. galloprovincialis* (семейство Mytilidae) обоего пола с различным характером пигментации створок. Длина раковины составляла 42–75 мм. Характер окраски раковин моллюсков оценивали, используя метод фотографирования и цифровой обработки снимков раковин в системе координат Red-Hue (Adobe Photoshop CS-3) [4].

Мягкие ткани моллюсков (жабры, нога) препарировали при 0–4 °С. Полученные образцы хранили при –27...–28 °С в морозильной камере (“Liebherr-Comfort”, Германия). Гомогенаты готовили непосредственно в день эксперимента. В качестве трансформирующей среды использовали 1,15% раствор KCl.

Активность АСТ и АЛТ определяли с помощью унифицированного динитрофенилгидразинового метода Райтмана–Френкеля [12] при 25 °С. В работе использовали стандартный набор реактивов: “Simco, Ltd” (Украина). Содержание белка в пробах контролировали по методу Лоури.

Дифференциация цветовых морф. При отработке метода фотографирования и цифровой обработки снимков раковин в качестве показательной характеристики было выбрано значение красного компонента (Red) [4]. Полигон распределения, построенный в системе координат Red-Hue (красный цвет — тон), позволяет выделить четыре относительно изолированных скопления точек (рис. 1, *a*). Их обозначили как: черная (Red — 37,2–61,8 у. е.), переходная (Red — 71,6–89,6 у. е.), темно-коричневая (Red — 91,2–126,0 у. е.) и светло-коричневая (Red — 130,8–146,0 у. е.). Статистическая обработка цифровых массивов показала, что между этими цветовыми группами (по Red) существуют достоверные различия на уровне смежных скоплений точек при $p < 0,001$ (см. рис. 1, *б*).

Активность АСТ. Активность АСТ варьировала от 0,02 до 0,234 мкмоль пирувата \times \times мин^{–1}·мг^{–1} белка. Наблюдалась ее выраженная зависимость от цвета раковины моллюска (рис. 2, *a*). Для ноги ее можно описать уравнением линейной регрессии при высоких значениях R^2 (0,967). Максимальные величины отмечены у особей со светло-коричневой окрас-

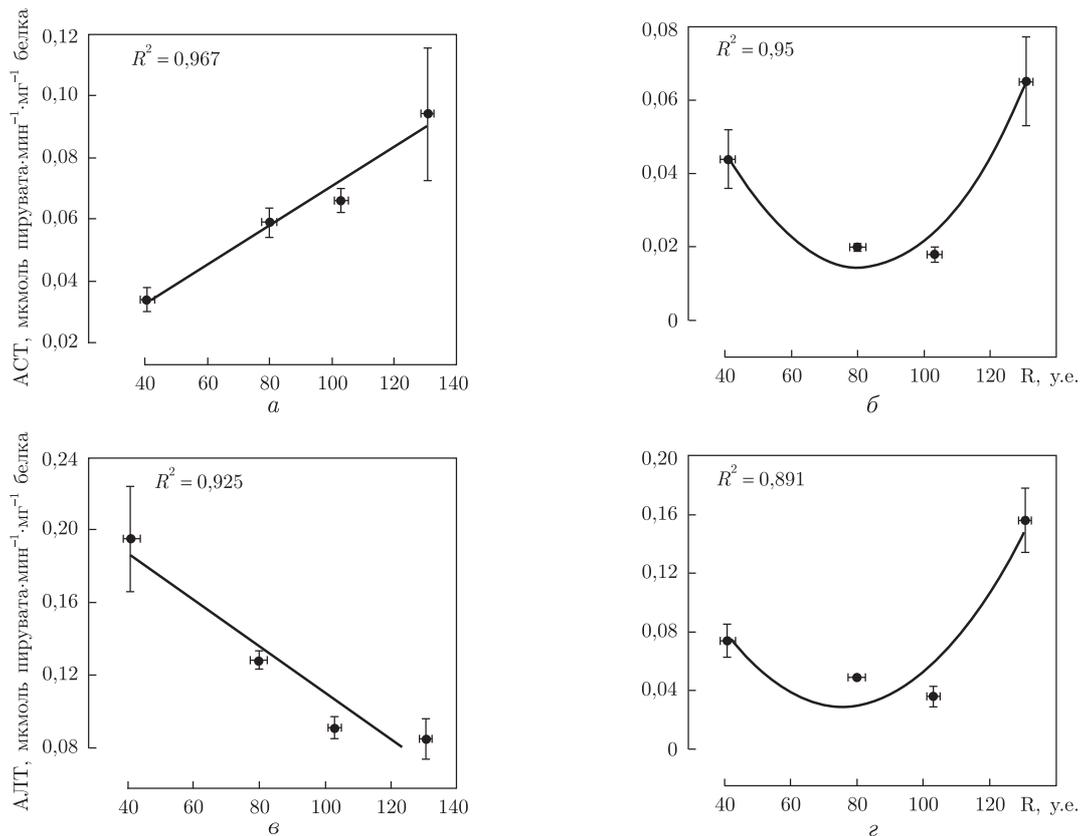


Рис. 2. Зависимость активности трансаминаз в тканях *M. galloprovincialis* от цветовых характеристик ее раковины: а — активность АСТ в ноге; б — активность АСТ в жабрах; в — активность АЛТ в ноге, г — активность АЛТ в жабрах; R — Red

кой раковины ($0,094 \pm 0,021$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ белка), а минимальные — с раковиной черной окраски. Различия составили 2,8 раза ($p < 0,001$).

Близкие результаты получены и в отношении жабр (см. рис. 2, б). У моллюсков со светло-коричневой окраской раковины активность АСТ составила $0,065 \pm 0,012$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ белка. Это почти на 50% выше, чем у особей с черной окраской створок ($p < 0,05$), и более чем в 3 раза выше, чем у особей с переходной и темно-коричневой окраской раковин ($p < 0,001$). При этом зависимость лучше описывалась уравнением параболической функции.

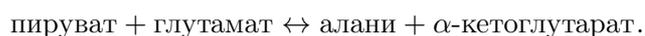
Как уже отмечалось, АСТ определяет аспартат-сукцинатное направление метаболизма [8], позволяющее получать дополнительный к гликолитическому ресурс макроэргов в условиях экстремальных форм гипоксии и аноксии. Высокая активность АСТ у особей со светло-коричневой окраской раковины, вероятно, связана с особенностями условий обитания данной цветовой группы *M. galloprovincialis*. Эти моллюски чаще встречаются в донных сообществах, где отсутствует активная циркуляция в водной толще и наблюдается внешний дефицит кислорода. Моллюски с черной окраской раковины, напротив, преобладают в скальных биотопах, часто приуроченных к прибойной зоне, где возникновение гипоксии невозможно. В этом, по-видимому, состоит основная причина обнаруженных различий в активностях АСТ.

Активность АЛТ. Значение активности АЛТ в ноге варьировало от 0,038 до 0,42 мкмоль пирувата \times мин⁻¹ \cdot мг⁻¹ белка (см. рис. 2, в), уменьшаясь по направлению от черных моллюсков к светлоокрашенным. Зависимость активности от пигментации раковины можно описать уравнением линейной регрессии ($R^2 = 0,925$). Практически между всеми цветовыми группами наблюдались достоверные отличия ($p < 0,01$). Активность АЛТ в группе моллюсков с черной окраской в 2,3 раза превышала таковую в группах с коричневой окраской.

В жабрах характер распределения активностей среди цветовых групп напоминал таковой для АСТ и описывался параболической функцией (см. рис. 2, г). В этих тканях обе крайние группы имели достоверно более высокое значение активности, чем моллюски промежуточной окраски. Самая высокая активность АЛТ зафиксирована у светло-коричневых особей, она превышала показатели группы с черной окраской в 2,1 раза ($p < 0,005$), с темно-коричневой и переходной — в 3,5–4,0 раза ($p < 0,001$). Меньшая активность наблюдалась у мидий с черной окраской створок, она превышала промежуточные группы приблизительно в два раза ($p < 0,05$).

Изначально предполагалось, что более приспособленная к аноксии коричневая морфа должна иметь высокую активность АЛТ. Однако в ноге наблюдалась прямо противоположная ситуация. У взрослых моллюсков в основании данного органа располагается железа, секреторная биссус — образование, позволяющее мидии прикрепляться к субстрату. Известно, что для черной морфы характерна большая интенсивность синтеза биссусной нити [5]. По-видимому, это связано со спецификой местообитания — темноокрашенные моллюски образуют поселения на скалистом субстрате [1]. Подверженные волновой нагрузке, они нуждаются в прочном прикреплении к поверхности и постоянном продуцировании новых нитей взамен поврежденных.

Адгезивный белок биссуса считается полифенольным: для него характерно высокое содержание фенилсодержащих аминокислот (~19% тирозина и дигидроксифенилаланина) [13, 14]. Кроме того, 6,8% составляет аланин и 19% — пролин. Обе эти аминокислоты — заменимые. Наиболее распространенный способ биосинтеза аланина — переаминирование пирувата. Реакция катализируется АЛТ, при этом запас пирувата постоянно пополняется:



Пролин синтезируется из глутамата в ходе нескольких последовательных реакций [15]. Глутамат отсутствует в первичной последовательности биссуса, однако он необходим как источник для восстановления запаса свободного пролина. Существует до пяти известных путей синтеза глутаминовой кислоты, по меньшей мере два из них используют α -кетоглутарат. На стадии α -кетоглутаровой кислоты в цикле Кребса она может выводиться из круга с превращением ее в L-глутаминовую кислоту.

Первый способ синтеза глутамата, реакция обратимого переаминирования, представлена выше. Коэффициент АЛТ близок к единице, поэтому реакция может протекать в обоих направлениях. Однако такой способ пополнения пула глутамата мало вероятен — в этом случае происходит накопление пирувата и не синтезируется аланин.

Второй путь синтеза глутамата из α -кетоглутарата контролируется ферментом глутаматдегидрогеназой:



Активное переаминирование пирувата увеличивает в ткани запас аланина и α -кетоглутарата, который в ходе ряда последовательных ферментативных реакций становится источником биосинтеза пролина.

Вероятно, специфика метаболизма в ноге мидий в первую очередь направлена на продукцию биссусной нити. В таком случае высокая активность АЛТ у черной морфы связана не с нейтрализацией метаболитов гликолиза, а с пополнением пула свободных аминокислот (пролина и аланина).

Таким образом, применение метода фотографирования и цифровой обработки снимков раковин позволило однозначно идентифицировать четыре цветовые группы *M. galloprovincialis*: черные, переходные, темно-коричневые, светло-коричневые. Между ними отмечены существенные отличия в активности АСТ и АЛТ, задействованных в процессах анаэробного метаболизма. Наибольшие расхождения выявлены между краевыми группами: с черной и светло-коричневой окраской раковины. Допускается, что они могут быть связаны с адаптацией моллюсков к условиям скальных и донных экотопов.

1. Иванов В. Н., Холодов В. И., Сеничева М. И. и др. Биология культивируемых мидий. – Киев: Наук. думка, 1989. – 99 с.
2. Казанкова И. И. Частота цветовых морф в поселениях *Mytilus galloprovincialis* в прибрежных водах южного и юго-западного Крыма // Экология моря. – 2008. – **75**. – С. 38–41.
3. Козминский Е. В., Лезин П. А. Методика цветовых измерений элементов окраски раковины у брюхоногих моллюсков // Биология моря. – 2006. – **32**, № 5. – С. 371–373.
4. Куликова А. Д. Выявления цветовых морф моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. с использованием компьютерной обработки фотографий // Мор. экол. журн. – 2012. – **11**, № 3. – С. 63–67.
5. Булатов К. В. Генетическая природа окраски раковин у черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Докл. АН УССР. Сер. Б. – 1984. – № 6. – С. 53–55.
6. Столбова Н. Г., Пиркова А. В., Ладыгина Л. В. Наследование цвета раковины у мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Цитология и генетика. – 1996. – **30**, № 6. – С. 62–65.
7. Шурова Н. М., Золотарев В. Н. Анализ фенотипической структуры поселений мидий *Mytilus galloprovincialis* Черного моря по окраске наружного призматического слоя их раковин // Мор. экол. журн. – 2008. – **7**, № 4. – С. 88–97.
8. Hochachka P. W., Fields J., Mustafa T. Animal life without oxygen: basic biochemical mechanisms // Am. Zool. – 1973. – **13**. – P. 543–555.
9. Mommsen Th. P., French C. J., Hochachka P. W. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during spawning migration of salmon // Can. J. Zool. – 1980. – **58**. – P. 1785–1799.
10. Kluytmans J. H., Zandee D. I. Comparative study of the formation and excretion of anaerobic fermentation products in bivalves and gastropods // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. – 1983. – **75**, No 4. – P. 72–732.
11. Johnson A. G., Utter F. M. Electrophoretic variants of aspartate aminotransferase of the bay mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. – 1973. – **44**. – P. 317–323.
12. Камышинков В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – Москва: МЕДпресс-информ, 2004. – 501 с.
13. Waite J. H., Tanzer M. L. Polyphenolic substances of *Mytilus edulis* // Science. – 1981. – **212**. – P. 1038–1040.
14. Inoue K., Othe S. Adhesive protein cDNA of *Mytilus galloprovincialis* encodes decapeptide repeats but no hexapeptide motif // Biol. Bull. – 1994. – **186**. – P. 349–355.
15. Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. Principles of Biochemistry. – 3rd ed. – New York: Worth Publishers, 1993. – 729 p.

А. Д. Кулікова, Т. І. Андреєнко, О. О. Солдатов

Колірний поліморфізм мушлі і активність амінотрансфераз тканин *Mytilus galloprovincialis* Lam.

*Методом фотографування і цифрової обробки знімків мушель однозначно ідентифіковано чотири колірні групи *Mytilus galloprovincialis*: чорні, перехідні, темно-коричневі, світло-коричневі. Між ними відмічено істотні відмінності в активності аланін- і аспаратамінотрансфераз, задіяних у процесах анаеробного метаболізму. Найбільші розбіжності (1,5–2,8 раза) виявлені між крайовими групами: з чорним і світло-коричневим забарвленням мушлі. Допускається, що вони можуть бути пов'язані з адаптацією молюсків до умов скельних і донних екотонів.*

A. D. Kulikova, T. I. Andreenko, A. A. Soldatov

Color polymorphism of a shell and the aminotranferase activity in *Mytilus galloprovincialis* Lam. tissues

*Using the method of digital photo processing, four color groups of *Mytilus galloprovincialis* are determined: black, intermediate, dark and light brown. The activities of alanine and aspartate aminotransferases taking part in processes of anaerobic metabolism between groups are significantly different. The highest divergence (1.5–2.8 times) was observed between the edge groups with black and light brown shell color. This is apparently related to mussel's adaptation to environmental conditions of rocky shores and seabed ecotops.*