

Estimation of experimental cohabitation between Holarctic and Baikal Endemic Amphipods Species: *G. lacustris* against *G. fasciatus*

Axenov-Gribanov D.V.^{1,2*}, Shatilina Z.M.^{1,2}, Lubyaga Y.A.^{1,2},
Emshanova V.A.¹, Vereshchagina K.P.^{1,2}, Lozovoy D.V.¹,
Kondratieva E.S.¹, Timofeyev M.A.¹

¹ Institute of Biology at Irkutsk State University, Irkutsk, 3 Lenin str., Russia

² Baikal Research Centre, Irkutsk, 21 Lenin str., Russia

*E-Mail: denis.axengri@gmail.com

Received November 18, 2017

The aim of the present study was to estimate the cohabitation effect of two invasive amphipods species (*Gammarus lacustris* and *Gmelinoides fasciatus*) by the cellular stress markers such as activity of antioxidant enzymes (peroxidase, catalase, glutathione S-transferase) and content of heat shock protein 70 (HSP70).

Changes of antioxidant enzymes activity were shown in both amphipods species. It was observed that in *G. lacustris* cohabitation with other species led to the activation of all studied enzymes, whereas in *G. fasciatus* only peroxidase activity alteration was recorded. Notably, the activation of all studied enzymes was short-term. There were no changes of HSP70 content for both species.

According to obtained data less sensitivity of *G. fasciatus* stress markers can be one of the key advantages for further successful distribution and adaptation to the new conditions.

Key words: amphipods, Baikal, invasions, biotic interactions, *Gammarus lacustris*, *Gmelinoides fasciatus*

Расселение видов за пределы изначальных ареалов носит всеобщий (глобальный) характер. Распространение организмов может происходить различными путями, в том числе посредством самостоятельной миграции, целенаправленном расселении человеком с хозяйственными целями, животными, или случайного расселения (Дгебуадзе, 2002). При этом, попадая в новые ареалы, большинство организмов погибает, так как изменившиеся условия окружающей среды оказываются не подходящими для их существования. Аборигенные виды, как правило, более приспособлены к существующим условиям среды обитания и сравнительно недавно вселившиеся виды зачастую проигрывают им при совместном обитании. Однако, со временем, часть вселенцев может адаптироваться к новым условиям, вытеснив при этом нативные виды (Rodriguez, 2006). Существует так называемое правило «десяти» (Tens rule), согласно которому 10% из занесенных видов повторно встречаются в местах и 10% от повторно встреченных распространяется далее, оставаясь в новых ареалах (Williamson, Brown, 1986; Williamson, Fitter, 1996). Таким образом, можно предположить, что инвазивные виды обладают рядом особенностей, которые позволяют им быть более успешными при конкурентном существовании с нативными видами.

Известно множество случаев, когда инвазивные виды способствовали вытеснению и полному уничтожению аборигенных видов. Например, хищный моллюск *Euglandina rosea*, которого интродуцировали для контроля численности другого вселенца - моллюска *Achatina fulica* на острова Тихого и Индийского океанов, в итоге стал причиной исчезновения ряда аборигенных видов (Coote, Loeve, 2003). Так же, инвазивные виды могут являться возбудителями различных болезней или быть их переносчиками, изменять среду существования других видов (например, меняя ландшафт), и т.д. Виды - вселенцы (и последствия их неконтролируемого расселения) несут за собой негативные экологические и экономические последствия. В связи с этим, вопрос изучения инвазий является важным направлением

современной науки.

Как было отмечено ранее, одно из последствий, возникающих при вселении новых видов, это их конкурентные взаимоотношения с нативными видами. Очевидно, что виды, находящиеся в конкурентных взаимоотношениях, будут испытывать стрессовую нагрузку, уровень которой будет выше у тех видов, которые находятся в менее выгодных условиях. Определить стрессовое воздействие можно рядом способов, одним из которых является оценка состояния известных маркеров стрессовых состояний.

Таким образом, целью настоящего исследования являлась оценка влияния совместного экспонирования видов *Gammarus lacustris* и *Gmelinoides fasciatus* на динамику клеточных и биохимических маркеров стрессовых состояний.

MATERIALS AND METHODS

В качестве объекта исследования были выбраны амфиподы видов *Gammarus lacustris* Sars, 1863 и *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899). Данные виды достаточно близки по экофизиологическим характеристикам и показателям термо- и токсикорезистентности и обладают высокой экологической пластичностью (Тимофеев, 2010).

Краткая экология видов представлена следующим образом: *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899), исторический ареал которого озеро Байкал, стал успешным видом-вселенцем. В результате акклиматизационных работ в середине 20 века, данный вид был вселен в 44 водоема европейской части России, Урала, Сибири, Казахстана и Средней Азии, откуда самостоятельно широко распространился. В настоящее время его ареал включает водоемы, расположенные между 42° и 62° северной широты и 27° и 110° восточной долготы (Визер, 2006). *Gammarus lacustris* Sars (1863) – эврибионтный вид, широко распространенный в Голарктике, обитает преимущественно в стоячих водоемах с широким спектром абиотических факторов. Не смотря на высокую экологическую пластичность *G. lacustris*, согласно многочисленным исследованиям, в новых ареалах был частично замещен или даже полностью вытеснен байкальским

G. fasciatus (Berezina et al., 2009; Курашов и др., 2012).

Амфиподы были собраны в двух водоёмах: представители вида *G. fasciatus* были выловлены в районе пос. Б. Коты (Южный Байкал, 51.903044, 105.070403), а *G. lacustris* собран в заводи р. Ангары в черте города Иркутска на о. Конный (52.267970, 104.281082). В ходе экспериментального исследования проведено определение взаимного влияния видов друг на друга посредством оценки динамики содержания высокочувствительных биохимических маркеров стрессовых состояний – активности ферментов антиоксидантной системы (АОС) (каталазы, пероксидазы и глутатион S-трансферазы) и содержания стрессовых белков (белков теплового шока БТШ70).

Длительность экспериментов составила 14 суток. В аквариумы объемом 3 литра помещали совместно по 100 особей *G. lacustris* и 500 особей *G. fasciatus*. Контрольную выборку амфипод содержали в аналогичных условиях, отдельно по видам (исключая фактор совместного обитания). Эксперименты проводили при температуре пробоотбора – 15°C, с использованием воды, состоящей из смеси воды из оз. Байкал и воды из заводи р. Ангары в соотношении 1:1. Амфипод кормили измельченной смесью, состоящей из высушенного детрита и амфипод обоих видов. В ходе проведения эксперимента образцы фиксировали в жидком азоте для последующего биохимического анализа.

Оценку активности ферментов АОС (пероксидазы, каталазы и глутатион S-трансферазы) проводили согласно модифицированным (Timofeyev, 2006; Bedulina et al., 2010) спектрофотометрическим методикам Drotar et al. (1985), Aebi (1984) и Habig et al. (1974). Измерения проводили на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США) при $\lambda=436$ нм для пероксидазы, при $\lambda=240$ нм для каталазы и при $\lambda=340$ нм для глутатион S-трансферазы.

Содержание БТШ70 определяли стандартным методом денатурирующего электрофореза с ДДС-Na в 12,5 % полиакриламидном геле (Laemmli, 1970) с

последующим Вестерн-блоттингом (Bers, Garfin, 1985). Для визуализации БТШ70 полученные мембраны инкубировали сначала с антителами к БТШ70 (мышинные антитела к Hsp70; Sigma-Aldrich, # H5147, разведение 1:10000). Затем, после отмытки от непрореагировавших первичных антител, мембраны инкубировали в растворе вторичных антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой (антитела к иммуноглобулину мыши IgG:AP Conj., Sigma-Aldrich # A3562, разведение 1:1000). В качестве референтного белка был использован актин. Для визуализации актина использовали следующие антитела: поликлональные антитела к β -актину (кроличьи антитела Sigma-Aldrich #A266, разведение 1:1000) и антитела к иммуноглобулину кролика (Sigma-Aldrich #A9919, разведение 1:1000). Полуколичественный анализ содержания исследуемого белка на мембранах проводили с помощью программы Fiji. Относительное содержание белка выражали в условных единицах (усл. ед.), полученных путем деления значения оптической плотности БТШ70 на значение оптической плотности соответствующего актина.

Все эксперименты проведены в 7 биологических параллелях. Биохимический анализ каждой пробы проведен в 3-х аналитических измерениях. Данные анализировали с применением дисперсионного анализа ANOVA. Оценку достоверности проводили, используя U-критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием программы Past 3.12.

RESULTS AND DISCUSSION

Материалы, характеризующие изменения активности ферментов АОС, свидетельствующих об окислительном стрессе, у амфипод видов *G. lacustris* и *G. fasciatus* в ходе совместной экспозиции, представлены на рис. 1-3. Установлено, что общей реакцией для исследуемых видов являлось повышение активности пероксидазы. У представителей вида *G. lacustris* кратковременное повышение активности фермента отмечали спустя 11 суток совместной экспозиции. При этом, активность пероксидазы повышалась с

0,016±0,009 нКат/мг белка до 0,026±0,006 нКат/мг белка ($p=0,0076$). Активность данного фермента у представителей вида *G. fasciatus* изменялась позже. Так, повышение активности пероксидазы у *G. fasciatus* относительно контрольных значений наблюдали лишь спустя 14 суток совместной экспозиции - с 0,019±0,007 нКат/мг белка до 0,031±0,002 нКат/мг белка ($p=0,024$) (Рис. 1).

Активность фермента АОС каталазы у вида *G. lacustris* при совместной экспозиции видов незначительно увеличивалась с 860,94±284,32 нКат/мг белка до 1058,32±213,24 нКат/мг белка ($p=0,044$) спустя 14 суток эксперимента. У представителей вида *G. fasciatus* активность данного фермента оставалась в зоне контрольных значений (749,85±157,44 нКат/мг белка) на протяжении всего проведенного эксперимента (Рис. 2).

На рис. 3 приведены материалы, характеризующие изменение активности фермента АОС глутатион S-трансферазы. Как и в случае с каталазой, совместная экспозиция видов повлияла на активность фермента незначительно - отмечено повышение активности фермента с 7,58±1,40 нКат/мг белка до 9,05±0,76 нКат/мг белка ($p=0,008$) у вида *G. lacustris* лишь спустя 11 суток эксперимента. У то же время у представителей вида *G. fasciatus* активность глутатион S-трансферазы оставалась в диапазоне контрольных значений (6,79±0,72 нКат/мг белка) на протяжении всей совместной экспозиции (Рис. 3).

Так же оценивали содержание стрессовых белков БТШ70, являющихся показателем клеточных повреждений. Для видов *G. lacustris* и *G. fasciatus*, обитающих совместно на протяжении 14 суток, каких-либо изменений в содержании данных белков выявлено не было. При этом для обоих анализируемых видов отмечены адаптационные изменения, проявляющиеся в изменении содержания стрессовых белков в контрольных образцах. Так, для представителей контрольной выборки обоих видов отмечали снижение содержания БТШ70: после 4 суток эксперимента для вида *G. fasciatus* ($p=0,01$) и спустя 8 суток экспозиции для вида *G. lacustris* ($p=0,01$). По достижении 14 суток экспозиции, содержание БТШ70 у вида *G.*

fasciatus возвращалось к исходным значениям (уровню белка в момент вылова амфипод), тогда как у представителей вида *G. lacustris*, напротив, восстановления до исходного уровня не отмечали (Рис. 4).

Таким образом, в ходе настоящего исследования показано, что совместная экспозиция видов *G. lacustris* и *G. fasciatus* вызывает активацию ферментов АОС. При этом, у особей вида *G. lacustris* отмечали большую чувствительность к исследуемому фактору, что выражалось в повышении активности всех трех исследованных ферментов: пероксидазы, каталазы и глутатион S-трансферазы. В то же время у представителей вида *G. fasciatus* отмечали активацию лишь одного фермента – пероксидазы. При этом следует отметить, что активация ферментов во всех случаях была незначительной и ее наблюдали к окончанию эксперимента. Известно, что основной функцией АОС является защита организма от окислительного стресса (Меньщикова *и др.*, 2006). Окислительный стресс вызывают ряд факторов, таких как температурное, токсическое воздействия, влияние УФ-излучения, гипероксия и др. (Зенков *и др.*, 2001). В нашем исследовании активация АОС может быть обусловлена образованием активных форм кислорода ввиду присутствия в экспериментальной среде обитания вида – конкурента и индуцированными изменениями в метаболизме другого вида амфипод. При этом можно сделать заключение, что для *G. lacustris* совместное обитание с видом *G. fasciatus* является более негативным. Отмеченная меньшая чувствительность ферментов АОС *G. fasciatus* (при совместном содержании с *G. lacustris*) может являться преимуществом данного вида и способствовать его успешному расселению и вытеснению им вида *G. lacustris*, что отмечают в ряде исследований (Березина, 2004; Курашов *и др.*, 2012).

Еще одним исследованным в данной работе стресс-маркером является стрессовый белок семейства БТШ70. По имеющимся литературным данным БТШ принимают активное участие в механизмах поддержания белкового гомеостаза и участвуют в процессах фолдинга (Mayer, Goloubinoff,

2017). При стрессовых воздействиях различной природы, когда происходит нарушение структуры клеточных белков, содержание БТШ70 увеличивается (Morimoto, Nollen, 2009; Baby et al., 2012; Подлипаева и др., 2016). Помимо основных функций, БТШ70 выполняют и ряд других. Так, например, известно, что их содержание изменяется у организмов при межвидовых взаимоотношениях, таких как паразитизм и симбиоз (Feder, Hofmann, 1999). В нашем исследовании для обоих видов амфипод, подвергшихся совместной экспозиции, изменений содержания БТШ70 не показано. Таким образом, предложенные экспериментальные условия не являются для исследуемых видов критическими. Также, в пользу этого факта свидетельствует и выявленный период адаптации вида *G. fasciatus* к лабораторным условиям. На это

указывает восстановление содержания БТШ70 до начальных значений в контрольных выборках амфипод, в отличие от амфипод вида *G. lacustris*. Для последнего отмечали снижение содержания БТШ70 в контрольных образцах в ходе длительной лабораторной экспозиции.

Таким образом, в ходе проведенного исследования впервые оценена динамика маркеров стрессовых состояний у амфипод видов *G. lacustris* и *G. fasciatus* при отдельной и совместной экспозиции и показано, что отмеченная меньшая чувствительность ферментов АОС, наблюдаемая у представителей вида *G. fasciatus* (при совместном содержании с *G. lacustris*) может являться одним из преимуществ данного вида и способствовать его успешному расселению в новые ареалы.

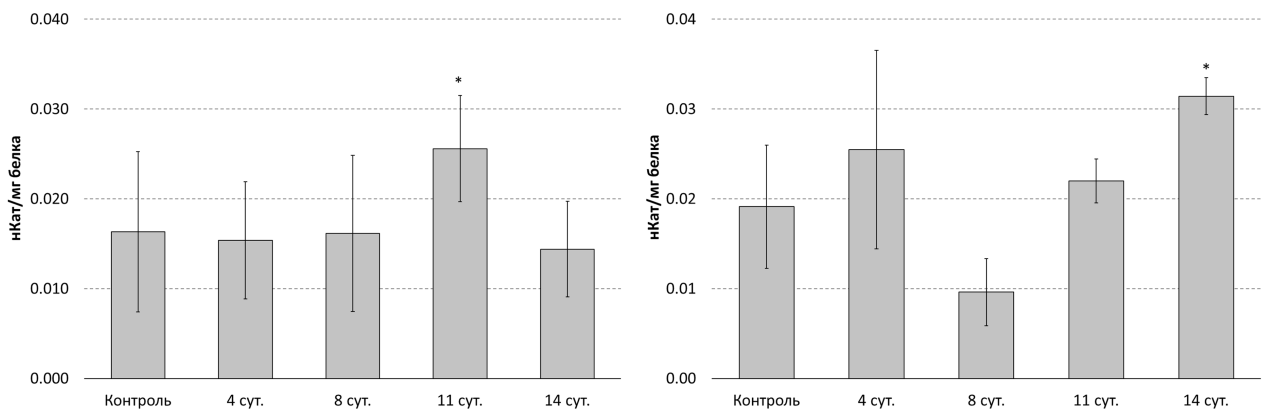


Figure 1. Активность фермента пероксидазы у представителей *G. lacustris* (слева) и *G. fasciatus* (справа) при отдельной (контроль) и при совместной экспозиции видов.

* - статистически значимые различия ($P < 0,05$)

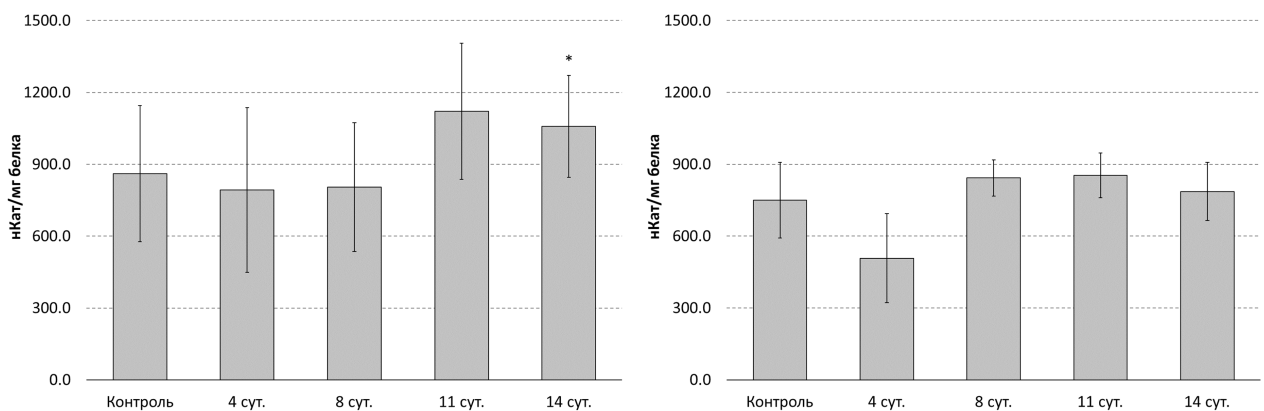


Figure 2. Активность фермента каталазы у представителей *G. lacustris* (слева) и *G. fasciatus* (справа) при отдельной (контроль) и при совместной экспозиции видов.

* - статистически значимые различия ($P < 0,05$)

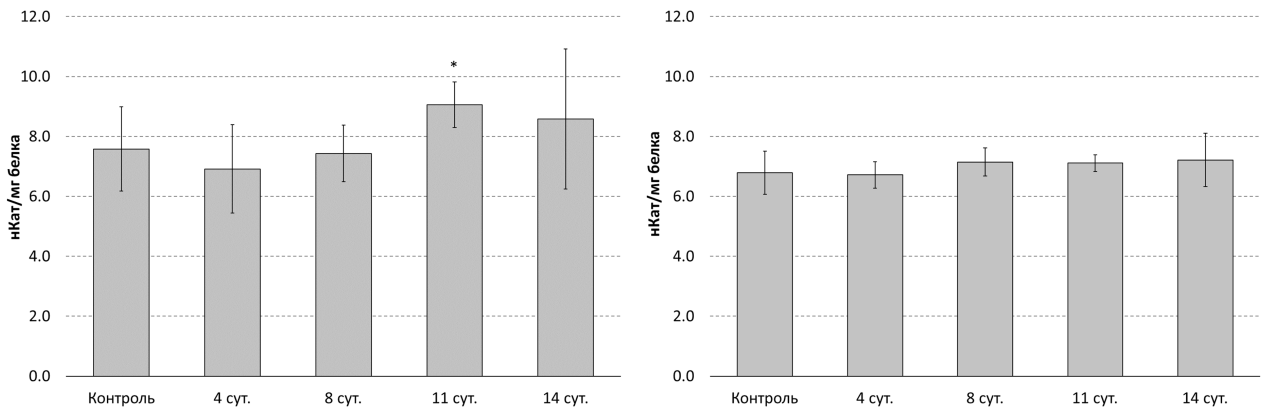


Figure 3. Активность фермента глутатион S-трансферазы у представителей *G. lacustris* (слева) и *G. fasciatus* (справа) при отдельной (контроль) и при совместной экспозиции видов.

* - статистически значимые различия ($P < 0,05$)

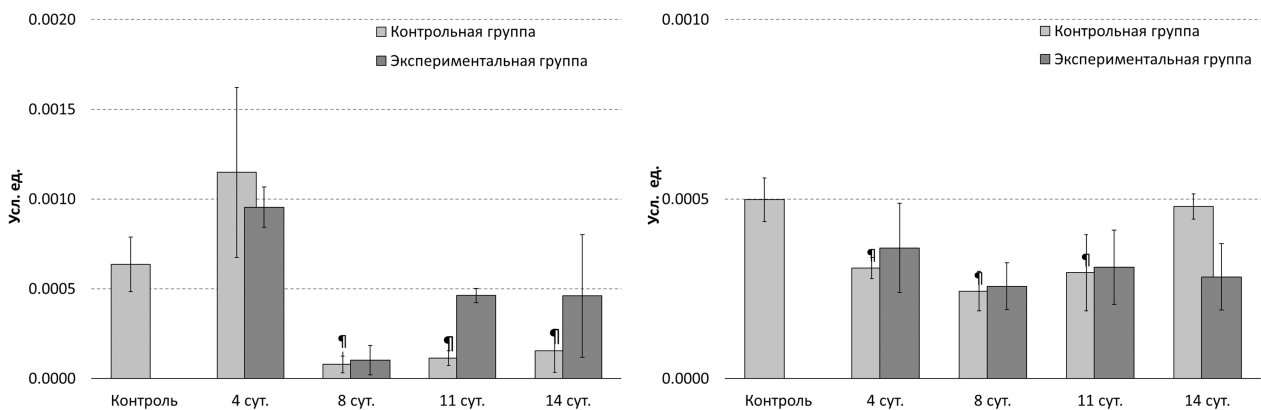


Figure 4. Содержание стрессовых белков БТШ70 (в усл. ед.) у представителей *G. lacustris* (слева) и *G. fasciatus* (справа) при отдельной (контроль) и при совместной экспозиции видов.

¶ - статистически значимые различия между начальными контрольными значениями (сразу после вылова) и контрольными значениями в ходе экспозиции.

ACKNOWLEDGEMENT

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проектов РФФИ № 16-34-60060, 16-34-00687, 17-44-388067, РНФ № 17-14-01063, а также Госзадания № 6.9654.2017/8.9.

REFERENCES

- Березина Н.А. (2004) Причины, особенности и последствия распространения чужеродных видов амфипод в водных экосистемах Европы. В Alimov A. F., Bogutskaya N. G. Biological invasions in aquatic and terrestrial ecosystems. P. 254 – 268.
- Визер А.М. (2006) Акклиматизация байкальских гаммарид и дальневосточных мизид в Новосибирском водохранилище. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Томск, 2006. 21 с.
- Дгебуадзе Ю.Ю. (2002) Проблемы инвазий чужеродных организмов. Экологическая безопасность и инвазии чужеродных организмов. Сборник материалов Круглого стола Всероссийской конференции по экологической безопасности России (4-5 июня 2002 г.). М.: ИПЭЭ им. А.Н. Северцева, IUCN (МСОП). 11-14.
- Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. (2001) Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: Наука. Интерпериодика. 340 с.

- Курашов Е.А., Барбашова М.А., Барков Д.В., Русанов А.Г., Лаврова М.С. (2012) Инвазивные амфиподы как фактор трансформации экосистемы Ладожского озера. *Российский Журнал Биологических Инвазий*, **(2)**, 87–104.
- Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. (2006) Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма "Слово". 553 с.
- Миркин Б.М., Наумова Л.Г. (2011) Краткий курс общей экологии. Часть I: Экология видов и популяций: Учебник. Уфа: Изд-во БГПУ, 2011. 206 с.
- Подлипаева Ю.И., Гудков А.В., Бергер В.Я. (2016) Изменение содержания стрессового белка 70 кДа в процессе акклимации моллюсков *Mytilus edulis* L. к пониженной солености. *Цитология*, **58(7)**, 562-566.
- Тимофеев М.А. (2010) Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: Дис. ... Д-р. биол. Наук: 030208 / М.А. Тимофеев; ТГУ; Томск, 2010. 384 с.
- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, **105**, 121-126.
- Baby J., Jency G., Jeevitha M. V. (2012) Impact of heavy metals and Hsp response. *IJB*, **2(9)**. 51-64.
- Bedulina D.S., Zimmer M., Timofeyev M.A. (2010) Sub-littoral and supra-littoral amphipods respond differently to acute thermal stress. *CBP B*, **155(4)**, 413 – 418.
- Berezina, N. A., Zhakova, L. V., Zaporozhets, N. V. & Panov, V. E. (2009) Key role of the amphipod *Gmelinoides fasciatus* in reed beds of Lake Ladoga. *Boreal Env. Res.*, **14 (3)**, 404–414.
- Bers G., Garfin D. (1985) Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection. *BioTech.* **3**, 276–288.
- Coote T., Loève É. (2003) From 61 species to five: Endemic tree snails of the Society Islands fall prey to an ill-judged biological control programme. *Oryx*, **37(1)**, 91-96.
- Drotar A., Phelps P., Fall R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.*, **42**, 35 – 40.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *JBC*, **249**, 7130 – 7139.
- Feder M. F., Hofmann G. E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, **61**, 243-282
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Mayer M. P., Goloubinoff P., eds. (2017) The HSP70 molecular chaperone machines. Lausanne: Frontiers Media, 69 p.
- Morimoto R. I., Nollen E. A. A. (2009) The heat shock response and the stress of misfolded proteins. In: Handbook of Cell Signaling. 267–274.
- Rodriguez L. F. (2006) Can invasive species facilitate native species? Evidence of how, when, and why these impacts occur. *Biol Invasions*, **8**, 927–939
- Timofeyev M.A. (2006) Antioxidant enzyme activity in endemic Baikalean versus Palaeartic amphipods: Tagma- and size-related changes. *Comp Biochem physiol B*, **143(3)**, 302-308.
- Williamson M. H., Brown K. C. (1986) The analysis and modelling of British invasions. *Philos. Trans. Royal Soc. B*, **314(1167)**, 533-570.
- Williamson M., Fitter A. (1996) The characters of successful invaders. *Biol. Conserv.*, **78**, 163-170.