

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Дальневосточный федеральный университет

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук

**ИССЛЕДОВАНИЯ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ
ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА:
БИОРАЗНООБРАЗИЕ, МОНИТОРИНГ
И РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕСУРСОВ**

**STUDIES OF MARINE ORGANISMS IN THE FAR EAST:
BIODIVERSITY, MONITORING, AND RATIONAL
MANAGEMENT OF RESOURCES**

Монография

*Под общей редакцией
академика В.В. Малахова,
д-ра биол. наук А.В. Чернышева*

Владивосток



2020

УДК 574
ББК 28.08
И88

*Издание осуществлено при финансовой поддержке
Российского научного фонда, программа № 14-50-00034*

Рецензенты:

д-р биол. наук, профессор А.Б. Цетлин; д-р биол. наук, чл.-корр. РАН В.В. Юшин.

Коллектив авторов:

Н.В. Жукова (гл. 1), Е.С. Балакирев (гл. 2), К.В. Ефимова (гл. 3), Т.Ю. Орлова (гл. 3),
Ю.Ф. Картавец (гл. 4), С.В. Туранов (гл. 4), А.О. Золотова (гл. 4),
Н.А. Одинцова (гл. 5), М.А. Майорова (гл. 5), А.А. Анисимова (гл. 6),
И.А. Дмитриева (гл. 6), Ю.Н. Сокольников (гл. 6), А.В. Гринченко (гл. 6),
В.Г. Спудулите (гл. 6), В.В. Мордухович (гл. 7), Н.П. Фадеева (гл. 7),
С.И. Кияшко (гл. 7), М.В. Малютина (гл. 8), О.А. Головань (гл. 8).

И88 **Исследования морских гидробионтов Дальнего Востока: биоразнообразие, мониторинг и рациональное использование ресурсов** = Studies of marine organisms in the Far East: Biodiversity, monitoring, and rational management of resources : монография / Н.В. Жукова, Е.С. Балакирев, К.В. Ефимова [и др.] ; под общ. ред. В.В. Малахова, А.В. Чернышева ; ДВФУ ; Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. – Владивосток : Изд-во Дальневост. федерал. ун-та, 2020. – 382 с.
ISBN 978-5-7444-4757-1.

Монография посвящена исследованиям, выполненным в рамках программы Российского научного фонда «Технологии мониторинга и рационального использования морских биологических ресурсов». Рассмотрены результаты мониторинга токсичных микроводорослей, эффективные генные маркеры для идентификации и анализа близких эволюционных линий морских беспозвоночных и рыб, липиды и жирные кислоты голожаберных моллюсков, воздействие криогенных температур на клетки морских моллюсков, сравнительный анализ гемолимфы приморских гребешков из импактного и фонового районов, анализ соотношений стабильных изотопов и состава жирных кислот в трофоэкологических исследованиях морских нематод, разнообразие и распределение глубоководных равноногих раков в северо-западной Пацифике.

Предназначена для морских биологов, биохимиков, генетиков, цитологов, альгологов, зоологов, преподавателей и студентов.

УДК 574
ББК 28.08

The monograph is an overview of recent studies carried out within the framework of the Russian Science Foundation's program entitled "Technologies for monitoring and rational use of marine biological resources". In eight chapters, it considers such issues as the toxic microalgae monitoring, efficient gene markers for identifying and analyzing close evolutionary lineages of marine invertebrates and fish, lipids and fatty acids of nudibranch mollusks, the impact of cryogenic temperatures on marine mollusk cells, a comparative analysis of the hemolymph of Yesso scallops collected from impact-exposed and background regions, an analysis of stable isotope ratios and fatty acid composition for trophoecological studies of marine nematodes, and the diversity and distribution of deep-sea isopods in the northwestern Pacific Ocean.

This book provides insights into topics of interest for a wide audience, including marine biologists, biochemists, geneticists, cytologists, phycologists, zoologists, teachers, and students.

ISBN 978-5-7444-4757-1

© ФГАОУ ВО ДВФУ, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ.....	4
ГЛАВА 1. НЕОБЫЧНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ ГОЛОЖАБЕРНЫХ МОЛЛЮСКОВ: ОТРАЖЕНИЕ ПИТАНИЯ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОНТОВ Н.В. ЖУКОВА ..	5
ГЛАВА 2. ГЕНЕТИКА СОХРАНЕНИЯ МОРСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НА ПРИМЕРЕ МОРСКОГО ЕЖА <i>STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS</i> Е.С. БАЛАКИРЕВ	36
ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВРЕДОНОСНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА АКВАТОРИИ МОРЕЙ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО РЕГИОНА К.В. ЕФИМОВА, Т.Ю. ОРЛОВА	104
ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ НА ПРИМЕРЕ РЫБ Ю.Ф. КАРТАВЦЕВ, С.В. ТУРАНОВ, А.О. ЗОЛотоВА	140
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КРИОГЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК МОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ Н.А. ОДИНЦОВА, М.А. МАЙОРОВА.....	238
ГЛАВА 6. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕМОЛИМФЫ В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРА В МОНИТОРИНГЕ СОСТОЯНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ПРИМОРСКОГО ГРЕБЕШКА <i>MIZUNORESTEN YESSOENSIS</i> А.А. АНИСИМОВА, И.А. ДМИТРИЕВА, Ю.Н. СОКОЛЬНИКОВА, А.В. ГРИНЧЕНКО, В.Г. СПУДУЛИТЕ.....	273
ГЛАВА 7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНАЛИЗА СООТНОШЕНИЙ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ И СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ТРОФОЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ МОРСКИХ СВОБОДНОЖИВУЩИХ НЕМАТОД В.В. МОРДУХОВИЧ, Н.П. ФАДЕЕВА, С.И. КИЯШКО	307
ГЛАВА 8. РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РАВНОНОГИХ РАКООБРАЗНЫХ (CRUSTACEA: ISOPODA) В ГЛУБОКОВОДНЫХ РАЙОНАХ СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ПАЦИФИКИ ПО ДАННЫМ ЭКСПЕДИЦИЙ SOJABIO, KURAMBIO, SOKNOBIO И KURAMBIO II М.В. МАЛЮТИНА, О.А. ГОЛОВАНЬ.....	347

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящая коллективная монография объединяет избранные главы, написанные сотрудниками лаборатории биологии морских беспозвоночных Дальневосточного федерального университета в рамках программы «Технологии мониторинга и рационального использования морских биологических ресурсов» (№ 14-50-00034). Программа финансировалась Российским научным фондом в 2014–2018 гг. и ее основной целью было создание научно-образовательной и технологической площадки для разработки и внедрения новейших технологий в области мониторинга, рационального использования и сохранения морских биологических ресурсов Дальнего Востока России. За 5 лет в программе приняло участие более 100 ученых, опубликовано более 400 работ в индексируемых научных изданиях. В рамках программы была создана Лаборатория биологии морских беспозвоночных (в настоящее время – Лаборатория экологии и эволюционной биологии водных организмов), на базе которой проводились исследования многих групп морских беспозвоночных, а также рыб и протистов. Результаты этих исследований в основном опубликованы в международных изданиях, однако возникла необходимость в обобщении опубликованных и неопубликованных материалов. Инициаторами создания коллективной монографии являлись заведующий лабораторией академик Владимир Васильевич Малахов и заведующий кафедрой биоразнообразия и морских биоресурсов ДВФУ академик Андрей Владимирович Адрианов. Каждая глава представляет собой обзор исследований в области генетики, биохимии, гидробиологии, альгологии и клеточной биологии. В их написании приняли участие сотрудники Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН и Дальневосточного федерального университета. Большую помощь в подготовке рукописей оказала А.С. Майорова (ННЦМБ). Редакторы также выражают благодарность А.В. Адрианову, С.Н. Гончаровой и А.А. Сергеевичу (ДВФУ) за содействие в публикации книги. Все этапы работы над монографией были выполнены при финансовой поддержке РФФ (программа № 14-50-00034).

Редакторы

НЕОБЫЧНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ ГОЛОЖАБЕРНЫХ МОЛЛЮСКОВ: ОТРАЖЕНИЕ ПИТАНИЯ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОНТОВ

Н.В. Жукова

*Национальный научный центр морской биологии
им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение
Российской Академии наук, 690041, Владивосток, Россия;
E-mail: nzhukova35@list.ru*

UNUSUAL COMPOSITION OF FATTY ACIDS OF NUDIBRANCHIA: CONTRIBUTION OF DIET AND BACTERIAL SYMBIONTS

N.V. Zhukova

*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology,
Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041,
Russia; E-mail: nzhukova35@list.ru*

Изучены липиды и жирные кислоты голожаберных моллюсков (Nudibranchia), обитающих в умеренных водах западной Пацифики, что позволило восполнить пробел в знаниях по липидной биохимии этой группы моллюсков. Определен состав липидов, фосфолипидов и жирных кислот, установлены структуры жирных кислот. Получены новые данные о закономерностях распределения и разнообразия липидов и жирных кислот морских животных. Установлены особенности состава их липидных компонентов, связанные с их видовым разнообразием.

Определены источники происхождения ряда необычных жирных кислот в представителях Nudibranchia. Показано существование симбиотических бактерий в тканях голожаберных моллюсков. Установлено, что специфичность состава жирных кислот определяется характером потребленной пищи, существованием симбиоза с бактериями и собственными биосинтетическими способностями моллюсков. Оценен потенциал голожаберных моллюсков как источника биологически активных липидов и жирных кислот. Показано, что голожаберные моллюски явля-

ются продуцентами разнообразных биологически активных липидов фармакологического применения.

The lipids and fatty acids of the Nudibranchia inhabiting the temperate waters of the West Pacific were studied, which made it possible to fill the gap in knowledge of the mollusk lipid biochemistry. The composition of lipids, phospholipids and fatty acids has been determined; the structures of fatty acids have been established. New data on the patterns of distribution and diversity of lipids and fatty acids of marine animals obtained. The features of the composition of their lipid components associated with their species di-

versity have been recognized. The sources of origin of a number of unusual fatty acids in the representatives of Nudibranchia were identified. The presence of symbiotic bacteria in the tissues of nudibranch mollusks has been proven. It has been established that the specificity of the composition of fatty acids is determined by the nature of the food consumed, the existence of symbiosis with bacteria and the own biosynthetic abilities of mollusks. The potential of nudibranch mollusks as a source of biologically active lipids and fatty acids has been estimated. It was shown that nudibranch mollusks are producers of various biologically active lipids of pharmacological use.

Введение¹

Молекулярное разнообразие химических соединений, обнаруженных у морских животных, является результатом эволюции организмов и их уникальных физиологических и биохимических адаптаций и предоставляет шанс для открытия новых биологически активных соединений с разнообразными уникальными структурами и биологическими активностями (Evans-Illidge et al., 2013). Морские моллюски стали объектом многих химических исследований, направленных на выделение и идентификацию новых природных соединений (Benkendorff, 2010). Тип Моллюски является вторым по величине типом животных. Среди них голожаберные моллюски (Nudibranchia) часто очень красочные, не защищенные раковиной из-за чего называемые морскими слизнями, вызывают активный интерес к их вторичным метаболитам, которые осуществляют химическую защиту от хищников (Cimino, Gavagnin, 2006). Эти соединения обладают разнооб-

¹ В тексте приняты следующие сокращения:ДФГ, дифосфатидилглицерин; ЖК, жирные кислоты; КАЭФ, керамид-аминоэтилфосфонат; МАДАГ, моноалкил-диацилглицериды; МНЖК, мононенасыщенные жирные кислоты; НЖК, насыщенные жирные кислоты; НРЖК, нечетные и разветвленные жирные кислоты; НМРЖК, метилен-разделенные жирные кислоты; ПНЖК, полиненасыщенные жирные кислоты; СДЦЖК, сверх-длинноцепочечные жирные кислоты; СЖК, свободные жирные кислоты; СТ, стерины; ТАГ, триацилглицериды; ФИ, фосфатидилинозитол; ФЛ, фосфолипиды; ФС, фосфатидилсерин; ФХ, фосфатидилхолин; ФЭ, фосфатидилэтаноламин.

разием химических структур (Faulkner, 2000) и проявляют ихтиотоксические, отпугивающие и цитотоксические свойства, обладают антибактериальной активностью, действуют как половые феромоны (Avila, 1995). Кроме этого они отвечают за различные биоактивности, такие как противоопухолевая, противовоспалительная и антиоксидантная активность. Очевидно, что пищевые источники вносят значительный вклад в химическое разнообразие метаболитов, обнаруживаемых у моллюсков (Avila, 1995), однако их биосинтез *de novo* также был описан для нескольких видов моллюсков (Fontana, 2006). Вторичные метаболиты, выделенные из моллюсков, разделяются на широкий круг структурных классов, причем некоторые соединения преобладают в определенных таксонах. Среди Gastropoda преобладают терпены, тогда как производные жирных кислот относительно редки (Benkendorff, 2010).

Моллюски, как и беспозвоночные в целом, представляют собой источник липидных биоактивных соединений, проявляющих разнообразные нутрицевтические и фармацевтические свойства (Benkendorff, 2010). Среди них *n*-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), такие как эйкозапентаеновая кислота 20:5 n -3 и докозагексаеновая кислота 22:6 n -3, известны своим благотворным влиянием на здоровье человека (Simopoulos, 2008). Эти *n*-3 ПНЖК широко известны своими способностями к кардиопротекции; они снижают уровень триацилглицерина и холестерина; оказывают противовоспалительное и противоопухолевое действие (Wendel, Heller, 2009). Многочисленные эксперименты на животных подтвердили противораковые свойства *n*-3 ПНЖК из морских источников (Candela et al., 2011).

Некоторые другие морские липиды также проявили потенциальные биоактивные свойства. Моногалактозилдиацилглицеролы и дигалактозилдиацилглицеролы из морской микроводоросли *Nannochloropsis granulata* Karlson & Potter, 1996, как сообщалось, обладают ингибирующей активностью в отношении оксида азота (Banskota et al., 2012). Бетаиновый липид из *N. granulata*, диацилглицерилтриметилгомосерин, проявляет ингибирующую активность в отношении оксида азота, что указывает на возможную ценность в качестве противовоспалительного агента (Banskota et al., 2013). Гликолипид сульфохиновозилдиацилглицерин из красной водоросли *Osmundaria obtusiloba* (C.Agardh) R.E. Norris (de Souza et al., 2012) и из бурой водоросли *Sargassum vulgare* C.Agardh (Plouguerne et al., 2013) проявил сильную противовирусную активность в отношении вируса простого

герпеса 1 и 2 типа. Этот гликолипид из бурой водоросли *Lobophora variegata* (Lamouroux Womersley ex Oliveira 1977) обладает выраженной антипротозойной активностью (Cantillo-Ciau et al., 2013). Исследования гликофинголипидов из морской губки *Axinyssa djiferi* (Boury-Esnault et al., 2002) доказали их высокую антиплазмодную активность (Farokhi et al., 2013). Хотя интерес к составу жирных кислот моллюсков не уменьшился, становится все более очевидным, что различные таксоны морских беспозвоночных могут быть источником необычных морских липидов с ценными свойствами биологически активных веществ.

Цель исследования – установить особенности состава липидов и жирных кислот представителей отряда Nudibranchia западной Пацифики, связанные с их видовым разнообразием и специфичностью потребляемой пищи, при этом уделить особое внимание установлению структур молекул, определению источников происхождения и путей трансформации ЖК в моллюсках, а также оценить новые источники биологически активных липидов.

Классы липидов

Липиды выполняют важные биологические функции в качестве соединений аккумулирующих энергию, структурных компонентов клеточных мембран и сигнальных молекул. Исследованные виды голожаберных (Таблица 1) имеют сходный липидный состав, наблюдаются незначительные вариации классов липидов в зависимости от вида (рис. 1).

Липидный состав показал, что у большинства исследованных видов основным классом липидов являются фосфолипиды (ФЛ) и, в меньшей степени, стерины (СТ) (13,5–16,1% от общего количества липидов). Концентрация ФЛ в голожаберных, которая варьирует в пределах от 73,8% у *Chromodoris geometrica* Risbec, 1928 до 81,7% у *Glossodoris cincta* (Bergh, 1888), намного выше, чем было обнаружено у других моллюсков и беспозвоночных (Joseph, 1982). Триацилглицериды (ТАГ), моноалкилдиацилглицериды (МАДАГ) и свободные жирные кислоты (СЖК), которые являются запасными соединениями клеток, являются второстепенными компонентами (2,6,3,4 и 2,6%, соответственно). Обнаруженное распределение было сходным с таковым, описанным для двух других тропических видов голожаберных (Zhukova, 2007), и подтверждает наличие в тканях этих моллюсков высокого содержания мембранных фосфолипидов и низкого уровня запасных липидов. Исключение составил моллюск

Onchidoris sp., концентрация ТАГ у которого достигала 17,2%, кроме этого богаты эфирами стерина *Okenia distincta* Baba, 1940 (26,2%) и *Diaulula odonoghuei* Steinberg, 1963 (10,5%). Уровень нейтральных запасных липидов, как известно, является видоспецифичным и зависит в основном от стратегии жизненного цикла и пищевой доступности (Gannefors et al., 2005).

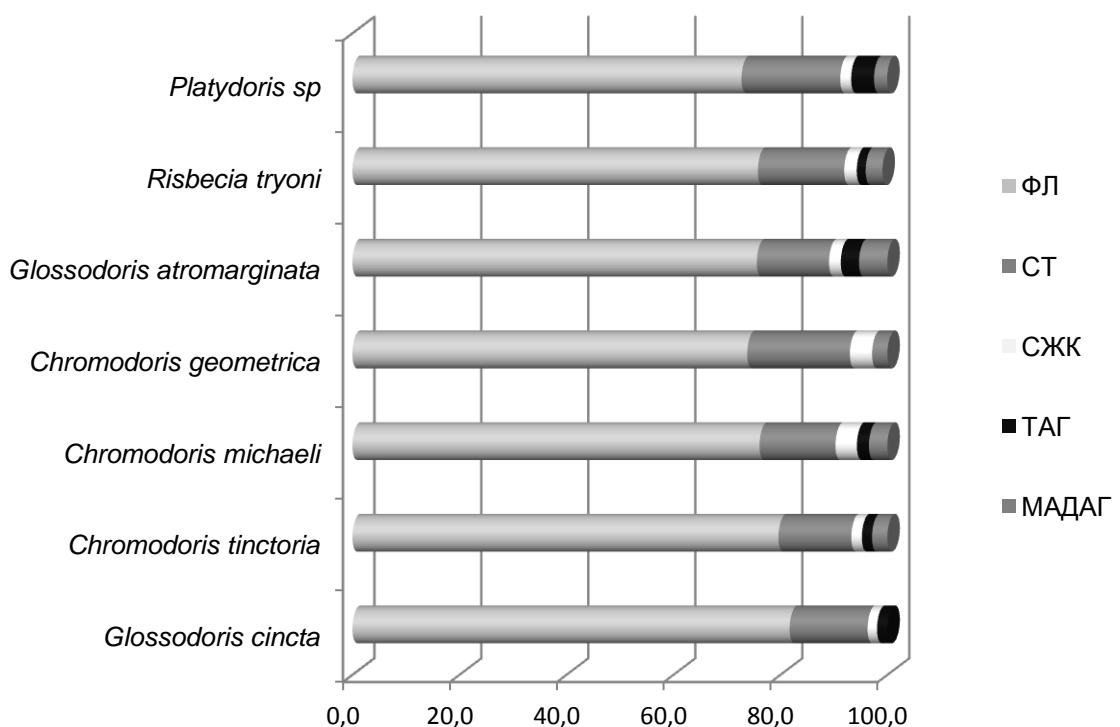


Рис. 1. Содержание классов липидов (% от общего количества липидов) у голожаберных моллюсков. Результаты выражены как среднее для восьми видов. ФЛ – фосфолипиды, СТ – стерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ТАГ – триацилглицериды, МАДАГ – моноалкил-диацилглицериды.

**Список исследованных видов голожаберных
моллюсков и места их сбора**

Вид	Место сбора
<i>Chromodoris michaeli</i> Gosliner & Behrens, 1998	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Chromodoris geometrica</i> (Risbec, 1928)	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Chromodoris tinctoria</i> (Rüppell & Leuckart, 1830)	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Dendrodoris nigra</i> (Stimpson, 1855)	Зал. Seongsan Sunrise Peak, о. Чеджу, Ю. Корея
<i>Discodoris lilacina</i> (Gould, 1852)	Зал. Seongsan Sunrise Peak, о. Чеджу, Ю. Корея
<i>Glossodoris atromarginata</i> (Cuvier, 1804)	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Glossodoris cincta</i> (Bergh, 1888)	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Risbecia tryoni</i> (Garrett, 1873)	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Platydoris</i> sp.	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Diaulula odonoghuei</i> Steinberg, 1963	Зал. Петра Великого, Японское море, Россия
<i>Okenia distincta</i> Baba, 1940	Зал. Петра Великого, Японское море, Россия
<i>Onchidoris</i> sp.	Зал. Петра Великого, Японское море, Россия
<i>Rostanga alisae</i> Martynov, 2003	Зал. Петра Великого, Японское море, Россия
<i>Phyllidia ocellata</i> Cuvier, 1804	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Phyllidia coelestis</i> Bergh, 1905	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Phyllidia varicosa</i> Lamarck, 1801	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам
<i>Phyllidiella pustulosa</i> (Cuvier, 1804)	Зал. Нячанг, Южно-Китайское море, Вьетнам

Полярные липиды

Данные по составу ФЛ, полученные для голожаберных (рис. 2), отличались от данных других видов моллюсков повышенной концентрацией ФХ (наибольшая концентрация отмечена у *Chromodoris tinctoria*. Фосфолипид КАЭФ относительно распространен у некоторых беспозвоночных и ранее был обнаружен у пресноводных и морских моллюсков (Nanúš et al., 2009).

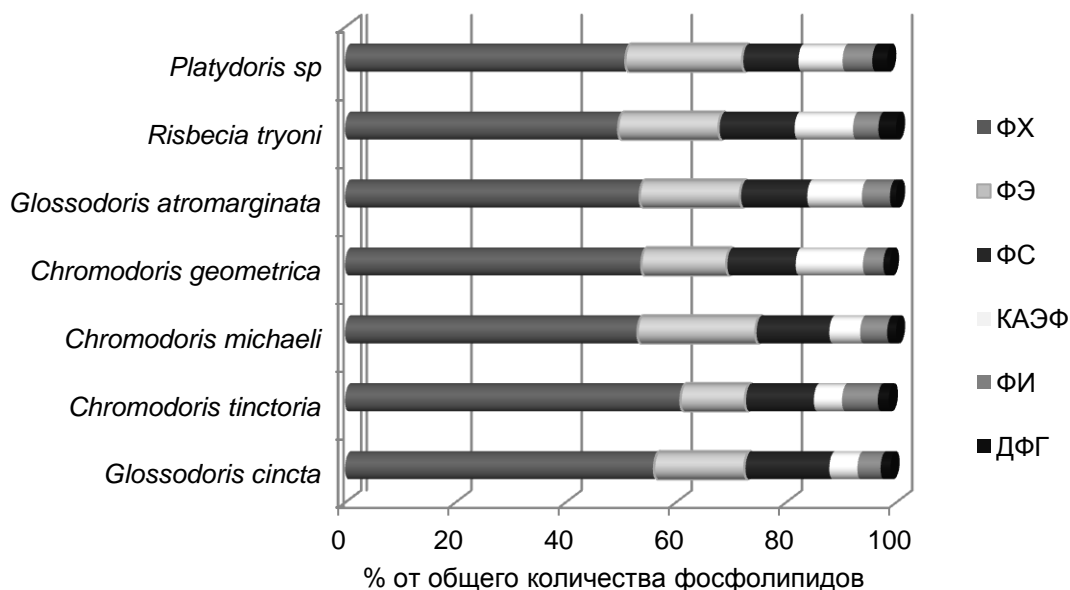


Рис. 2. Состав фосфолипидов голожаберных моллюсков (% от суммы). Результаты выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 4$). ФХ, фосфатидилхолин; ФЭ, фосфатидилэтаноламин; ФС, фосфатидилсерин; КАЭФ, керамидаминоэтилфосфонат; ФИ, фосфатидилинозитол; ДФГ, дифосфатидилглицерин.

Морские беспозвоночные известны как богатый источник 1-алкенил-2-ацилглицерофосфолипидов, обычно называемых плазмалогенами (Sargent, 1987). Плазмалогены представляют собой особые фосфолипиды, характеризующиеся наличием винилэфирной связи в положении С1 глицеринового скелета. Плазмалогены также повсеместно обнаружены в клетках животных. У млекопитающих мозг, сердце, лимфоциты, селезенка, макрофаги и полиморфноядерные лейкоциты содержат наибольшее количество плазмалогена-ФЭ (Magnusson, Haraldsson, 2011). Два фосфолипида, ФЭ и ФС представлены в виде диацил- и алкенильных форм, причем плазмалогенами представлены более половины от содержания этих аминокислотных фосфолипидов (Таблица 2). Так 1-алкенил-2-ацил-ФЭ составляет 50,3–

65,1% от общего количества ФЭ; и 1-алкенил-2-ацил-ФС достигает 47,1–61,3% от общего ФС. Самый высокий процент ФЭ плазмалогенов обнаружен у *Risbecia tryoni*, составляя 65,1% от общего количества ФЭ, а у *Platydoris* sp. вклад ФС плазмалогенов достигает 61,3% от общего ФС. В отличие от многих морских и пресноводных моллюсков, голожаберные содержат ФХ только в форме диацила. Ранее плазмалогены были обнаружены в ФЭ, ФС и ФХ у обычных съедобных видов моллюсков, причем фракция ФЭ очень часто состоит преимущественно из плазмалогенов (Kraffe et al., 2004).

Таблица 2

Содержание плазмалогенов (1-алкенил-2-ацилглицерофосфолипидов) у голожаберных моллюсков. Выражено как содержание плазмалогенной формы относительно содержания целого класса фосфолипида, среднее значение \pm SD (n = 4).

Вид	1-алкенил-2-ацил-ФЭ	1-алкенил-2-ацил-ФС
<i>Chromodoris tinctoria</i>	60,4 \pm 1,6	47,1 \pm 2,1
<i>Chromodoris michaeli</i>	52,9 \pm 2,4	51,1 \pm 2,4
<i>Chromodoris geometrica</i>	58,8 \pm 2,1	50,6 \pm 1,7
<i>Chromodoris</i> sp.	59,2 \pm 1,8	48,7 \pm 1,1
<i>Glossodoris cincta</i>	61,1 \pm 1,1	47,8 \pm 1,5
<i>Glossodoris atromarginata</i>	60,7 \pm 2,1	48,6 \pm 1,2
<i>Risbecia tryoni</i>	65,1 \pm 1,6	56,5 \pm 1,0
<i>Platydoris</i> sp.	50,3 \pm 1,8	61,3 \pm 1,5

Являясь структурным компонентом клеточной мембраны млекопитающих и беспозвоночных, плазмалогены широко распространены в легковозбудимых тканях, таких как сердце и мозг. Плазмалогены служат посредником в динамике клеточной мембраны, обеспечивают накопление полиненасыщенных жирных кислот и могут способствовать эндогенной антиоксидантной активности, тем самым защищая клетки от окислительного стресса (Brosche et al., 2007). Предполагается, что плазмалогены участвуют в передаче сигнала (Latorre et al., 2003). Они являются не только компонентами плазматической мембраны и сурфактанта легкого, но и служат резервуаром для вторичных мессенджеров и могут также участвовать в слиянии мембран, транспорте ионов и оттоке холестерина. Эти ме-

таболиты в низкой концентрации оказывают трофическое действие, но при высокой концентрации они цитотоксичны и могут быть связаны с аллергическим ответом, воспалением или травмой. Снижение уровня плазмалогенов связано с несколькими неврологическими расстройствами, включая болезнь Альцгеймера, ишемию и травму спинного мозга (Hartmann et al., 2007).

Разнообразие жирных кислот

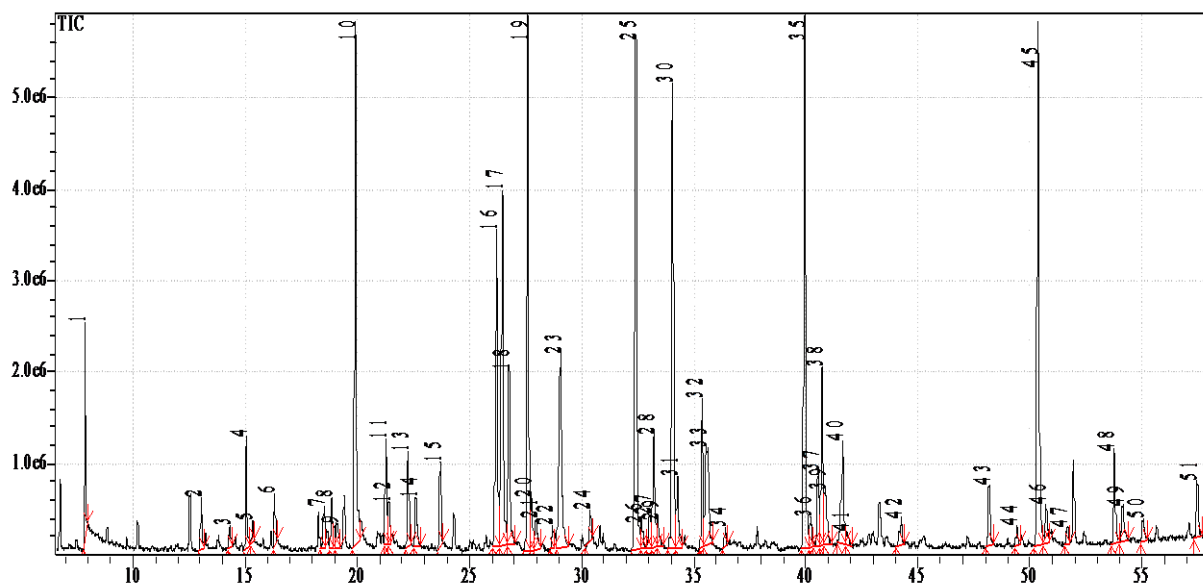


Рис. 3. ГЖХ-МС хроматограмма производных 4,4-диметилноксазолина жирных кислот *Chromodoris michaeli*.

Профили жирных кислот изученных видов довольно сходны и отличаются только количественными соотношениями. На рис. 3 показана хроматограмма ГЖХ-МС производных 4,4-диметилноксазолина (ДМОКС) жирных кислот *Chromodoris michaeli*. Обнаружено и идентифицировано около 50 жирных кислот. В таблице 3 представлены качественные и количественные данные, полученные, соответственно, из анализов ГЖХ-МС и ГЖХ с пламенно-ионизационным детектором. Голожаберные отличаются широким спектром жирных кислот, включая обычные насыщенные жирные кислоты (НЖК) (8,6–16,5% от общего количества жирных кислот), мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК) (22,7–31,2%) и полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) (15,1–31,4%), а также неметилен-разделенные диеновые жирные кислоты (НМР ЖК) (8,0–21,5%), сверхдлинноцепочечные жирные кислоты (СДЦ ЖК) (7,7–16,6%) и нечетные и разветвленные жирные кислоты (НР ЖК) (5,0–17,4%) (рис. 4).

Морские моллюски обычно характеризуются преобладанием незаменимых n-3 ПНЖК, в основном 20:5n-3 и 22:6n-3, которые обычно составляют почти половину от общих жирных кислот (Zhukova, Svetashev, 1986). Напротив, у голожаберные не имеют этого свойства; эти две морские ПНЖК являются второстепенными компонентами и составляют в сумме 1,4–7,3% от общего количества жирных кислот (рис. 5). Между тем, морские слизи показывают некоторые уникальные особенности в своем составе. Профили их жирных кислот резко отличаются от других моллюсков. Различия кажутся более очевидными по сравнению с жирными кислотами брюхоногого моллюска морского блюдечка *Niveotectura pallida* (Gould, 1859) (Zhukova, Svetashev, 1986) (рис. 5).

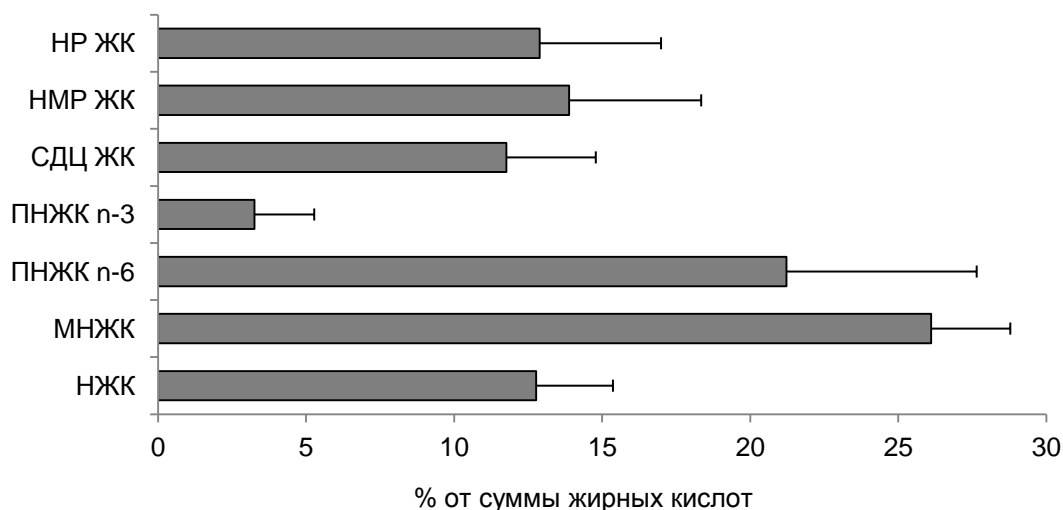


Рис. 4. Распределение жирных кислот у голожаберных моллюсков. Результаты выражены в виде среднего значения \pm SD, (n=8). НР ЖК, нечетные и разветвленные (бактериальные) жирные кислоты; НМР, неметилен-разделенные жирные кислоты; СДЦ ЖК, сверх-длинноцепочечные жирные кислоты (демоспонгиевые); n-3 и n-6 ПНЖК, полиненасыщенные жирные кислоты; МНЖК, мононенасыщенные жирные кислоты; НЖК, насыщенные жирные кислоты.

**Идентификация производных 4,4-диметилноксазолина
и состав жирных кислот (мас.%) *Chromodoris michaeli*.**

Результаты даны как среднее значение \pm SD (n = 4)

Жирные кислоты	Молекулярный ион (m/z)	% от суммы	Жирные кислоты	Молекулярный ион (m/z)	% от суммы
12:0	253	0,4 \pm 0,1	20:5n-3	355	0,2 \pm 0,1
14:0	281	0,9 \pm 0,3	20:2 Δ 5,11	355	1,8 \pm 0,5
iso-15:0	295	1,9 \pm 0,5	20:2 Δ 5,13	355	1,3 \pm 0,4
anteiso-15:0	295	0,3 \pm 0,1	20:3n-6	359	0,7 \pm 0,3
15:0	295	1,1 \pm 0,2	20:1n-11	363	5,6 \pm 0,7
iso-16:0	309	0,5 \pm 0,1	20:1n-9	363	0,2 \pm 0,1
anteiso-16:0	309	0,7 \pm 0,1	20:1n-7	363	2,5 \pm 0,6
16:1n-7	307	1,7 \pm 0,6	21:2 Δ 7,13	375	0,1 \pm 0,1
16:0	309	5,9 \pm 0,8	iso-21:1	377	0,4 \pm 0,1
iso-17:0	323	1,4 \pm 0,3	21:1n-7	377	2,0 \pm 0,1
anteiso-17:0	323	0,9 \pm 0,1	21:1n-5	377	1,3 \pm 0,5
17:1n-8	321	1,4 \pm 0,4	22:5n-6	383	0,4 \pm 0,1
17:1n-6	321	0,4 \pm 0,1	22:6n-3	381	0,7 \pm 0,2
17:0	323	1,4 \pm 0,1	22:4n-6	385	10,2 \pm 1,3
18:3n-6	331	0,2 \pm 0,1	22:5n-3	383	0,2 \pm 0,1
iso-18:0	337	0,4 \pm 0,2	22:3n-6	387	0,2 \pm 0,1
anteiso-18:0	337	0,4 \pm 0,2	22:2 Δ 7,13	389	3,6 \pm 0,7
18:2n-6	333	7,0 \pm 0,9	22:2 Δ 7,15	289	1,2 \pm 0,3
18:1n-9	335	5,4 \pm 0,4	22:1n-9	391	0,4 \pm 0,2
18:1n-7	335	3,4 \pm 1,0	22:1n-7	391	0,1 \pm 0,1
18:0	337	7,4 \pm 1,3	iso-24:2 Δ 5,9	417	0,2 \pm 0,1
iso-19:1	349	0,1 \pm 0,1	24:2 Δ 5,9	417	3,1 \pm 0,5
anteiso-19:1	349	0,2 \pm 0,1	iso-25:2 Δ 5,9	431	4,0 \pm 1,0
iso-19:0	351	0,2 \pm 0,1	anteiso-25:2 Δ 5,9	431	0,6 \pm 0,2
anteiso-19:0	351	0,2 \pm 0,1	25:2 Δ 5,9	431	0,1 \pm 0,1
19:1n-8	349	0,1 \pm 0,1	iso-26:2 Δ 5,9	445	0,8 \pm 0,3
19:1n-12	349	2,6 \pm 0,8	anteiso-26:2 Δ 5,9	445	0,1 \pm 0,1
19:0	351	0,3 \pm 0,1	26:2 Δ 5,9	445	0,8 \pm 0,3
20:4n-6	357	10,5 \pm 1,2	anteiso-27:2 Δ 5,9	459	0,2 \pm 0,1

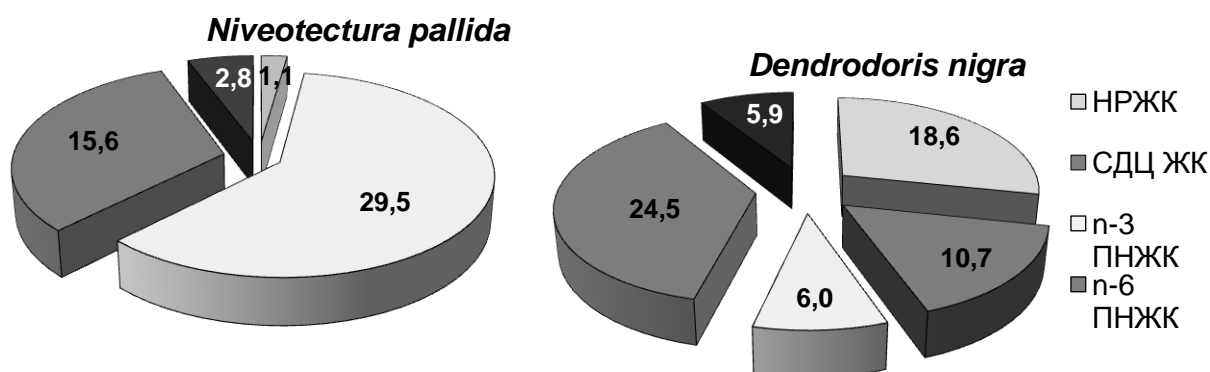


Рис. 5. Сравнение состава жирных кислот голожаберного моллюска *Dendrodoris nigra* и морского блюдечка *Niveotectura pallida*. НРЖК, нечетные и разветвленные (бактериальные) жирные кислоты; СДЦ ЖК, сверх-длинноцепочечные жирные кислоты (демоспонгиевые); n-3 и n-6 ПНЖК, полиненасыщенные жирные кислоты; НМР, неметилен-разделенные жирные кислоты.

У многих голожаберных обнаружено значительное количество (6.1 – 17.1% от суммы кислот) разнообразных сверх-длинноцепочечных жирных кислот (СДЦ ЖК), специфичных для губок, также называемых демоспонгиевыми кислотами (рис. 6). Эти голожаберные – плотоядные и специализируются на питании губками. Употребление этой пищи, вероятно, ответственно за высокий уровень демоспонгиевых кислот в моллюсках. Анализ показал, что концентрация СДЦ ЖК выше во внутренних органах, чем в покровных тканях (нотуме) (рис. 7), что может служить дополнительным доказательством трофического происхождения СДЦ ЖК в моллюсках (Zhukova, 2014).

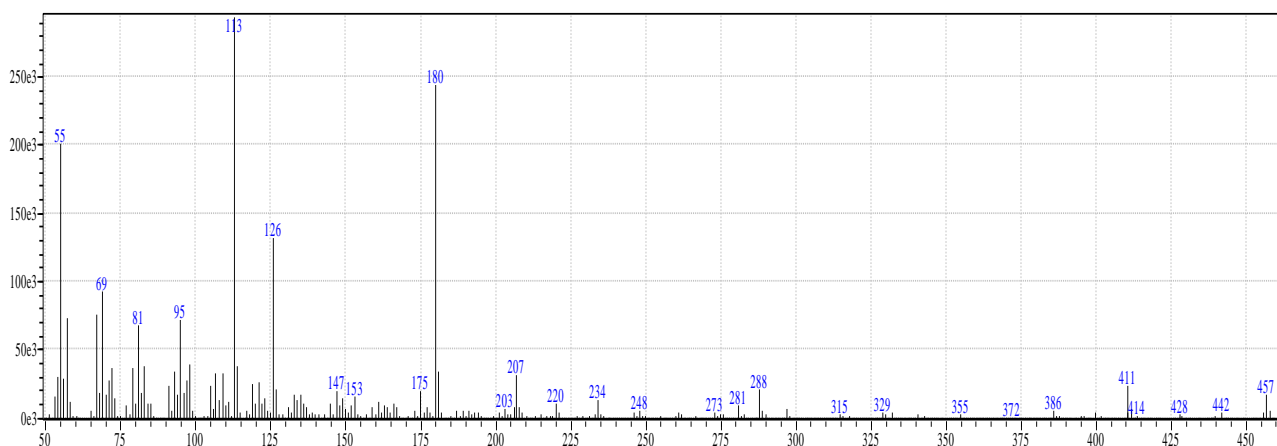


Рис. 6. Масс-спектр диметилноксазолинового производного кислоты демоспонгиевой кислоты 27:2Δ5,9,19 из липидов *Rostanga alisae*, молекулярный ион m/z 457.

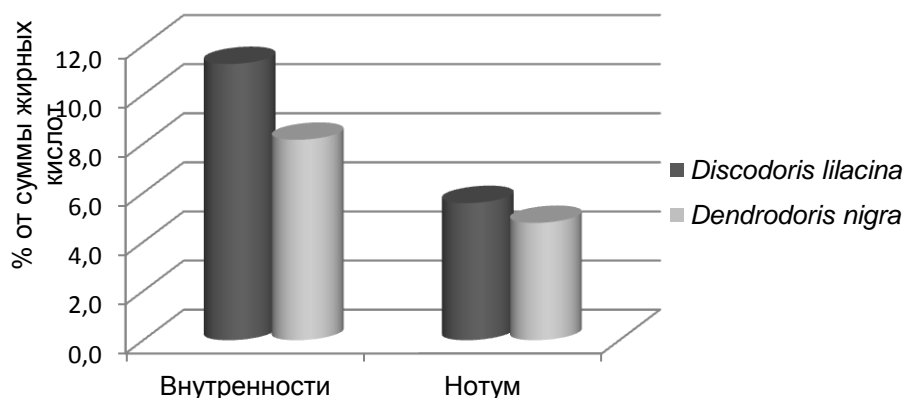


Рис. 7. Распределение сверх-длинноцепочечных жирных кислот (демоспонгиевых) в тканях *Dendrodoris nigra* и *Discodoris lilacina*.

Предполагается, что многие морские слизни питаются определенными видами губок, которые, как известно, различаются по своему составу жирных кислот (Bergquist et al., 1984). Действительно, серия СДЦ ЖК с двойными связями в $\Delta 5,9$ положениях в цепи идентифицирована в тропических голожаберных (таблица 4). Концентрации этих компонентов различается у разных видов. Среди СДЦ ЖК *Platydoris* sp. идентифицирована только гексакозацидиеновая кислота $26:2\Delta 5,9$, тогда как у *Chromodoris michaeli* тетракозацидиеновая $24:2\Delta 5,9$ и разветвленная изо- $25:2\Delta 5,9$ являются доминирующими с некоторыми другими СДЦ ЖК в незначительных количествах. Кроме того, разветвленные гексакозатриеновые кислоты, изо- $26:\Delta 5,9,19$ и антеизо- $26:3\Delta 5,9,19$ обнаружены только в *Glossodoris cincita*, а изо- $27:2\Delta 5,9$ только в *C. michaeli*. Специфическое распределение СДЦ ЖК указывает, что эти голожаберные питаются различными видами губок.

Таким образом, продемонстрировано, что губки не являются единственным источником этих $\Delta 5,9$ диеновых кислот, так как они были обнаружены и в других морских организмах, таких как моллюски голожаберные. Известно, что СДЦ ЖК с группировкой $\Delta 5,9$ двойных связей имеют разнообразную биологическую активность, проявляя значительную антипротозойную активность (Carballeira, 2008). Эти демоспонгированные кислоты могут быть источником очень сильных противомаларийных препаратов. Кроме этого, жирные кислоты с $\Delta 5,9$ группировкой известны как сильный ингибитор фермента топоизомеразы I, играющего важную роль в процессах роста и деления клетки, внося одноцепочечные разрывы в ДНК. Это свойство может привести к разработке эффективных противораковых препаратов. Кроме этого, показано, что 14-метил-5,9-пентадекадиеновая кислота из фосфолипидов горгониевого коралла *Eunicea succinea* (Pallas,

1766) была активна против грамположительных бактерий, таких как *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884 и *Streptococcus faecalis* (Andrewes and Horder, 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984 (Carballeira et al., 1997). Обнаружено, что природное соединение 30:3 Δ 5,9,23, выделенное из губки *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862, является ингибитором эластазы, который, как известно, является потенциальным терапевтическим агентом при различных заболеваниях, таких как эмфизема легких, хронический бронхит и некоторые воспалительные заболевания. Кроме того, жирные кислоты С23–С26 Δ 5,9 практически не имеют цитотоксичности для клеток L6 млекопитающих. Следовательно, они могут быть полезны против паразитов без ущерба для хозяина (Tasdemir et al., 2007). Смеси разветвленных 22-метил-5,9-24:2 и 23-метил-5,9-24:2 показали цитотоксическую активность против клеток карциномы Эрлиха мыши и гемолитическое действие на эритроциты мыши (Makarieva et al., 2002).

Таблица 4

Распределение сверх-длинноцепочечных жирных кислот в голожаберных (% от суммы жирных кислот).

Результаты выражены как среднее значение \pm SD, (n = 4).

**1 – *Chromodoris* sp., 2 – *C. geometrica*, 3 – *C. tinctoria*, 4 – *C. michaeli*,
5 – *Glossodoris atromarginata*, 6 – *G. cincita*,
7 – *Risbecia tryoni*, 8 – *Platydorid* sp.**

СДЦ ЖК	1	2	3	4	5	6	7	8
i-24:2 Δ 5,9	–	–	–	0,2	0,2	–	–	–
24:2 Δ 5,9	1,0	4,7	0,4	3,1	1,1	1,2	1,4	–
24:1	–	0,3	0,1	–	–	–	–	–
i-25:2 Δ 5,9	–	–	–	4,0	–	–	–	–
25:2 Δ 5,9	4,0	1,6	0,7	0,2	2,3	2,6	0,5	–
25:3 Δ 5,9	0,5	0,1	–	–	–	1,3	–	–
26:0	–	0,1	–	–	–	0,3	–	–
i-26:2 Δ 5,9	0,8	0,1	0,8	0,8	–	0,7	–	–
26:2 Δ 5,9	6,0	3,0	13,6	0,8	6,3	8,4	5,8	10,5
i-26:3 Δ 5,9,19	–	0,2	–	–	1,2	2,3	–	–
ai-26:3 Δ 5,9,19	–	–	–	–	–	1,1	–	–
ai-27:2 Δ 5,9	–	–	–	0,2	–	–	–	–

Как упоминалось выше, морские моллюски, вероятно, являются уникальным источником необычных ненасыщенных жирных кислот, немети-

лен-разделенных диеновых жирных кислот (НМР ЖК), в которых двойные связи разделены более чем на одну метиленовую группу, в отличие от обычных ПНЖК. Эти повсеместные, а у некоторых видов моллюсков основные компоненты липидов (Zhukova, Svetashev, 1986) до настоящего времени широко изучаются (Barnathan, 2009). НМР ЖК были обнаружены у всех изученных видов (рис. 3, 4), среди них обычные 20:2 Δ 5,11; 20:2 Δ 5,13, и 22:2 Δ 7,13; 22:2 Δ 7,15, а также новый изомер 21:2 Δ 7, 13 идентифицированный ранее у другого вида голожаберного моллюска *Phyllidia coelestis* (Zhukova, 2007) и у морского блюдечка *Lottia dorsuosa* (Goud, 1952) (Kawashima, 2005). Наиболее заметные количества нечетного изомера 21:2 Δ 7, 13 найдены у *Phyllidia coelestis* (до 3,9%) и у *Phyllidia ocellata* (2,2%). Наибольшая концентрация НМР ЖК обнаружена у *Risbecia tryoni* (21,5%). Моллюски способны синтезировать С20 и С22 НМР ЖК с помощью Δ 5-десатуразы, действующей на соответствующий предшественник, такой как 18:1n-7 и 18:1n-9, с последующим удлинением цепи элонгазой. Потенциальными предшественниками 21:2 Δ 7,13 являются 17:1n-8 и 19:1n-8, которые имеют бактериальное происхождение и в изобилии встречаются в голожаберных (таблица 3). Показано, что моллюски экспрессируют Fad-подобный ген, который кодирует участвующий в биосинтезе НМР ЖК фермент с активностью Δ 5-десатурации (Monroig et al., 2012). Хотя биологическая роль этих жирных кислот и их функция полностью не изучены, было высказано предположение, что НМР ЖК играют структурные и защитные роли в клеточных мембранах, поскольку они этерифицируют фосфолипиды и встречаются в количествах, которые находятся в обратной зависимости от содержания 20:5n-5 и 22:6n-3 (Zhukova, Svetashev, 1986). Считается, что необычные положения двойной связи в НМР ЖК придают клеточным мембранам более высокую устойчивость к окислительным процессам и микробным липазам, чем обычные ПНЖК (Barnathan, 2009).

Введение транс- Δ 5 двойной связи в молекулу линолевой кислоты 18:2n-6 дает колумбиновую кислоту 18:3 Δ 5транс, 9цис, 12цис, с замечательными биологическими свойствами (Houtsmuller, 1981). В экспериментах с крысами, имеющими дефицит незаменимых жирных кислот, было показано, что колумбиновая кислота эффективна в поддержании надлежащего эпидермального слоя, а также улучшает фертильность крыс, и происходящее ингибирование синтеза простагландинов производит бла-

гоприятный эффект, так как уменьшается воспаление и склонность к тромбообразованию (Houtsmuller, 1981).

Еще одна уникальная особенность голожаберных связана с абберантным уровнем жирных кислот с нечетной и разветвленной цепью (НР ЖК), которые специфичны для бактерий и обычно называются «бактериальными жирными кислотами» (рис. 4, 5). Они нормальны в качестве минорных метаболитов у большинства животных, но большое количество бактериальных кислот, обнаруженных в голожаберных моллюсках, было экстраординарным. Сумма НР ЖК, преимущественно 15:0, 17:0, 17:1n-8 и изо- и антеизо-C15, C16, C17, C18 и C19 кислот, составляет 15,8% в *Chromodoris geometrica* и 17,4% в *Glossodoris atromarginata*, в *Platydoris* sp. их концентрация самая низкая (5,0%). Тогда как все три исследованных вида *Phyllidia*, *P. ocellata*, *P. coelestis*, *P. varicose*, а также *Phyllidiella pustulosa* продемонстрировали самые высокие концентрации бактериальных кислот, уровень которых превышал 30% от суммы всех жирных кислот. Нами было выдвинуто предположение, что высокий уровень бактериальных жирных кислот в голожаберных моллюсках может служить индикатором того, что симбиотические бактерии обеспечивают хозяина питательными веществами (Zhukova, 2007, 2014).

Симбиоз голожаберных моллюсков с бактериями

Известно, что бактерии продуцируют различные специфические жирные кислоты «бактериального типа», и анализ жирных кислот может быть хорошим индикатором конкретных микроорганизмов, поскольку разные группы бактерий имеют разные составы жирных кислот (Perry et al., 1979; Gillan, Johns, 1986). Жирные кислоты были использованы для характеристики симбиотических ассоциаций между бактериями и некоторыми морскими беспозвоночными, такими как двустворчатые моллюски около гидротермальных выходов (Conway, Cappuso, 1990; Zhukova et al., 1992), глубоководные двустворчатые моллюски (Allen et al. 2001), амфиподы (Pond et al., 1997), вестиментиферы (Pond et al. 2002) и брюхоногие моллюски (Saito, Hashimoto, 2010). Эти исследования были очень полезны для изучения биологии и экологии симбиотических ассоциаций. Анализ жирнокислотного состава морских беспозвоночных может служить ценным инструментом для скрининга и выявления симбионтов у исследуемых видов беспозвоночных. Появление значительного количества специфических

бактериальных жирных кислот в липидах морских беспозвоночных указывает на бактериальный симбиоз (Conway, Cappuzzo, 1991; Zhukova et al., 1992; Goffredi et al., 2005).

Симбиотические ассоциации между микробами и морскими беспозвоночными широко распространены в природе; они расширяют биологическое и экологическое разнообразие и усиливают эволюционный потенциал различных таксонов (Dubilier et al. 2008; Chaston, Goodrich-Blair, 2010). Многие морские моллюски, типичные представители Gastropoda, Bivalvia и Cephalopoda, несут симбиотические микробы. К моменту наших исследований (Zhukova, Eliseikina, 2012) было неизвестно существование симбиоза у голожаберных моллюсков с микроорганизмами. Существует только одно сообщение о симбиотических бактериях в вестибулярной железе, связанных с женской репродуктивной системой, и в яичных массах *Dendrodoris nigra* (Klussmann-Kolb, Brodie, 1999). Вопрос о наличии внутриклеточных симбиотических бактерий в тканях голожаберных моллюсков оставался открытым.

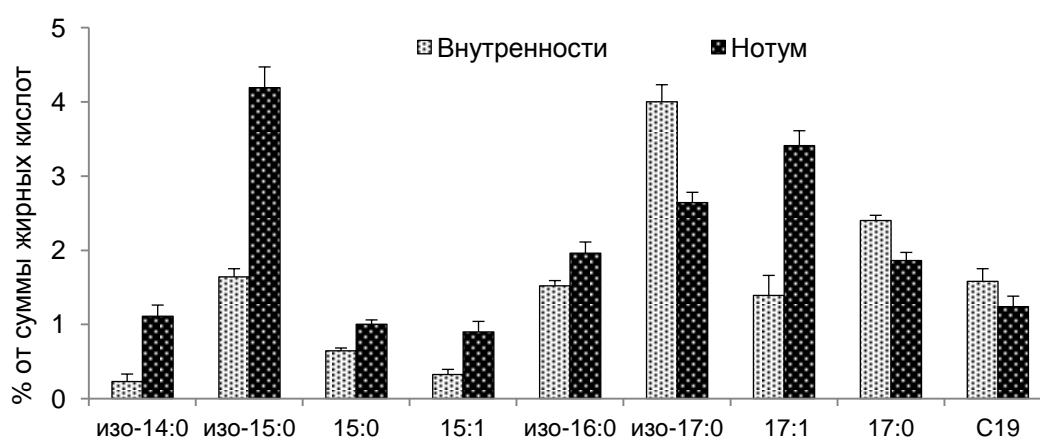


Рис. 8. Распределение нечетных и разветвленных жирных кислот (изо- и антеизо-), характерных для бактерий, в тканях голожаберного моллюска *Dendrodoris nigra* (% от суммы жирных кислот). Среднее \pm SD (n = 5). Разница в содержании этих жирных кислот между нотумом и внутренностями значительна (P < 0,05).

Уникальная особенность жирнокислотного состава *D. nigra* связана с высоким содержанием нечетных (C13, C15, C17 и C19) и разветвленных (изо- и антеизо-) жирных кислот, специфичных для бактерий, и обычно называют бактериальными жирными кислотами (рис. 7, 8) (Zhukova, Eliseikina, 2012). Наличие большого количества НРЖК в тканях *D. nigra*

было особенно исключительным. Жирные кислоты с разветвленной цепью, в частности изо- и антеизо- формы кислот и с нечетной длиной цепи 15:0 и 17:0, обычно считаются уникальными компонентами бактерий (Kaneda, 1991). Эти жирные кислоты часто обнаруживаются в областях с высокой бактериальной активностью (Canuel, Martens, 1993) и используются в качестве специфических маркеров бактерий в отложениях (Perry et al., 1979). Они нормальны в качестве минорных компонентов у большинства морских беспозвоночных. Повышенные концентрации этих соединений были обнаружены у животных, питающихся донными отложениями (Vachok et al., 2003).

Сравнение жирнокислотного состава *D. nigra* и его пищи морской губки *Halichondria* sp. позволило выяснить диетическое поступление НРЖК в тканях голожаберного. Высокая биологическая специфичность жирных кислот наряду с их структурным разнообразием позволяет использовать эти вещества в качестве биохимических маркеров для определения трофических связей между животными (Dalsgaard et al., 2003). Различные нечетные и разветвленные жирные кислоты описаны во многих видах губок (Rezanka, Sigler, 2009), включая виды *Halichondria*, которые считаются пищевым объектом для *D. nigra* (McDonald, Nybakken, 1999). Однако экземпляры *Halichondria* sp., собранные из одной среды обитания с *D. nigra*, не имели обилия НРЖК, количество которых было значительно ниже в губке, чем в нотуме (покровных тканях) и внутренних органах голожаберного. Таким образом, во-первых, вклад НРЖК в липиды *D. nigra* был настолько велик, что кажется маловероятным, чтобы бактерии из губок были их единственным источником в этих голожаберниках. Более того, концентрация общих бактериальных жирных кислот в нотуме значительно превышала их концентрацию во внутренних органах (рис. 8). Это не согласуется с предположением, что НРЖК могут происходить из бактерий, связанных с губками. НРЖК в отличие от ПНЖК не являются необходимыми для роста и размножения животных, поэтому кажется невозможным, чтобы НРЖК из пищи накапливались специально в тканях моллюсков.

Во-вторых, различия в наборе НРЖК нотума и внутренних органов *D. nigra* очевидны (рис. 7, 8). Сравнение состава жирных кислот нотума и внутренних органов показало различные бактериальные сигналы в тканях. Концентрации изо-14:0, изо-15:0, антеизо-15:0, изо-16:0, 15:0, 15:1 и 17:1 кислот в нотуме были повышены, тогда как во внутренних органах кислоты доминирующими были изо-17:0, антеизо-17:0 и 17:0. Принимая во

внимание специфику состава жирных кислот различных видов бактерий, мы предположили, что бактериальная микрофлора отличная от микрофлоры губки снабжает голожаберного НРЖК. Также, основываясь на заметных различиях в составе жирных кислот между полихетой *Osedax* sp., населяющей кости кита и имеющей симбиотические бактерии, и микрофлорой, ассоциированной с костями кита, Гоффреди с коллегами (Goffredi et al., 2005) предположили, что червь получает бактериальные жирные кислоты от симбионтов, а не от свободноживущих микробов.

Таким образом, кажется маловероятным, что НРЖК, обнаруженные в *D. nigra*, происходят исключительно из их пищи – губок. Происхождение этих соединений из симбиотических бактерий кажется более правдоподобным. Ранее именно появление значительного количества специфической бактериальной жирной кислоты (цис-вакценовой 18:1n-7) позволило нам выявить двустворчатого моллюска *Axinopsida orbiculata* с симбиотическими хемоавтотрофными бактериями среди беспозвоночных из мелководного гидротермального сообщества бухты Кратерной (Kharlamenko et al., 1995). Аналогичным образом было показано, что появление заметных количеств 16:1n-7 и 18:1n-7 у некоторых видов офиур по сравнению с офиурами, не содержащими симбионтов, является результатом вклада подкожных гетеротрофных бактерий в животных-хозяев (McKenzie et al., 2000). Основываясь на этих фактах, было выдвинуто предположение, что обилие специфических НРЖК, может служить индикатором присутствия гетеротрофных бактерий в тканях голожаберных моллюсков.

Действительно, трансмиссионная электронная микроскопия нотума и мантии *Dendrodoris nigra* (рис. 9, 10) показала присутствие палочковидных бактерий в цитоплазме эпителиальных клеток и в слое гликокаликса, покрывающем эпителий нотума и мантию моллюска. Обнаруженные бактерии определены как грамотрицательные на основе структурных особенностей их клеточной стенки, у которой были двойные мембраны, разделенные тонким периплазматическим слоем. Эти симбиотические бактерии обладали фимбриями, которые, как известно, обеспечивают адгезию бактерий к апикальной мембране эпителиоцитов (Clegg, Gerlach, 1987), способствуя колонизации эпителиальных клеток хозяина голожаберного симбиотическими бактериями. Согласно нашим результатам ультраструктурных исследований, бактерии проникают в цитоплазму эпителиальных клеток, используя механизм фагоцитоза, сопровождающегося инвагинацией

наружной клеточной мембраны эпителиоцитов и образованием вакуоли с закрытой бактерией внутри. Данные показали, что выявленные бактерии являются факультативными, а не облигатными симбионтами. Бактериальная субпопуляция, локализованная в цитоплазме, приобретает за счет привлечения внеклеточных бактерий из морской воды. Горизонтальное поступление эндосимбионта из окружающей среды к хозяину посредством фагоцитозо-подобного механизма с участием специальных «ямоподобных» структур на апикальной клеточной мембране описано для двусторчатого моллюска *Bathymodiolus azoricus* Cosel & Comtet, 1999 из гидротермальных выходов (Kadar et al., 2005) и вестиментиферы *Riftia* (Siboglinidae, Polychaeta) с облигатным эндосимбиозом (Nussbaumer et al., 2006). Получение симбиотических бактерий кальмарами-хозяевами и рыбами из окружающей среды горизонтальным переносом является обычным атрибутом биолюминесцентных симбиозов (Dunlap et al., 2009).

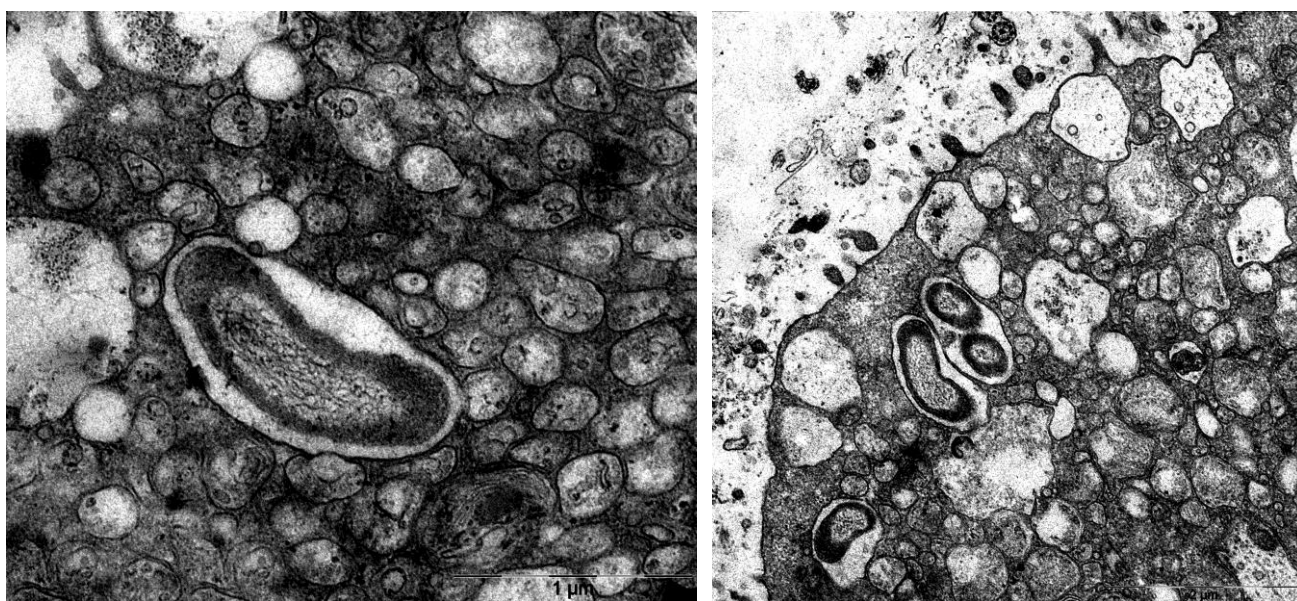


Рис. 9. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) симбиотических бактерий в эпителиальных клетках нотума и мантии *Dendrodoris nigra*. Масштаб 1 мкм. Фото предоставлено М.Г. Елисейкиной.

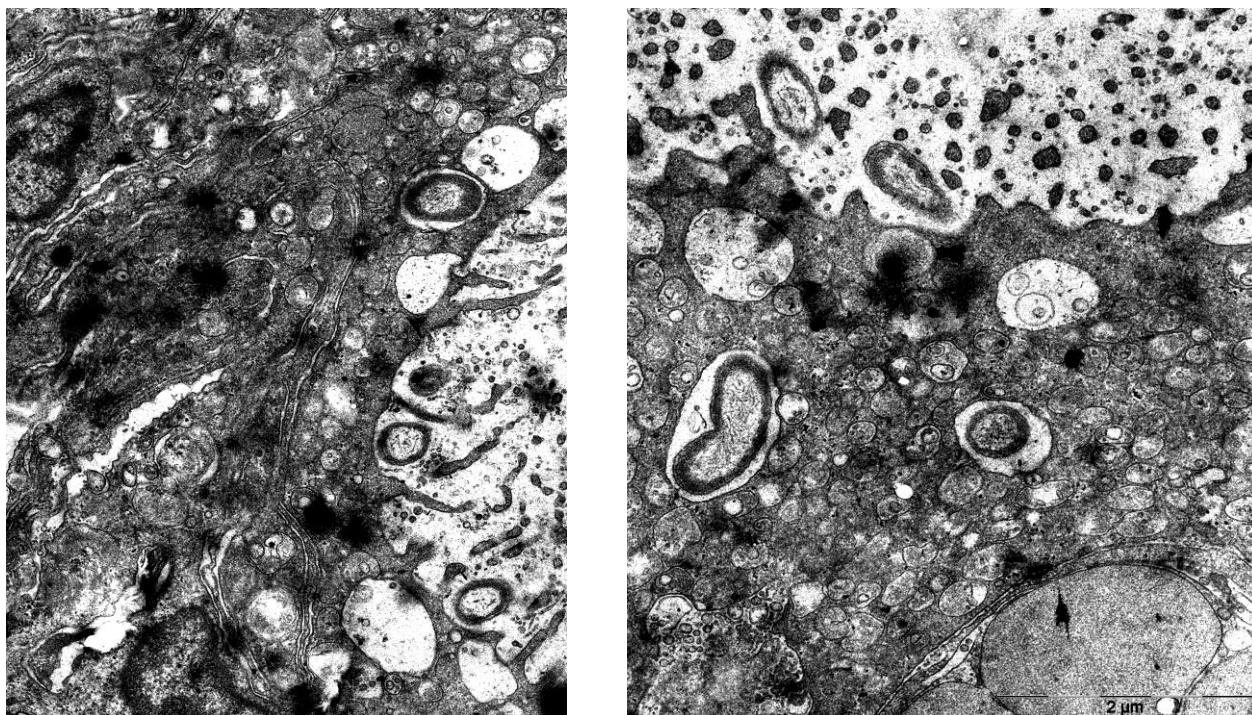


Рис. 10. ТЭМ микрофотографии симбиотических бактерий в слое гликокаликса эпителия *Dendrodoris nigra* нотума и стадии инокуляции бактерий в эпителиальные клетки. Масштаб 2 мкм. Фото предоставлены М.Г. Елисейкиной.

Мы предполагаем, что выявленные симбиотические бактерии в головожаберном моллюске, подобно различным бактериальным патогенам и эндосимбиотическим бактериям используют преимущества аутофагии, что позволяет успешно заселять клетки хозяина бактериями (Camrou, Colombo, 2009). Личинки сибоглинид (*Vestimentifera*, *Siboglinidae*) из гидротермальных выходов не содержат симбионтов, а бактериальные симбионты колонизируют осевших личинок, проникая в организм хозяина через кожу. Каждое поколение сибоглинид должно быть вновь колонизировано своим специфическим симбионтом (Nussbaumer et al., 2006). Таким образом, процесс передачи симбионтов обеспечивается механизмами, общими как для патогенных инфекций, так и для полезных симбионтов. Хотя детали передачи и отбора симбионтов различаются между ассоциациями, как между микроорганизмами, так и животными, сравнение различных мутуалистических ассоциаций выявляет ряд общих черт, включая ограничение разнообразия симбионтов во время передачи и взаимодействия гликан-лектин во время выбора и пополнения партнеров (Chaston, Goodrich-Blair, 2010).

Бактерии в цитоплазме эпителиальных клеток нотума и мантии *Dendrodoris nigra* заключены во вторичную вакуоль. Отдельная мембрана, отделяющая бактерии от цитоплазмы хозяина, может играть роль в регулировании переноса метаболитов между хозяином и симбионтами и/или в защите бактерий от ферментов хозяина, как предполагалось ранее (Piel, 2004). Присутствие делящихся бактерий позволяет предположить, что эпителий нотума и мантийный край моллюска включает в себя обновляющуюся самовоспроизводящуюся популяцию симбиотических бактерий. Очевидно, что жизненный цикл симбиотических бактерий включает ряд последовательных стадий, происходящих как внутри эпителиальных клеток – в апикальной части, так и вне этих клеток – в гликокаликсе, покрывающем поверхность эпителия. Бактерии в гликокаликсе иногда подвергаются разрушающему лизису, а их компоненты используются основными эпителиальными клетками хозяина в ходе внутриклеточного пищеварения. Высокая концентрация типичных бактериальных жирных кислот в липидах голожаберного моллюска хорошо согласуется с результатами ТЭМ и подтверждает, что разрушенные бактериальные клетки используются тканями моллюска-хозяина.

Симбиоз голожаберного моллюска заметно отличается от других морских симбиозов, основанных на аутотрофии. Большинство симбиотических бактерий относятся к хемоавтотрофным бактериям. Фундаментальная особенность многих симбиотических микроорганизмов заключается в том, что они обеспечивают хозяина питательными веществами (Dubilier et al., 2008; Chaston, Goodrich-Blair, 2010). Другие симбиотические функции для морских микробов включают питание через непосредственное включение растворенных органических веществ в морскую воду (Wilkinson et al., 1984), производство вторичных метаболитов (Schmidt, Donia, 2010) и детоксикация токсичных соединений (Stewart, Cavanaugh, 2006). Предполагается, что симбионты могут участвовать в синтезе соединений, участвующих в переваривании целлюлозы в древесных двустворчатых моллюсках (Xu, Distel, 2004). Также было показано, что бактерии, связанные с личинками культивируемых двустворчатых моллюсков, продуцируют антибиотики (Fdhila et al., 2003). Кальмары поддерживают популяцию симбиотических бактерий рода *Vibrio* и используют биолюминесценцию в качестве защиты от хищников. (Jones, Nishiguchi, 2004). Ранее симбиотические бактерии были обнаружены в слизи, окружающей яй-

цевые капсулы и между микроворсинками вестибулярной железы *D. nigra*. Предполагается, что эти бактерии могут играть роль в разрушении слоев слизи во время внутрикапсулярного развития, обеспечивая высвобождение велигера (Klussmann-Kolb, Brodie, 1999).

Появляется все больше доказательств того, что среди морских беспозвоночных симбионты могут играть важную роль в производстве биоактивных химических веществ или их предшественников внутри хозяина (Proksch et al., 2002; Schmidt, Donia, 2010). Животным-хозяевам, а также их эмбрионам и личинкам часто предоставляется защита от грибов, патогенных бактерий и хищников соединениями, продуцируемыми бактериальными симбионтами (Lindquist et al., 2005, Lopanik et al., 2006). Эти симбионты иногда являются истинными продуцентами вторичных метаболитов хозяина, которые выполняют защитные функции для своих хозяев. Разнообразные биологически активные соединения включают токсичные и отпугивающие секреты, выделенные из голожаберных подотряда Doridaceae (Wägele et al., 2006). Было показано, что защитные химические вещества расположены анатомически и сосредоточены в мантии видов Doridacea (Avila, Durfort, 1996). Поскольку наши биохимические и ультраструктурные исследования выявили симбиотические бактерии только в эпителиальных клетках покровных тканей – нотума и мантии, мы подозреваем, что обнаруженные бактерии могут быть вовлечены в защиту от хищников или от воздействия окружающей среды. Пищевая роль выявленных бактерий у голожаберного *D. nigra* также возможна. Высокий уровень бактериальных жирных кислот в моллюске может служить доказательством того, что симбиотические бактерии обеспечивают хозяина питательными веществами.

Более того, ряд бактериальных НРЖК, среди них 17:1n-8 и 19:1n-8, очевидно, служат потенциальными предшественниками для биосинтеза ПНЖК с нечетной цепью, таких как 21:2Δ7,13, идентифицированной нами в голожаберных (Zhukova, 2007), а также 21:4n-7, выделенной из раковинного заднежаберного моллюска *Scaphander lignarius* (Linnaeus, 1767) и обладающей активностью в отношении ряда линий раковых клеток человека, таких как меланома, рак толстой кишки и рак молочной железы (Vasskog et al., 2012).

Появляется все больше доказательств того, что именно микробные симбионты являются истинным источником биологически активных со-

единений, выделенных из некоторых видов химически богатых беспозвоночных, в основном губок, мшанок, изопод и оболочников (Proksch et al., 2002; Schmidt, Donia, 2010). Показано, что симбионты являются продуцентами вторичных метаболитов хозяина, которые выполняют защитные и оборонительные функции для своих хозяев (Lindquist et al., 2005; Haine, 2008). Многие биологически активные соединения, в том числе токсичные и отпугивающие, были выделены из голожаберных (Wägele et al., 2006). Интересно, что эндобактериальные морфотипы были описаны для двенадцати из тринадцати протестированных видов голожаберных (Schuett, Dierke, 2013). Более того, в эпителиальных клетках голожаберного *Rostanga alisae*, богатого НРЖК, обнаружены бактериоциты, содержащие симбионтов, представленных морфологически разнообразными бактериями и цианобактериями (Жукова, Елисейкина, неопубликованные данные). Полученные результаты позволяют предположить, что симбиотические бактерии могут участвовать в защите от хищников и, следовательно, в производстве биологически активных соединений.

Заключение

В настоящее время Mollusca, второй по количеству видов тип животных, является одним из хорошо изученных в отношении липидов. Классы брюхоногих, двустворчатых и головоногих моллюсков включают главные объекты промысла и являются коммерчески важными в мировых масштабах. Однако липиды некоторых групп до сих пор остаются не изученными, в том числе представителей отряда Nudibranchia (голожаберные моллюски). Проведенные детальные исследования липидов, фосфолипидов и жирных кислот ряда представителей этого отряда позволили получить новые данные и заполнить брешь в знаниях по липидной биохимии моллюсков. Получены новые данные о закономерностях распределения и разнообразия липидов и жирных кислот у этих морских животных. Установлены особенности состава липидных компонентов, связанные с их видовым разнообразием. Определены источники происхождения ряда необычных жирных кислот в представителях Nudibranchia. Наши исследования впервые продемонстрировали то, что у голожаберных обнаруживается большое разнообразие липидов, и оно сильно отличается от других морских брюхоногих моллюсков. Липиды голожаберных состоят в основном из фосфолипидов, богатых плазмогенными формами фосфатидилэтанолами-

на и фосфатидилсерина. Голожаберные проявляют удивительные особенности состава жирных кислот. Уникальной особенностью жирных кислот этой группы моллюсков, отличающей их от других представителей, является присутствие в некоторых видах значительных количеств сверхдлинноцепочечных жирных кислот, характерных для губок. В ряде исследованных видов обнаружены высокие пропорции разветвленных и нечетных жирных кислот, типичных для бактерий, что послужило основанием для предположения о вкладе симбиотических бактерий в метаболизм моллюсков. Установлено, что специфичность состава жирных кислот исследованных моллюсков определяется характером потребленной пищи, собственными биосинтетическими способностями и симбиотическим партнерством с микроорганизмами. Моллюски, как и беспозвоночные в целом, представляют собой богатый источник разнообразных липидов. Обнаружено, что голожаберные моллюски являются продуцентами разнообразных биологически активных липидов фармакологического применения. Установлено, что симбиотические бактерии могут играть важную роль в производстве химических веществ с разнообразными свойствами или их предшественников в организме хозяина. Голожаберные моллюски могут быть важным ресурсом широкого спектра биологически активных соединений липидной природы.

Благодарности

Я благодарю М.Г. Елисейкину за выполнение ТЭМ исследований и обсуждение полученных результатов, а также А.В. Чернышева за идентификацию видов голожаберных моллюсков.

Список литературы

Allen C.E., Tyler P.A., Van Dover C.L. Lipid composition of the hydrothermal vent clam *Calymene pacifica* (Mollusca : Bivalvia) as a trophic indicator // J. Mar. Biol. Assoc. UK. 2001. Vol. 81. P. 817–821.

Avila C. Natural products of opisthobranch molluscs: a biological review // Oceanogr. Mar. Biol. 1995. Vol. 33. P. 487–559.

Avila C., Durfort M. Histology of epithelia and mantle glands of selected species of doridacean mollusks with chemical defensive strategies // Veliger. 1996. Vol. 39. P. 148–163.

Bachok Z., Mfilinge P.L., Tsuchiya M. The diet of the mud clam *Geloina coaxans* (Mollusca, Bivalvia) as indicated by fatty acid markers in a subtropical

mangrove forest of Okinawa, Japan // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2003. Vol. 292. P. 187–197

Banskota A.H., Stefanova R., Gallant P., McGinn P. Mono- and digalactosyldiacylglycerols; potent nitric oxide inhibitors from the marine microalga *Nannochloropsis granulate* // *J. Appl. Phycol.* 2012. Vol. 25. P. 1513–1521.

Banskota A.H., Stefanova R., Sperker S., McGinn P.J. New diacylglyceryltrimethyl-homoserines from the marine microalga *Nannochloropsis granulata* and their nitric oxide inhibitory activity // *J. Appl. Phycol.* 2013. Vol. 25. P. 1513–1521.

Barnathan G. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: occurrence, characterization and biological properties // *Biochimie.* 2009. Vol. 91. P. 671–678.

Benkendorff K. Molluscan biological and chemical diversity: Secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs // *Biol. Rev.* 2010. Vol. 85. P. 757–775.

Bergquist P.R., Lawson M.P., Lavis A., Cambie R.C. Fatty acid composition and the classification of the Porifera // *Biochem. Syst. Ecol.* 1984. Vol. 12. P. 63–84.

Brosche T., Brueckmann M., Haase K.K., Sieber C., Bertsch T. Decreased plasmalogen concentration as a surrogate marker of oxidative stress in patients presenting with acute coronary syndromes or supraventricular tachycardias // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007. Vol. 45 P. 689–691.

Campoy E., Colombo M.I. Autophagy in intracellular bacterial infection // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1793. P. 1465–1477.

Candela C.G., Lopez L., Kohen V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations // *Nutr. Hosp.* 2011. Vol. 26. P. 323–329.

Cantillo-Ciau Z., Moo-Puc R., Quijano L., Freile-Pelegrin Y. The tropical brown alga *Lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds // *Mar. Drugs.* 2013. Vol. 8. P. 1292–1304.

Canuel E.A., Martens C.S. Seasonal variations in the sources and alteration of organic matter associated with recently-deposited sediments // *Org. Geochemistry.* 1993. Vol. 20. P. 563–577

Conway N., Cappuzzo J.M. Incorporation and utilization of bacterial lipids in the *Solemya velum* symbiosis // *Mar. Biol.* 1991. Vol. 108. P. 277–291.

Carballeira N.M. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents // *Prog. Lipid Res.* 2008. Vol. 47. P. 50–61.

Carballeira N.M., Reyes E.D., Sostre A., Rodriguez A.D., Rodriguez J.L., Gonzales F.A. Identification of the novel antimicrobial fatty acid (5Z,9Z)-14-methyl-5,9-pentadecadienoic acid in *Eunicea succinea* // *J. Nat. Prod.* 1997. Vol. 60.P. 502–504.

Chaston J., Goodrich-Blair H. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. Vol. 34. P. 41–58.

Cimino G., Gavagnin M. Molluscs: Progress in Molecular and Subcellular Biology Subseries Marine Molecular Biochemistry. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 2006. 387 p.

Clegg S., Gerlach G.F. Enterobacterial fimbriae // *J. Bacteriol.* 1987. Vol. 169. P. 934–938.

Conway N., Cappuzzo J.M. Incorporation and utilization of bacterial lipids in the *Solemya velum* symbiosis // *Mar. Biol.* 1991. Vol. 108. P. 277–291.

Dalsgaard J., John M.S., Kattner G., Muller-Navarra D., Hagen W. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment // *Adv. Mar. Biol.* 2003. Vol. 46. P. 241–251

de Souza L.M., Sasaki G.L., Villela R., Maria T., Barreto-Bergter E. Structural characterization and anti-HSV-1 and HSV-2 activity of glycolipids from the marine algae *Osmundaria obtusiloba* isolated from Southeastern Brazilian coast // *Mar. Drugs.* 2012. Vol. 10. P. 918–931.

Dubilier N., Bergin C., Lott C. Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. Vol. 6. P. 725–740.

Dunlap P.V., Kojima Y., Nakamura S., Nakamura M. Inception of formation and early morphogenesis of the bacterial light organ of the sea urchin cardinalfish, *Siphamia versicolor* // *Mar. Biol.* 2009. Vol. 156. P. 2011–2020.

Evans-Illidge E.A., Logan M., Doyle J., et al. Phylogeny drives large scale patterns in Australian marine bioactivity and provides a new chemical ecology rationale for future biodiscovery // *PLOS ONE.* 2013. Vol. 8. e73800.

Farokhi F., Grellier P., Clement M. et al. Antimalarial activity of axidjiferosides, new beta-galactosylceramides from the African sponge *Axinyssa djiferi* // *Mar. Drugs.* 2013. Vol. 11. P. 1304–1315.

Faulkner D.J. Marine natural products // Nat. Prod. Rep. 2000. Vol. 17. P. 7–55.

Fdhila F., Vazquez V., Sanchez J.L., Riguera R. DD-diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus* // J. Natural. Products. 2003. Vol. 66.P. 1299–1301

Fontana A. Biogenetical proposals and biosynthetic studies on secondary metabolites of opisthobranch mollusks / Molluscs: Progress in Molecular and Subcellular Biology Subseries Marine Molecular Biochemistry. Cimino G., Gavagnin M. Eds. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2006. P. 303–328.

Gannefors C., Boer M., Kattner G. et al. The Arctic sea butterfly *Limacina helicina*: lipids and life strategy // Mar. Biol. 2005. Vol. 147. P. 169–177.

Gillan F.T., Johns R.B. Chemical markers for marine bacteria: fatty acids and pigments // In: Biological markers in the sedimentary environment. Johns R.B. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher. 1986. P. 291–309.

Goffredi S.K., Orphan V.J., Rouse G.W. et al. Evolutionary innovation: a bone-eating marine symbiosis // Environ. Microbiol. 2005. Vol. 7. P. 1369–1378.

Haine E.R. Symbiont-mediated protection // Proc. R. Soc. B-Biol. Sci. 2008. Vol. 275. P. 353–361.

Hanuš L.O., Levitsky D.O., Shkrob I., Dembitsky V.M. Plasmalogens, fatty acids and alkyl glyceryl ethers of marine and freshwater clams and mussels // Food Chem. 2009. Vol. 116. P. 491–498.

Hartmann T., Kuchenbecker J., Grimm M.O. Alzheimer's disease: The lipid connection // J. Neurochem. 2007. Vol. 103. P. 159–170.

Houtsmuller U.M.T. Columbinic acid, a new type of essential fatty acid // Prog. Lipid Res. 1981. Vol. 20. P. 889–896.

Jones B.W., Nishiguchi M.K. 2004. Counterillumination in the Hawaiian bobtail squid, *Euprymna scolopes* Berry (Mollusca: Cephalopoda) // Mar. Biol. Vol. 144. P. 1151–1155.

Joseph J.D. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates: Mollusca // Prog. Lipid. Res. 1982. Vol. 21. P. 109–153.

Kadar E., Bettencourt R., Costa V. et al. Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus* // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2005. Vol. 318. P. 99–110.

Kaneda T. Iso-fatty and anteiso-fatty acids in bacteria - biosynthesis, function, and taxonomic significance // Microbiol. Rev. 1991. Vol. 55. P. 288–302.

Kawashima H. Unusual minor nonmethylene-interrupted di-, tri-, and tetraenoic fatty acids in limpet gonads // *Lipids*. 2005. Vol. 40. P. 627–630.

Kharlamenko V.I., Zhukova N.V., Khotimchenko S.V. et al. Fatty-acids as markers of food sources in a shallow-water hydrothermal ecosystem (Kraternaya Bight, Yankich Island, Kurile Islands) // *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 1995. Vol. 120. P. 231–241.

Klussmann-Kolb A., Brodie G.D. Internal storage and production of symbiotic bacteria in the reproductive system of a tropical marine gastropod // *Mar. Biol.* 1999. Vol. 133. P. 443–447.

Kraffe E., Sounant P., Marty A. Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves // *Lipids*. 2004. Vol. 39. P. 59–66.

Latorre E., Collado M.P., Fernandez I. et al. Signaling events mediating activation of brain ethanolamine plasmalogen hydrolysis by ceramide // *Eur. J. Biochem.* 2003. Vol. 270. P. 36–46.

Lindquist N., Barber P.H., Weisz J.B. Episymbiotic microbes as food and defence for marine isopods: unique symbioses in a hostile environment // *Proc. R. Soc London. B.* 2005 Vol. 272. P. 1209–1216.

Lopanik N.B., Targett N.M., Lindquist N. Ontogeny of a symbiont-produced chemical defense in *Bugula neritina* (Bryozoa) // *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 2006. Vol. 327. P. 183–191.

Magnusson C.D., Haraldsson G.G. Ether lipids // *Chem. Phys. Lipids*. 2011. Vol. 164. P. 315–340.

Makarieva T.N., Santalova E.A., Gorshkova I.A et al. A new cytotoxic fatty acid (5Z,9Z)-22-methyl-5,9,-tetraecosadienoic acid and the sterols from the far eastern sponge *Geodinella robusta* // *Lipids*. 2002. Vol. 37. P. 75–80.

McDonald G.R., Nybakken J.W. A worldwide review of the food of nudibranch mollusks. II. The suborder Dendronotacea // *Veliger*. 1999. Vol. 42. P. 62–66.

McKenzie J.D., Black K.D., Kelly M.S. et al. Comparisons of fatty acids and stable isotope ratios in symbiotic and non-symbiotic brittlestars from Oban Bay, Scotland // *J Mar. Biol. Assoc. UK*. 2000. Vol. 80. P. 311–320.

Monroig O., Navarro J.C., Dick J.R., Alemany F., Tocher D.R. Identification of a $\Delta 5$ -like fatty acyl desaturase from the cephalopod *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) involved in the biosynthesis of essential fatty acids // *Mar. Biotechnol.* 2012. Vol. 14. P. 411–422.

Nussbaumer A.D., Fisher C.R., Bright M. Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms // *Nature*. 2006. Vol. 441. P. 345–348.

Perry G.J., Volkman J.K., Johns R.B., Bavor H.J. Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1979. Vol. 43. P. 1715–1725.

Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria // *Nat. Prod. Rep.* 2004. Vol. 21. P. 519–538.

Plouguerne E., de Souza L.M., Sasaki G.L. et al. Antiviral Sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare* // *Mar. Drugs*. 2013. Vol. 11. P. 4628–4640.

Pond D.W., Allen C.E., Bell M.V. et al. Origins of long-chain polyunsaturated fatty acids in the hydrothermal vent worms *Ridgea piscesae* and *Protis hydrothermica* // *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 2002. Vol. 225. P. 219–226.

Pond D.W., Segonzac M., Bell M.V. et al. Lipid and lipid carbon stable isotope composition of the hydrothermal vent shrimp *Mirocaris fortunata*: evidence for nutritional dependence on photosynthetically fixed carbon // *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 1997. Vol. 157. P. 221–231.

Proksch P., Edrada R.A., Ebel R. Drugs from the seas — current status and microbiological implications // *Appl. Microbiol. Biot.* 2002. Vol. 59. P. 125–134.

Rezanka T., Sigler K. Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms // *Prog. Lipid Res.* 2009. Vol. 48. P. 206–238.

Saito H., Hashimoto J. Characteristics of the fatty acid composition of a deep-sea vent gastropod, *Ifremeria nautili* // *Lipids*. 2010. Vol. 45. P. 537–548.

Sargent J.R. Ether-linked glycerides in marine animals // In *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils*; Ackman, R.G., Ed.; Boca Raton, Florida: CRC Press. 1987. P. 176–193.

Schmidt E.W., Donia M.S. Life in cellulose houses: symbiotic bacterial biosynthesis of ascidian drugs and drug leads // *Curr. Opin. Biotech.* 2010. Vol. 21. P. 827–833.

Schuett C., Doepke H. Endobacterial morphotypes in nudibranch cerata tips: a SEM analysis // *Helgol. Mar. Res.* 2013. Vol. 67. P. 219–227.

Simopoulos A.P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases // *Exp. Biol. Med.* 2008. Vol. 233. P. 674–688.

Schmidt, E.W.; Donia, M.S. Life in cellulose houses: Symbiotic bacterial biosynthesis of ascidian drugs and drug leads // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010. Vol. 21. P. 827–833.

Stewart F.J., Cavanaugh C.M. Bacterial endosymbioses in *Solemya* (Mollusca: Bivalvia) – Model systems for studies of symbiont-host adaptation // Anton Leeuw. Int. J. G. 2006. Vol. 90. P. 343–360.

Tasdemir D., Topaloglu B., Perozzo R. et al. Marine natural products from the Turkish sponge *Agelas oroides* that inhibit the enoyl reductase from *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli* // Bioorg. Med. Chem. 2007. Vol. 15. P. 6834–6845.

Vasskog T., Andersen J.H., Hansen E., Svenson J. Characterization and cytotoxicity studies of the rare 21:4n-7 acid and other polyunsaturated fatty acids from the marine opisthobranch *Scaphander lignaris*, isolated using bioassay guided fractionation // Mar. Drugs. 2012. Vol. 10. P. 2676–2690.

Wägele H., Ballesteros M., Avila C. Defensive glandular structures in Opisthobranch molluscs – from histology to ecology // Oceanogr. Mar. Biol. 2006. Vol. 44. P. 197–276.

Wendel M., Heller A.R. Anticancer actions of omega-3 fatty acids – Current state and future perspectives // Anticancer Agents Med. Chem. 2009. Vol. 9. P. 457–470.

Wilkinson C.R., Garrone R., Vacelet J. Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and in situ evidence // Proc. R. Soc. B-Biol. Sci. 1984. Vol. 220. P. 519–528.

Xu P.N., Distel D.L. Purification and characterization of an endo-1,4-beta-D glucanase from the cellulolytic system of the wood-boring marine mollusk *Lyrodus pedicellatus* (Bivalvia : Teredinidae) // Mar. Biol. 2004. Vol. 144. P. 947–953.

Zhukova N.V. Lipid classes and fatty acid composition of the tropical nudibranch mollusks *Chomodoris* sp. and *Phyllidia coelestis* // Lipids. 2007. Vol. 42. 1169–1175.

Zhukova N.V. Lipids and fatty acids of nudibranch mollusks: potential sources of bioactive compounds // Marine Drugs. 2014. Vol. 12. P. 4578–4592.

Zhukova N.V., Kharlamenko V.I., Svetashev V.I., Rodionov I.A. Fatty-acids as markers of bacterial symbionts of marine bivalve mollusks // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1992. Vol. 162. P. 253–263.

Zhukova N.V., Svetashev V.I. Non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in mollusks from the Sea of Japan // Comp. Biochem. Physiol. 1986. Vol. 83B. P. 643–646.

**ГЕНЕТИКА СОХРАНЕНИЯ МОРСКИХ
БИОЛОГИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ:
МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
НА ПРИМЕРЕ МОРСКОГО ЕЖА
*STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS***

Е.С. Балакирев

*Национальный научный центр морской биологии
им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение
Российской академии наук,
Владивосток 690041, Россия
Школа биомедицины,
Дальневосточный федеральный университет,
Владивосток 690091, Россия.
E-mail: esbalakirev@mail.ru*

**CONSERVATION GENETICS
OF MARINE BIOLOGICAL RESOURCES:
METHODOLOGICAL ASPECTS WITH
THE SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS
INTERMEDIUS* AS AN EXAMPLE**

E.S. Balakirev

*National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia
School of Biomedicine, Far Eastern Federal University,
Vladivostok 690091, Russia
E-mail: esbalakirev@mail.ru*

На базе принципов популяционной и эволюционной генетики и с использованием молекулярно-биологических методов проведены исследования ресурсного вида морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, затрагивающие вопросы эволюции и сохра-

нения морского биоразнообразия (Balakirev et al., 2008, 2016a, 2017; Balakirev, 2019). В настоящем обзоре рассмотрены наиболее важные методологические аспекты этих исследований, относящиеся к разработке эффективных маркёров для идентифика-

ции и анализа близких эволюционных линий. В частности, анализируются паттерны полиморфизма и дивергенции, структура гаплотипов, неравновесие по сцеплению и тесты на нейтральность для исследованных генов и полных митохондриальных геномов, а также состав и структура бактериальных симбионтов, населяющих *S. intermedius*. Важной особенностью проекта является комбинированный анализ ядерного (*bindin*) и митохондриального (*COI*) генов, отражающих эволюцию нейтральных и адаптивных сегментов генома, а также исследование микробиома, ранее не использовавшегося для эволюционного анализа морских организмов. Интегративный подход наиболее эффективен для выявления и учёта полной картины биологического разнообразия в море, где широко распространены скрытые (иначе – криптические) виды, исследование которых затруднено при использовании морфологических методов и стандартного ДНК-штрихкодирования. Полученные данные указывают на то, что адаптивные локусы и бактериальные симбионты являются достаточно чувствительными маркерами для идентификации и анализа близких эволюционных линий и позволяют сформировать методологическую базу для последующих эволюционно-генетических исследований, направленных на решение практических задач по рациональному использованию, мониторингу и сохранению морских биологических ресурсов.

Based on the principles of population and evolutionary genetics and using molecular biological methods we investigated the commercially important sea urchin species *Strongylocentrotus intermedius* (A. Agassiz, 1863) in connection with the problem of marine biodiversity evolution and conservation (Balakirev et al., 2008, 2016a, 2017; Balakirev, 2019). Here we review the most important methodological aspects of these studies related to developing efficient genetic markers for identification and analysis of close evolutionary lineages. Particularly, we present the patterns of polymorphism and divergence, haplotype structure, linkage disequilibrium, and neutrality tests for genes and genomes studied as well as the content and structure of bacterial symbionts associated with *S. intermedius*. Important feature of the project is combined analysis of the nuclear (*bindin*) and mitochondrial (*COI*) genes reflecting evolution of neutral and adaptive segments of the genome. We also investigated sea urchin microbiomes, which were not used previously for the evolutionary analysis of marine organisms. Integrative approach is most productive for detecting full picture of marine biodiversity characterized by wide distribution of cryptic species, which are difficult to study with the morphological and standard DNA-barcoding methods. The data obtained indicate that adaptive loci and bacterial symbionts are enough sensitive markers for identifi-

cation and analysis of close evolutionary lineages and allow to build the methodologic foundation for future evolutionary genetic studies to resolve

the practical goals of conservation, monitoring, and sustainable management of marine biological resources.

Введение

Генетическая изменчивость и рациональное природопользование

Анализ генетического разнообразия видов, находящихся под антропогенным прессом, является основной задачей “генетики сохранения видов”, или, шире, “природоохранной генетики” (от англ. conservation genetics) (Höglund, 2009; Frankham et al., 2010; Allendorf et al., 2013; Mills, 2013). Данный факт объясняется тем, что внутривидовое генетическое разнообразие является фундаментальным ресурсом природных популяций, обеспечивающим возможность адаптации к изменяющейся внешней среде и определяющим жизнеспособность и эволюционную перспективу популяций и видов (Динамика ..., 2004; Brodersen, Seehausen, 2014; Mimura et al., 2017; Frankham et al., 2017; Advances ..., 2018). Более того, внутривидовая изменчивость “ключевых видов” (от англ. keystone species) играет важную роль в сохранении структуры сообществ и функционировании экосистем (Mimura et al., 2017; Des Roches et al., 2018; Koricheva, Hayes, 2018; Pelletier, Coltman, 2018).

В соответствии с вычислениями Де Воса с соавторами (De Vos et al., 2015) и Сибэллос с соавторами (Ceballos et al., 2015) вследствие хозяйственной деятельности человека скорость вымирания видов увеличилась в 1000 и более раз в сравнении с фоновой скоростью, известной из палеонтологической летописи. Значительно интенсивнее исчезают отдельные популяции (Ceballos et al., 2017). Массовое вымирание угрожает и морской биоте (Payne et al., 2016). Хотя эти расчёты представляются многократно завышенными (например, Briggs, 2017), тем не менее регистрируется снижение глобальных выловов (Pauly, Zeller, 2016; Kang et al., 2018), многие объекты промысла находятся в состоянии чрезмерной эксплуатации или коллапса (Worm et al., 2009; Osio et al., 2015; Pauly, Zeller, 2016). Более того, установлено, что интенсивная эксплуатация приводит к генетическим нарушениям популяций у промысловых видов (Балакирев, Федосеев, 2000а, б; 2001; Population..., 1987; Allendorf et al., 2008; Allendorf, Hard, 2009; Pinsky, Palumbi, 2014; Hendry et al., 2017; Kuparinen, Festa-

Bianchet, 2017; Kuparinen, Hutchings, 2017). Массовое заводское производство молоди рыб и беспозвоночных с последующим выпуском в природную среду и интродукцией (см., например, Мокрецова, 1987; Федосеев, 2000; Акулин и др., 2015) наряду с очевидным положительным эффектом может нарушать баланс генетического разнообразия естественных популяций за счёт потери изменчивости и способности к адаптации, а также изменения состава и структуры популяций (Динамика ..., 2004; Population ..., 1987; Allendorf, Hard, 2009; Laikre et al., 2010; Grant, 2012; Grant et al., 2017). Антропогенная гибридизация представляет одну из основных угроз для биологического разнообразия в масштабе всего мира, являясь причиной деградации локально адаптированных генофондов природных популяций и создавая предпосылки для вымирания (Rhymer, Simberloff, 1996; Allendorf et al., 2001, 2013; Garcia de Leaniz et al., 2007; McFarlane, Pemberton, 2019). Эти обстоятельства определяют значимость генетического мониторинга, направленного на выявление и предотвращение деградации генофондов природных популяций вследствие деятельности человека (Schwartz et al., 2007; Balakirev et al., 2013; Leroy et al., 2017; Flanagan et al., 2018). Генетические методы позволяют получить фундаментальные данные для информирования рыбохозяйственного менеджмента с целью достижения неистощительного промысла, оптимальной организации искусственного восстановления популяций (трансплантация, интродукция и т. д.) и безопасной аквакультуры (см., например, Waples et al., 2008; Bernatchez et al., 2017).

Проблема идентификации близких видов

Другой важной задачей природоохранной генетики является исследование близких эволюционных линий, слабо различающихся морфологически и/или генетически. Такие линии включают внутривидовые экологические формы, зарождающиеся и близкие виды (Knowlton, 1993, 2000; Palumbi, 1994; Pfenninger, Schwenk, 2007; Johannesson, 2015; Fišer et al., 2018; Sheets et al., 2018; Galliart et al., 2019). Корректная идентификация близких эволюционных линий является важной задачей для адекватной оценки, сохранения и управления ресурсами, а также для надежной оценки генных потоков. Ошибочное смешивание особей разных линий ведёт к завышению (или занижению) оценок популяционной дифференциации (Sheets et al., 2018), что в свою очередь обуславливает ошибочные рекомендации при организации промысла и

восстановительных мероприятий. Проблему осложняет тот факт, что идентификация близких эволюционных линий может быть затруднена при использовании не только морфологических критериев, но и стандартного ДНК-штрихкодирования с использованием коротких фрагментов митохондриальной ДНК (мтДНК) (см., например, Mateus et al., 2013; Tarvin et al., 2017; Bernardi et al., 2018; Hensch et al., 2019; Wilding, Weedall, 2019). Это объясняется действием некоторых искажающих процессов, включающих, например, незавершённую сортировку линий, гибридизацию и интрогрессию, характерных для эволюционной динамики близких видов (Dupuis et al., 2012; Leliaert et al., 2014; Naciri, Linder, 2015). Идентификация недавно разделившихся эволюционных линий, характеризующихся обычно низким уровнем дивергенции, требует использования мультилокусного интегративного подхода, основанного на рассмотрении помимо генетики и других доступных биологических и экологических аспектов (Alström et al., 2008; Schwentner et al., 2011; Dupuis et al., 2012; Barao et al., 2014; Johannesson, 2015; Le Pennec et al., 2017; Wang et al., 2017; Nwankwo et al., 2018; Wei et al., 2019). Таким образом, проблема идентификации и анализа близких эволюционных линий и криптического видообразования в морской среде является одной из наиболее важных и одновременно мало изученных областей в современной эволюционной биологии.

Нейтральные и адаптивные маркёры

Требуемая точность для оценки внутривидового генетического разнообразия и генетической идентификации видов может быть достигнута при использовании адекватных молекулярных маркёров, достаточно полно отражающих генетический состав исследуемых популяций и видов. Адекватные молекулярные маркёры должны удовлетворять ряду критериев, к наиболее важным из которых относятся репрезентативность, чувствительность, однозначность генетической интерпретации и воспроизводимость. Технические аспекты и особенности использования тех или иных молекулярных маркёров подробно рассмотрены в литературе (см., например, обзоры: Feral, 2002; Arif, Khan, 2009; Park et al., 2009; Cuellar-Pinzon et al., 2016; Asmelash et al., 2017). Некоторого пояснения требует вопрос по поводу нейтральных и адаптивных маркёров.

Термин “нейтральный” относится к локусу, изменчивость которого не имеет (или почти не имеет) влияния на приспособленность, например в отношении производимого потомства (Holderegger et al., 2006). Нейтральная генетическая изменчивость – это изменчивость, рассчитанная по нейтральным нуклеотидным последовательностям, располагающимся вне генов и регуляторных участков. Эта изменчивость не влияет на фенотип и не проявляет согласующейся устойчивой ассоциации с экологическими факторами, как на уровне сообществ, так и экосистем, а также не демонстрирует согласованных изменений в ответ на экологические изменения. Генетическая изменчивость, не связанная с приспособленностью, используется для оценки нейтральных популяционных и демографических показателей и процессов (эффективная численность популяций, генный поток, генетический дрейф, изменения размера популяции). Для этих целей необходимы множественные нейтральные локусы, отражающие динамику популяций независимо от селективных сил (Allendorf et al., 2010). Нейтральные маркёры подбирают с использованием различных вариантов ПЦР амплификации предположительно нейтральных локусов, например микросателлитов (Zietkiewicz et al., 1994; Vieira et al., 2016), RAPD (Williams et al., 1990; Welsh, McClelland, 1990), AFLP (Vos et al., 1995) и SRAP (Li, Quiros, 2001; Robarts, Wolfe, 2014).

Термин “адаптивный” относится к гену, изменчивость которого имеет влияние на приспособленность. Адаптивная генетическая изменчивость – это изменчивость, рассчитанная по адаптивным нуклеотидным последовательностям (Holderegger et al., 2006; Whitlock, 2014). Эта изменчивость влияет на фенотип за счёт изменения количества, структуры или времени экспрессии соответствующих белков, демонстрирует согласующиеся ассоциации с экологическими факторами, как на уровне сообществ, так и экосистем, а также проявляет согласованные изменения в ответ на экологические изменения. Адаптивная генетическая изменчивость возникает в результате действия естественного отбора и эволюционирует под влиянием факторов внешней среды, налагающих селективное давление на особей, населяющих неоднородный ландшафт. Благодаря адаптивной изменчивости популяции приспособляются к окружающей среде. Следовательно, адаптивная изменчивость необходима для поддержания жизнеспособности популяции, и анализ именно этой изменчивости играет важную роль в генетике сохранения видов. Адаптивная изменчивость используется для оценки эволюционного потенциала популяций, адаптивной дивергенции, локальной адаптации,

идентификации так называемых единиц сохранения (от англ. conservation units) при оптимизации природоохранных мероприятий (Hauser, Carvalho, 2008; Allendorf et al., 2010; Kirk, Freeland, 2011; Yildirim et al., 2018).

Идентификация адаптивных локусов и изменчивости, лежащей в основе адаптивных процессов, осуществляется с использованием разнообразных подходов, сочетающих возможности количественной генетики и популяционной геномики, например при исследовании ассоциаций между генотипом и изменяющимися параметрами внешней среды (Bergelson, Roux, 2010; Nadeau, Jiggins, 2010; Pardo-Diaz et al., 2015; Ahrens et al., 2018). Методы “секвенирования нового поколения” (от англ. next generation sequencing, NGS) позволяют выявлять множественные потенциально адаптивные маркёры, демонстрирующие атипично высокие значения показателя популяционной дифференциации (F_{ST}). Такие потенциально адаптивные локусы называют (в статистическом смысле слова) “выбросами” (от англ. outliers; см., например, Kirk, Freeland, 2011; Nielsen et al., 2012; Haasl, Payseur, 2016; Ahrens et al., 2018; Weigand, Leese, 2018). Многочисленные примеры адаптивных локусов можно найти среди белок-кодирующих генов, особенно из числа вовлечённых в репродуктивную функцию (см., например, Swanson, Vacquier, 2002; Almeida, DeSalle, 2017). Здесь же необходимо упомянуть о так называемых генах видообразования (от англ. speciation genes), которые играют непропорционально высокую роль при возникновении новых видов (см., например, Wu, Ting, 2004). В результате молекулярно-эволюционных исследований установлено, что известные примеры генов видообразования демонстрируют явные сигналы позитивного отбора, проявляющиеся в основном в виде существенного избытка несинонимичных нуклеотидных замещений (обзоры: Orr et al., 2004; Wu, Ting, 2004; Barton, 2010). Адаптивные маркёры позволили выявить “скрытую” (для нейтральных маркёров) популяционную структуру у ресурсных морских рыб (см., например, Гордеева, 2012; Rampoulie et al., 2006; Hemmer-Hansen et al., 2007; Milano et al., 2014; Cure et al., 2017; Clucas et al., 2019; обзоры: Hauser, Carvalho, 2008; Allendorf et al., 2010, 2013; Kirk, Freeland, 2011), оказались эффективными при анализе демографической истории (Guichoux et al., 2013) и идентификации близких и зарождающихся видов (Mateus et al., 2013; Bernardi et al., 2018; Whitney et al., 2018; Hensch et al., 2019). Аналитические аспекты, раскрывающие причины эффективности адаптивных маркёров для анализа структуры популяций у видов с большими численностями и коэффициентами миграции, подробно

рассмотрены в ряде работ (см., например, Hauser, Carvalho, 2008, с. 336; Allendorf et al., 2010, с. 700; Allendorf et al., 2013, с. 175).

Вышеприведённые определения нейтральных и адаптивных маркёров верны теоретически, но трудно применимы практически. Например, даже у псевдогенов часто обнаруживаются консервация нуклеотидных последовательностей (т.е. оперирует негативный отбор; Балакирев, Айала, 2004а; Balakirev, Ayala, 1996, 2003а, 2004а) и неслучайное распределение энтропии (Балакирев, Айала, 2004а; Balakirev et al., 2003, 2005). Поэтому в строгом смысле слова псевдогены не являются нейтральными элементами генома. С другой стороны, в той или иной степени следы позитивного отбора прослеживаются почти у всех генов, если они достаточно подробно исследуются в этом отношении (Балакирев, Айала, 2004б; Balakirev, Ayala, 2003b, с, 2004b; Balakirev et al., 1999, 2002, 2006, 2011, 2016а; Studer et al., 2008; Sella et al., 2009; Hermansen et al., 2017). Более того, позитивный отбор выявлен для синонимичной (“молчащей”) изменчивости у млекопитающих (Resch et al., 2007) и плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (Balakirev et al., 2011). Таким образом, операционально и в качестве предварительной гипотезы адаптивный маркёр можно определить как локус, демонстрирующий паттерны изменчивости и/или дифференциации, статистически существенно отклоняющиеся от ожидаемых паттернов в рамках нейтральной теории молекулярной эволюции (Kimura, 1983). Соответственно, нейтральный маркёр – это локус, для которого таких отклонений не выявляется. Численные критерии несоответствия нейтральным ожиданиям рассчитываются с использованием разнообразных статистических подходов (Hudson et al., 1987, 1994; Tajima, 1989; McDonald, Kreitman, 1991; Fu, Li, 1993; McDonald, 1996, 1998; Kelly, 1997; Depaulis, Veuille, 1998; Wall, 1999). Следует помнить, что на результаты всех статистических тестов на нейтральность оказывают существенное влияние демографические факторы, что часто ведёт к ложноположительным или ложноотрицательным оценкам и затрудняет интерпретацию (Wayne, Simonsen, 1998; Nielsen, 2001; Weigand, Leese, 2018). Во многом эта проблема устраняется при использовании устойчивых методов, разработанных для анализа эволюции кодонов и основанных на моделях максимального правдоподобия (см. обзор: Anisimova, Kosiol, 2009). Для более точного разделения эффектов демографических и селективных процессов необходим функциональный подход с использованием эксперименталь-

ных методов, позволяющих изучать корреляции между специфическими гаплотипами и соответствующими функциональными различиями.

Поиск адаптивных маркёров сопряжён с интенсивной молекулярно-генетической работой и зависит от наличия соответствующей приборной базы, не всегда имеющейся в необходимом объёме даже в генетических лабораториях. В работах Л.А. Животовского с коллегами (Животовский, 2016; Zhivotovsky et al., 2015) предлагается оригинальный двухступенчатый подход, частично преодолевающий эту проблему. На первом этапе исследования на основе тщательного анализа экологических, географических и иных негенетических характеристик популяции группируются в “эко-географические единицы” (ЭГЕ), которые затем тестируются генетическими методами. Предполагается, что если ЭГЕ выявлены достаточно точно, то последующий анализ с использованием любых доступных молекулярных маркёров (аллозимов, микросателлитов и др.) будет обладать достаточно высокой разрешающей способностью (Животовский, 2016; Zhivotovsky et al., 2015). Данный подход представляется важным, особенно на начальном этапе исследования, поскольку позволяет получить приближённое описание генетической структуры без существенных затрат на проведение масштабных молекулярно-генетических работ. Тем не менее трудности выделения ЭГЕ могут оказаться сопоставимыми с трудностями поиска адаптивных локусов, что зависит от характера исследований, проводимых, например, в масштабе озера или океана. Более того, для многих видов морских организмов с масштабными ареалами, большими численностями популяций и значительным обменом генов характерна очевидная неэффективность нейтральных маркёров при исследовании популяционной структуры. Например, даже редкие обмены мигрантами между стадами рыб с большими популяционными размерами будут достаточны, чтобы устранить генетические свидетельства популяционной дифференциации по нейтральным локусам (Hauser, Carvalho, 2008; Allendorf et al., 2010, 2013). Учитывая эти обстоятельства и не умаляя важности выделения ЭГЕ, вряд ли можно считать продуктивной позицию “нейтралитета” в отношении адаптивных локусов, аргументируемую, например, “ограниченностью знания о генетике популяционных адаптаций” (Животовский, 2016, с. 329), тем более что для многих видов, включая морских ежей (Pespeni, Palumbi, 2013), уже проведены “полногеномные сканирования” (от англ. genome-wide scan) и выявлены многочисленные локусы, демон-

стрирующие аномально высокие значения показателя популяционной дифференциации (F_{ST}), неравновесия по сцеплению и другие признаки отклонения от нейтральности (см., например, Milano et al., 2014; Mathieson et al., 2015; Cure et al., 2017; do Prado et al., 2018; Hoey, Pinsky, 2018; Jorde et al., 2018; Nielsen et al., 2018; Collevatti et al., 2019; Phair et al., 2019; Silliman, 2019). Эти локусы, вероятно, представляют сегменты генома, эволюционирующие под влиянием позитивного отбора, и могут оказаться (по аналогии) полезными для новых исследований, учитывая, что у близких видов сходные генетические структуры обычно ответственны за проявление сходных функций. Например, резидентная и проходная формы миноги (*Lampetra fluviatilis* L., 1758 и *L. planeri* Bloch, 1784) не различаются по стандартным маркерам ДНК-штрихкодирования (Mateus et al., 2013). Однако с помощью метода RAD-секвенирования (restriction-site-associated DNA sequencing, RAD-Seq) выявлено 166 фиксированных аллельных различий ($F_{ST} = 0,37$) между формами, что доказывает их видовой статус. Большинство генов, по которым обнаружены фиксированные различия, кодируют белки, связанные с адаптациями к мигрирующему и резидентному образу жизни. Например, фиксированные различия найдены по гену *vasotocin*, кодирующему главный белок осморегуляции при изменении солёности воды (Balment et al., 2006), а также по гену *GnRH2*, кодирующему гонадотропин-высвобождающий гормон и играющему ключевую роль в процессе хоминга у лососёвых рыб (Ueda, 2011). Мы клонировали и секвенировали гены *vasotocin* и *GnRH2* у резидентной и анадромной форм тихоокеанской миноги *Lethenteron camtschaticum* (Tilesius, 1811). Предварительные данные выявляют отчётливые признаки позитивного отбора и различия между формами (Е.С. Балакирев, Ф.Дж. Айала, неопубликованные данные), тогда как при исследовании полных мт геномов различий между резидентной и анадромной формами *L. camtschaticum* не обнаружено (Balakirev et al., 2016b). Таким образом, использование метода аналогии может существенно упростить задачу поиска адаптивных локусов, освобождая (на некоторое время) исследователя от развёртывания дорогостоящей и сложной молекулярно-биологической “кухни”.

*Морфологическая изменчивость морского ежа *Strongylocentrotus intermedius**

Промежуточный (серый) морской ёж *Strongylocentrotus intermedius* (А. Agassiz, 1863) является важным объектом промысла и искусственного воспроизводства, а также модельным видом для биологических, фармакологических и биотехнологических исследований. Вид распространён в северо-западной части Тихого океана, включая Японское и Охотское моря, восточное побережье Камчатки, южные Курильские острова и побережье Японии (Кафанов, Павлючков, 2001; Бажин, Степанов, 2012), и приурочен преимущественно к литоральной и верхней сублиторальной зоне до глубины 25 м (Кафанов, Павлючков, 2001). Ареал изучен недостаточно, что обусловлено трудностями таксономической идентификации в связи с высокой морфологической изменчивостью особей из различных локальностей (Бажин, Степанов, 2012). Окраска *S. intermedius* разнообразна. В пределах одной локальности встречаются особи, имеющие тёмно-зеленую, красноватую, коричневую, сиреневую и белую окраску. Более того, основания и кончики игл, а также первичные, вторичные и миллиарные иглы как у взрослых ежей, так и у молоди часто окрашены в разные цвета. Молочно-белая окраска игл преобладает в глубоководных поселениях ежа (15–25 м). Этот цветовой вариант известен как “седая” (С) морфологическая форма, отличающаяся по ряду морфологических признаков от “типичной” (Т) формы, которая преобладает в мелководных поселениях (5–10 м) (В.А. Павлючков, неопубликованные данные; Balakirev et al., 2008). Иглы у молодых особей (возраст 1–3 года), принадлежащих к форме С, полностью белые, а иглы (особенно первичные) половозрелых особей молочно-белые или бело-розовые. У особей, принадлежащих к форме Т, окраска игл более разнообразная (зелёная, коричневая, красная и сиреневая). Имеются также ярко выраженные различия между Т и С формами по длине игл и толщине панциря. У формы Т иглы относительно короткие, их высота, как правило, не превышает одной трети радиуса панциря. У формы С иглы длиннее и достигают, а часто и превышают две трети радиуса панциря. Толщина панциря существенно больше у Т формы (850 мкм), чем у С формы (600 мкм) (В.А. Павлючков, неопубликованные данные). Обратная зависимость между толщиной панциря и глубиной обитания выявлена и у других представителей рода *Strongylocentrotus* (Бажин, Степанов, 2002). Морфологические различия между Т и С формами стабильны во времени, характерны для молоди и

взрослых особей и легко узнаваемы (рис. 1). Присутствие морфологических форм *S. intermedius* систематически регистрируется для побережья северного Приморья (В.А. Павлючков, неопубликованные данные).

Предшествующие генетические исследования морского ежа Strongylocentrotus intermedius

Предшествующие генетические исследования морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* немногочисленны и проводились с использованием лишь аллозимных маркёров (Пудовкин и др., 1984; Манченко, 1985; Заславская и др., 2012; Manchenko, Yakovlev, 2001). В этих работах исследовалась, вероятно, только Т форма ежа, поскольку материал собирался с относительно небольших глубин (2–6 м). Таким образом, генетические данные по морфологическим формам *S. intermedius* отсутствуют, их таксономический статус не установлен. Эта неопределённость осложняет анализ и сохранение биоразнообразия, мониторинг и регуляцию промысла морского ежа, поскольку максимальный устойчивый вылов (МУВ) возможен лишь при менеджменте чётко разграниченных популяций (Utter, 1991; Waples et al., 2008).



Типичная (Т) форма

Седая (С) форма

Рис. 1. Типичная (Т) и седая (С) морфологические формы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. По материалам Balakirev et al. (2008).

Маркёры, используемые в настоящей работе

Для выяснения таксономического статуса Т и С форм и оценки возможного присутствия криптических видов в пределах *Strongylocentrotus intermedius* мы использовали нуклеотидные последовательности митохон-

дриального гена, кодирующего первую субъединицу цитохром с-оксидазы (COI), ядерного гена, кодирующего белок *bindin*, полные митохондриальные геномы, а также составы и структуру микробиомов.

Ген *COI* является общепринятым маркёром ДНК-штрихкодирования для идентификации видов (Hebert et al., 2003). Полные митохондриальные геномы (митогеномы) также широко используются как эффективные маркёры молекулярной систематики и филогенетики (Hu et al., 2004; Miya, Nishida, 2014). Имеется значительное число публикаций, в которых рассматриваются возможности и ограничения этих подходов (см., например, Miya, Nishida, 2014; Bhattacharya et al., 2016). Некоторые пояснения следует сделать относительно ядерного гена *bindin*, а также микробиомов, ранее не использовавшихся в качестве маркёров для анализа зарождающихся и близких видов.

Ядерный ген *bindin* является одним из наиболее тщательно и всесторонне исследованных генов у морских ежей (см., например, Palumbi, 2009; Lessios, 2011). Ген экспрессируется у мужских особей в процессе сперматогенеза и кодирует главный белок акросомальной гранулы сперматозоидов, который участвует в процессах узнавания и объединения гамет у морских ежей, обеспечивая видоспецифичную адгезию гамет, т.е. служит в качестве молекулярного клея, связывающего сперматозоид с яйцеклеткой (Vacquier, Moy, 1977; Vacquier et al., 1995). Предполагается, что *bindin* играет важную роль в презиготической изоляции и видообразовании у морских ежей и эволюционирует под влиянием позитивного отбора. Действительно, показано, что эффективность оплодотворения находится в обратной зависимости от степени дивергенции кодирующей последовательности гена. Более того, выявлена существенная корреляция между несинонимичной дивергенцией гена *bindin* и несовместимостью гамет у 14 видов морских ежей (Zigler et al., 2005). Данные зависимости, однако, не обнаружены для нейтрального гена *COI*.

Все предшествующие исследования уделяли внимание только кодирующим последовательностям гена *bindin* (экзоны 1 и 2), что позволяло анализировать лишь структурный полиморфизм, отражающийся на составе аминокислотных последовательностей. Секвенирование и анализ изменчивости интрона не проводились, что препятствовало анализу паттернов и механизмов эволюции регуляторных последовательностей и пониманию взаимодействия регуляторной и структурной эволюции гена. Для воспол-

нения этого пробела мы исследовали полную последовательность гена *bindin*, включающую два экзона и интрон (Balakirev et al., 2008, 2016a).

Бактериальные симбионты, населяющие морские организмы, выполняют разнообразные жизненно важные функции для своих хозяев (см., например, Lindquist et al., 2005; Stewart et al., 2005; Huggett et al., 2006), что косвенно способствует их морфологическим, генетическим и, в конечном итоге, эволюционным изменениям (Werren, 1998; Shoemaker et al., 1999; Hurst, Werren, 2001; Bordenstein, 2003; Charlat et al., 2003; Wernegreen, 2004; Moran, 2007; Moya et al., 2008). Тесную связь между бактериями и высшими организмами иллюстрируют работы, выполненные, например, на ассоциированной с человеком бактерии *Helicobacter pylori*. При использовании её в качестве маркера для анализа эволюционной истории этносов (Wirth et al., 2004) и паттернов миграции популяций (Falush et al., 2003) получено более высокое разрешение, чем при использовании генов самого человека.

Мы предприняли исследование бактериального состава у *S. intermedius* для выявления возможного различия микробиомов между Т и С формами, поскольку предварительные данные показали отсутствие заметных генетических отличий между ними (Balakirev et al., 2008). Для обеспечения сравнительного анализа мы исследовали микробиом у родственного вида морского ежа *Mesocentrotus nudus* (A. Agassiz, 1863). Мы не намеревались полностью охарактеризовать разнообразие бактериальных симбионтов у морских ежей, что потребовало бы использование “универсальных” бактериальных праймеров и больших объёмов клонирования. Поэтому мы ограничили наш анализ бактериями, являющимися важными патогенами для морских ежей. Известно, что бактерии рода *Tenacibaculum* (Suzuki et al., 2001) вызывают заболевание пятнистости гонад у *S. intermedius* (Tajima et al., 1997a, b). Мы разработали праймеры, локализованные в консервативной области бактериального гена 16S rRNA у представителей рода *Tenacibaculum* и родственных групп, и использовали их для выявления и анализа разнообразия симбионтов в естественных поселениях морских ежей *S. intermedius* и *M. nudus* (см. ниже). Ген 16S rRNA наиболее часто используется для идентификации и классификации бактерий (Woo et al., 2008; Watts et al., 2017), а также для анализа микробиома (Blackall et al., 2015; Hugerth, Andersson, 2017; Kuntz, Gilbert, 2017).

Материал и методика

Образцы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* собраны В.А. Павлючковым (ТИНРО-Центр, Владивосток) близ мыса Золотой (северное Приморье, Японское море, 46°15'086" с.ш., 138°06'646" в.д.). Для анализа бактериальных симбионтов дополнительно собраны образцы *S. intermedius* из б. Ольга (44°15'773" с.ш., 135°47'630" в.д.) и близ мыса Поворотный (42°49'530" с.ш., 133°44'730" в.д.). Три исследованные локальности охватывают более 700 км побережья северного Приморья. Морфологические формы собирали с глубины 5–10 м (форма Т) и 15–20 м (форма С). Образцы невооружённого (чёрного) морского ежа *Mesocentrotus nudus* собирали в б. Лазурная (южное Приморье, Уссурийский залив, Японское море, 43°11'28" с.ш., 132°07'14" в.д.) на глубине 2–3 м. Методы выделения ДНК, амплификации, клонирования и секвенирования генов, а также математические методы анализа полиморфизма, дивергенции, рекомбинации и отбора подробно рассмотрены ранее (Балакирев, Айала, 2004б; Balakirev, Ayala, 2003b, c, 2004b; Balakirev et al., 2002, 2011, 2012a, b, 2013, 2016a). Основные этапы анализа коротко приводятся ниже.

Общую геномную ДНК выделяли из фиксированных в этаноле тканей гонады ежей с помощью наборов DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Для разработки праймеров использовали программы PrimerSelect (Lasergene, DNASTAR, Inc.) и mitoPrimer v. 1 (Yang et al., 2011). Амплификацию проводили согласно общепринятым методам (ссылки приведены выше). Фрагмент гена *COI* (1056 пар нуклеотидов, п.н.) амплифицировали с праймерами 5'-acactttatttgattttgg-3' (прямой праймер) и 5'-cccattgaaagaacgtagtgaaagtg-3' (обратный праймер) (Lee, 2003). Последовательность включает область мтДНК, охватывающую 352 кодона гена *COI*, что соответствует позициям 5854–6909 мт генома *S. purpuratus* (Jacobs et al., 1988). Фрагмент ядерного гена *bindin* (1809 п.н., с учётом филогенетических вставок и выпадений) амплифицировали с праймерами 5'-tctgacgattcgaaaagaggag-3' (прямой праймер) и 5'-attagcgtctatatctagttag-3' (обратный праймер). Для разработки праймеров использовали нуклеотидные последовательности гена *bindin* у морских ежей *S. franciscanus* (M59490) и *S. purpuratus* (M14487). Амплифицированный фрагмент *bindin* включает экзон 1 (237 п.н.), интрон (951 п.н.) и экзон 2 (621 п.н.) и кодирует полный зрелый белок *bindin*. Для анализа микробиома амплифицировали, клонировали и секвенировали фрагмент

(1360 п.н.) гена 16S rRNA у 49 особей *S. intermedius* и девяти особей *M. nudus* с праймерами 5'-cgtaacgcgtatacaatctgcctt-3' (прямой праймер) и 5'-agccctagttaccagttttaccct-3' (обратный праймер). Эти праймеры мы разработали на основании консервативных областей гена 16S rRNA у бактерий рода *Tenacibaculum* (Suzuki et al., 2001).

ПЦР (полимеразная цепная реакция) амплификация выполнялась в конечном объёме 25 мкл с использованием Eppendorf, Mastercycler Gradient и полимеразы TaKaRa Ex Taq™ (Takara Biotechnology Co., Ltd.) по следующей программе: начальная инкубация 5 мин при 95°C, денатурация 30 с при 95°C, отжиг 30 с при 54–61°C (в зависимости от Tm конкретной пары праймеров) и элонгация 1–3 мин при 72°C (в зависимости от длины секвенируемой последовательности). После окончания 32-го цикла ПЦР проводили дополнительную стадию финальной элонгации в течение 7–10 мин при 72°C. Продукты реакций для гена *bindin* клонировали с помощью наборов TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Для каждого клона определяли обе цепи ДНК. Последовательности гена *COI* и полных митохондриальных геномов получали методом “прямого” секвенирования (без клонирования фрагментов ПЦР).

Секвенирование продуктов ПЦР осуществляли методом флуоресцентно меченых терминирующих аналогов трифосфатов (2'-3'-дидезоксинуклеозидтрифосфаты, Big Dye™, Applied Biosystems) и разделяли с использованием ДНК-анализатора ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, USA). Для предотвращения возможных ошибок, возникающих в процессе амплификации и секвенирования, определяли нуклеотидные последовательности обеих цепей ДНК, полученных в результате двух независимых амплификаций. Массивные объёмы амплификаций и секвенирования выполнялись в лаборатории McLab (USA, <https://www.mclab.com>). Амплификации проводили с применением высокоточной ДНК-полимеразы MCLAB's 2X BlueStar™ PCR Master Mix (<http://www.mclab.com/2x-BlueStar-PCR-Master-Mix.html>; Cat#: BSPM-100). Реакционные смеси инкубировали 10 мин при 98°C и подвергали 36 циклам денатурации, отжига и элонгации: 10 с при 98°C, 15 с при 61°C, 60 с при 72°C и завершали финальной элонгацией в течение 5 мин при 72°C.

Сборку фрагментов митохондриальных геномов осуществляли с помощью программы SeqMan (Lasergene, DNASTAR, Inc.). Множественное выравнивание последовательностей выполняли с использованием про-

грамм CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) и MUSCLE (Edgar, 2004) и уточняли вручную в программе PROSEQ v. 2.9 (Filatov, 2002). Анализ полиморфизма и дивергенции проводили с использованием программ PROSEQ v. 2.9 (Filatov, 2002) и DnaSP v. 5 (Librado, Rozas, 2009). Распределение полиморфизма и дивергенции исследовали посредством метода “скользящих окон” (Hudson, Kaplan, 1988). Филогенетические реконструкции осуществляли при помощи программы MEGA v. 6 (Tamura et al., 2013). Построение филогенетических деревьев на основе выбранной модели выполняли методами присоединения ближайших соседей (Neighbour-Joining; Saitou, Nei, 1987) и максимального правдоподобия (Maximum Likelihood; Felsenstein, 1981). Детали байесовского анализа (MrBayes, v. 3.2; Ronquist et al., 2012) приведены в предыдущих наших работах (Balakirev et al., 2012a; Balakirev, 2019). Оптимальные модели для построения деревьев подбирали на основании информационных критериев BIC (информационный критерий Байеса; Schwarz, 1978) и AIC (информационный критерий Акаике; Akaike, 1974) с помощью программы jModelTest 2.1.4 (Darriba et al., 2012). Достоверность топологий оценивали посредством бутстрэп-теста (500–1000 репликаций). В качестве внешних групп применяли нуклеотидные последовательности близких видов морских ежей из генного банка (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Неравновесие по сцеплению между полиморфными сайтами оценивали на основе точного теста Фишера (Lewontin, 1964, 1995) с поправкой Бонферрони на множественные сравнения для снижения вероятности ложноположительных результатов. Анализ рекомбинаций проводили при помощи ряда методов, реализованных в программе RDP4 (Martin et al., 2015), и метода минимального числа рекомбинационных событий (Hudson, Kaplan, 1985), реализованного в программе DnaSP. Химерные последовательности (ложные рекомбинанты) гена 16S rRNA у бактериальных симбионтов идентифицировали с применением программы Bellerophon (Huber et al., 2004). Популяционную рекомбинационную частоту анализировали при помощи пермутационного метода МакВина и соавторов (McVean et al., 2002), основанного на коалесцентном подходе Хадсона (Hudson, 2001). Отклонения от нейтральных ожиданий оценивали с использованием ряда тестов (Hudson et al., 1987, 1994; Tajima, 1989; McDonald, Kreitman, 1991; Fu, Li, 1993; McDonald, 1996, 1998; Kelly, 1997; Depaulis, Veuille, 1998; Wall, 1999). Моделирование процесса коалесценции (Hudson, 1983, 1990, 2002)

выполняли с помощью программ DnaSP и PROSEQ для оценки статистических вероятностей наблюдаемых значений показателей D (Tajima, 1989), Z_{ns} (Kelly, 1997), B и Q (Wall, 1999), а также для оценки доверительных интервалов значений нуклеотидного разнообразия.

Нуклеотидные последовательности полных митохондриальных геномов, а также генов *COI* и *bindin* размещены в генном банке (NCBI, GenBank; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под инвентарными номерами KY964299–KY964300 (митохондриальные геномы), EU003202–EU003213 (*COI*), EU700089–EU700091 (*COI*), KP774723–KP774781 (*COI*), EU003190–EU003201 (*bindin*), EU700092–EU700094 (*bindin*) и KP774782–KP774794 (*bindin*). Нуклеотидные последовательности гена 16S rRNA бактериальных симбионтов морских ежей размещены в генном банке под следующими инвентарными номерами: EU003214–EU003229, EU432412–EU432475 и EU626562–EU626721.

Результаты и обсуждение

Изменчивость генов и видовая идентичность Strongylocentrotus intermedius

На начальном этапе исследования мы секвенировали фрагменты генов *COI* и *bindin* у 12 особей морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* (по шесть особей для Т и С форм; Balakirev et al., 2008). Для получения более устойчивых оценок показателей полиморфизма, рекомбинации и дивергенции, а также отклонений от нейтральных ожиданий мы дополнительно секвенировали 13 последовательностей гена *bindin* и 47 последовательностей гена *COI* (Balakirev et al., 2016a). Кроме этого мы секвенировали полные митохондриальные геномы у двух особей, представляющих Т и С морфологические формы *S. intermedius* (Balakirev et al., 2017), а также включили в анализ все имеющиеся в генном банке последовательности гена *bindin* у близких видов ежей рода *Strongylocentrotus* (Balakirev et al., 2016a, 2017).

На рисунке 2 приведены выявленные полиморфные сайты. Для гена *COI* обнаружено 11 сегрегирующих сайтов (два синглтона и девять информативных сайтов). Все замены – синонимичные. Изменчивости длины последовательностей (инделы), выражающейся в добавлении (инсерции, вставки) или выпадении (делеции) нуклеотидов, в сравнении с референтной последовательностью, не обнаружено. Для гена *bindin* выявлено 40 поли-

морфных сайтов. В кодирующей области (экзоны 1 и 2) обнаружено шесть синглтонов (три синонимичных и три несинонимичных) и два информативных сайта (один синонимичный и один несинонимичный). В интроне выявлено 29 сегрегирующих сайтов (13 синглтонов и 16 информативных), две вставки и семь выпадений (рис. 2). Два полиморфных сайта, ассоциированные с инделами (позиции 843 и 1062), исключены из дальнейшего анализа.

<i>COI</i>	<i>bindin</i>
	11 1 1111111
12666788899	11122333444 455555 677 7788 88 88 8 999999900 0 0113455
48034446808	57714688255 912468 657 9912 45 88 9 134699914 5 6372600
72698704261	03994445217 755823 005 4592 37 37 3 064945823 8 2736505
T-18 <u>AAGGTA</u> AAAA	<u>CGACCTGCGC</u> ▲1TTTGA† CA† TAA† CA5A▼1† СТАТCAGT▼2† ТАСТАТА
	** * *
T-7AC.A..C. ▲7-.T...T
T-8	AAGTTA..A.† CAC.G▲2.C▲3..C. T† G‡ . .AC..CA.‡ . CGTGGC.
T-21 ▲4-. ‡GT....
T-35 ..GAACGGCG.GT....
T-36 ..GAACGGCG.G	...TTAAA... .A.AG. . . . ACC. .† G. ▲6AACC..... ▲7-GT....
C-33 ..AACGGCG..	...TTAAA... .A..G. . . . ACC. .† G. . AAC.A..C. ▲7-.T....
C-35A.T....
C-41 ..GAACGGCG.GT...T
C-42T....
C-43 ..GAACGGCG.GT....
C-44 .G..... T.T...T

Рис. 2. Полиморфизм нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *bindin* у морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Типичная (Т) и седая (С) формы *S. intermedius*, цифры обозначают номера исследуемых образцов морских ежей. Положение сегрегирующих сайтов, а также начало инсерций или делеций отмечено цифрами над референтной последовательностью (Т-18). Нуклеотиды пронумерованы от начала секвенированных последовательностей, соответствующего позиции 5809 для гена *COI* (Jacobs et al., 1988) и 865 для гена *bindin* (Gao et al., 1986). Кодирующие области подчеркнуты ниже референтной последовательности. Аминокислотные полиморфные сайты отмечены звёздочками. Точками отмечены нуклеотиды, идентичные референтной последовательности. Дефисы представляют делетированные нуклеотиды. ▲ обозначает делецию; † обозначает отсутствие делеции; ▼ указывает на инсерцию; ‡ отмечает отсутствие инсерции. ▲1 – делеция нуклеотида А; ▲2 – делеция 16 нуклеотидов CCGTGACTCGGGTCTG; ▲3 – делеция нуклеотида Т; ▲4 – делеция 41 нуклеотида TTGCCGTTACCAAGGTTTTGCCTGAATGAA-TTTTTTCTTTA; ▲5 – делеция нуклеотида Т; ▲6 – делеция нуклеотида Т; ▲7 – делеция 17 нуклеотидов AGTGCTCAGTTTTTATC; ▼1 – инсерция нуклеотида А; ▼2 – инсерция нуклеотидов ТА. По: Balakirev et al. (2008).

Протяжённая вставка (539 п.н.) в интроне гена *bindin* выявлена у *S. droebachiensis* (Balakirev et al., 2016a). Эта вставка фланкируется 18-нуклеотидным обратным повтором (ttaaagggtactatgtccc) и, вероятно, представляет подвижный генетический элемент. Интересно, что подвижные генетические элементы также выявлены в интроне гена *bindin* у мор-

ских ежей рода *Tripneustes* (148 п.н., Bronstein et al., 2016) и устрицы *Crassostrea gigas* (3,6 тыс. п.н., Мой, Vacquier, 2008). Другая характерная область гена *bindin* располагается в конце экзона 2 и включает 21-нуклеотидный повторяющийся мотив (Minor et al., 1991; Biermann, 1998). Число повторов в этой области варьирует от двух у *S. franciscanus* (Minor et al., 1991) до 12 у *S. pallidus* (Biermann, 1998). Мы выявили 20 повторов во втором экзоне гена *bindin* у *S. intermedius*. Этот регион мы исключили из последующего анализа вследствие того, что для повторяющихся последовательностей в большинстве случаев невозможно установить ортологичные (разделённые в процессе видообразования) и паралогичные (разделённые посредством дупликации) отношения.

На рисунке 3 представлены деревья, построенные на базе генов *COI* и *bindin*. Морфологические формы *S. intermedius* располагаются на деревьях смешанно и не образуют дискретной видовой кластеризации. Для гена *COI* $F_{st} = -0,0570$ ($P = 0,7587$); $K_{st} = -0,0173$ ($P = 0,5561$); суммарная дивергенция (D_{xy}) составила 0,45%. Для гена *bindin* $F_{st} = -0,0515$ ($P = 0,7440$); $K_{st} = -0,0157$ ($P = 0,7360$); суммарная дивергенция составила 0,65%. При анализе данных генного банка получены значительно более высокие средние значения дивергенции (6,51% для гена *COI* и 2,43% для гена *bindin*) для видов *S. intermedius*, *S. purpuratus*, *S. pallidus*, *S. polyacanthus* и *S. droebachiensis*. Эти результаты указывают на то, что Т и С формы *S. intermedius* не являются различными биологическими видами.

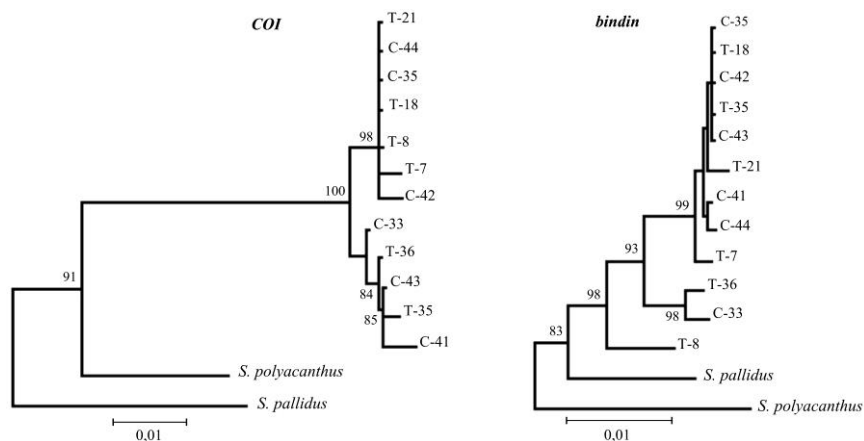


Рис. 3. Бескорневое дерево нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *bindin* у морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Деревья построены с использованием метода присоединения ближайших соседей (Saitou, Nei, 1987) и двухпараметрических дистанций Кимуры (Kimura, 1980). Бутстрэп-значения получены на базе 10000 репликаций. Последовательности генов *COI* и *bindin* *S. polyacanthus* и *S. pallidus* использованы в качестве внешней группы. Остальные пояснения: см. рис. 2. По: Balakirev et al. (2008) с изменениями.

Показатели генетического разнообразия и дивергенции

Оценки генетического разнообразия *Strongylocentrotus intermedius* для суммарных данных, а также отдельно для морфологических форм и гаплогрупп приведены в табл. 1. Значения суммарной изменчивости незначительно различаются для генов *bindin* ($\pi_{\text{total}} = 0,0067$) и *COI* ($\pi_{\text{total}} = 0,0048$), но уровень синонимичного полиморфизма в 2,8 раза ниже для гена *bindin* ($\pi_{\text{syn}} = 0,0067$), чем для гена *COI* ($\pi_{\text{syn}} = 0,0188$). Уровень изменчивости по гену *COI* не различается между Т ($\pi_{\text{total}} = 0,0049$) и С ($\pi_{\text{total}} = 0,0053$) формами ($P > 0,05$) как на исходной (Balakirev et al., 2008), так и расширенной (Balakirev et al., 2016a) выборке последовательностей. Однако уровень изменчивости гена *bindin* существенно отличается у Т и С форм, особенно по синонимичным сайтам: для формы Т $\pi_{\text{syn}} = 0,0113$, что в 4,52 раза больше, чем для формы С ($\pi_{\text{cod}} = 0,0025$; табл. 1; рис. 4). Различие изменчивости между морфологическими формами по гену *bindin* статистически существенно ($P < 0,025$) при коалесцентном моделировании с популяционной частотой рекомбинации 0,005, полученной с помощью метода МакВина с соавторами (McVean et al., 2002). Различие между формами по уровню изменчивости гена *bindin* сохраняется и при увеличении выборки последовательностей (Balakirev et al., 2016a). Данные по уровню полиморфизма согласуются со значениями дивергенции, которые несколько выше по гену *bindin* ($D_{xy} = 0,0065$), чем по гену *COI* ($D_{xy} = 0,0048$) (различия не существенны, что, вероятно, объясняется малочисленностью выборки). Таким образом, ген *bindin* выявляет статистически существенные различия по уровню полиморфизма для Т и С форм, а также заметные различия по дивергенции между ними. Однако по гену *COI* нет различий между формами ни по уровню полиморфизма, ни по дивергенции.

Суммарная дивергенция между *S. intermedius* и *S. pallidus* в 2,97 раза выше для *COI*, чем для *bindin* (табл. 1). Отношение дивергенции к полиморфизму (K/π) имеет высокое значение для гена *COI* (17,35), но в 4,15 раза ниже (4,18) для гена *bindin*. Эти результаты показывают, что кодирующая область гена *COI* эволюционирует под значительным давлением негативного отбора, которое, однако, заметно ниже для гена *bindin*. Отношение K/π существенно различается в кодирующей области и интроне гена *bindin*. Как и ожидается, селективные ограничения заметно выше в кодирующей области ($K/\pi = 8,0$) в сравнении с интроном ($K/\pi = 3,08$).

Таблица 1

**Нуклеотидное разнообразие генов *COI* и *bindin* у морского ежа
*Strongylocentrotus intermedius***

Ген	Форма Т	Форма С	Гапло- группа 1	Гапло- группа 2	Суммарно
<i>COI</i>	$N = 6$ $S = 10$	$N = 6$ $S = 10$	$N = 7$ $S = 2$	$N = 5$ $S = 2$	$N = 12$ $S = 11$
π_{syn}	0,0192	0,0210	0,0021	0,0030	0,0188
π_{nsyn}	0	0	0	0	0
π_{total}	0,0049	0,0053	0,0005	0,0008	0,0048
K_{total}	0,0832	0,0834	0,0823	0,0847	0,0833
<i>bindin</i>	$N = 6$ $S = 35$	$N = 6$ $S = 20$	$N = 9$ $S = 8$	$N = 3$ $S = 23$	$N = 12$ $S = 38$
π_{syn}	0,0113	0,0025	0	0,0147	0,0067
π_{nsyn}	0,0031	0,0013	0,0016	0,0047	0,0021
π_{cod}	0,0057	0,0015	0,0012	0,0071	0,0035
π_{ncod}	0,0117	0,0067	0,0018	0,0122	0,0091
π_{total}	0,0097	0,0050	0,0016	0,0104	0,0067
K_{total}	0,0276	0,0288	0,0276	0,0280	0,0280

Примечание. N – число нуклеотидных последовательностей. S – число полиморфных сайтов. π – среднее число нуклеотидных различий на сайт для всех пар последовательностей (Nei, 1987, с. 256), вычисленное для синонимичных (π_{syn}), несинонимичных (π_{nsyn}), кодирующих (π_{cod}), не кодирующих (π_{ncod}) и всех (π_{total}) сайтов. K_{total} – средняя доля нуклеотидных различий между *S. intermedius* и *S. pallidus*, рассчитанная с использованием поправки Джукса и Кантора (Jukes, Cantor, 1969) для суммарного числа сайтов. Нуклеотидная изменчивость рассчитана для суммарных данных (столбец «Суммарно»), а также отдельно для морфологических форм Т и С и гаплогрупп 1 и 2 (см. раздел «Результаты и обсуждение»). Сегрегирующие сайты, ассоциированные с инсерциями, делециями и повторяющейся последовательностью гена *bindin*, исключены из расчетов генетического разнообразия и дивергенции. По материалам Balakirev et al. (2008) с изменениями.

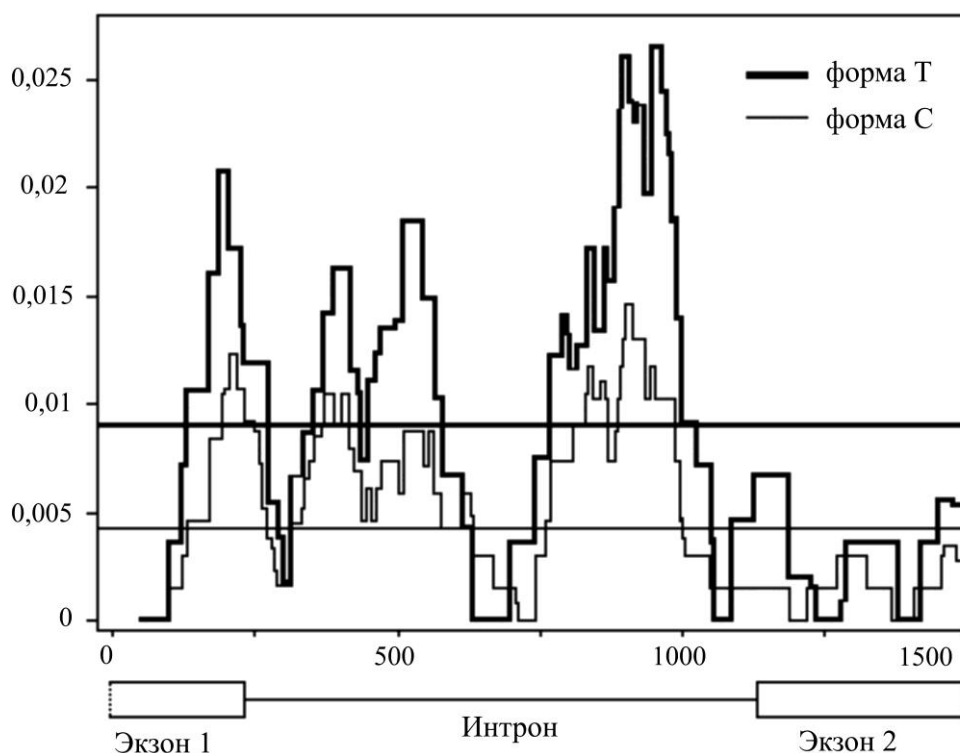


Рис. 4. Распределения нуклеотидного разнообразия (π) на протяжении гена *bindin* для Т и С форм морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Средние значения нуклеотидного разнообразия обозначены тонкой (форма С) и жирной (форма Т) горизонтальными линиями. В основании графика приведена схема гена *bindin*.

Структура гаплотипов

Выявлена существенная гаплотипная структура для генов *COI* и *bindin*, не связанная с морфологическими формами *Strongylocentrotus intermedius* (рис. 2, 3; табл. 1). Для гена *COI* имеется два набора гаплотипов (гаплогрупп). Первый набор включает последовательности С-33, С-41, С-43, Т-35 и Т-36; второй набор включает последовательности С-35, С-42, С-44, Т-7, Т-8, Т-18 и Т-21. Данные гаплогруппы различаются девятью синонимичными замещениями в позициях 282, 606, 639, 648, 747, 840, 864, 882 и 981 (рис. 2) и имеют существенную бутстрэп-поддержку (98%; рис. 3). Различие между гаплогруппами статистически высоко значимо ($F_{st} = 0,6706$, $P = 0,0016$; $K_{st} = 0,2794$, $P = 0,0016$), однако уровень полиморфизма между ними существенно не различается ($\pi = 0,0005$ против $\pi = 0,0009$; табл. 1). Суммарная дивергенция (D_{xy}) между митохондриальными гаплогруппами составляет 0,0084.

Иная структура гаплотипов обнаружена для гена *bindin* (рис. 2, 3; табл. 1). Имеется набор из девяти схожих последовательностей (С-35, С-41, С-42, С-43, С-44, Т-18, Т-21, Т-35 и Т-8; гаплогруппа 1), отличаю-

щийся от второго, более гетерогенного набора гаплотипов (С-33, Т-36 и Т-8; гаплогруппа 2) семью однонуклеотидными замещениями и фиксированной делецией (позиции 219, 244, 364, 515, 562, 819, 857, 883; рис. 2). Более того, три из четырёх несинонимичных замещений (позиции 173, 179 и 1505) сегрегируют в пределах каждой гаплогруппы, но не между ними (рис. 2; см. также Balakirev et al., 2016a). Различие между двумя гаплогруппами статистически существенно ($F_{st} = 0,8047$, $P = 0,0149$; $K_{st} = 0,2780$, $P = 0,0149$; суммарная дивергенция $D_{xy} = 0,0131$). Значительные расхождения между ними наблюдаются и по уровню полиморфизма ($\pi = 0,0016$ против $\pi = 0,0104$; $P < 0,01$; табл. 1). Гаплогруппа 2, вероятно, является предковой, что подтверждается наличием общих индел с двумя другими видами морских ежей, *S. pallidus* и *S. droebachiensis* (Balakirev et al., 2016a), а также уровнем изменчивости, который в 6,5 раза выше у гаплогруппы 2, чем у гаплогруппы 1 (табл. 1).

Дивергентная структура гаплотипов выявлена для многих генов, например у растения *Arabidopsis* (Du et al., 2008), плодовой мушки *Drosophila* (Teeter et al., 2000; Balakirev et al., 2002, 2003, 2011; Balakirev, Ayala, 2003b, c, 2004b) и других эукариот, включая морских ежей (Metz, Palumbi, 1996; Zigler et al., 2003; McCartney, Lessios, 2004; Geyer, Lessios, 2009; Calderón et al., 2009, 2010; Pujolar, Pogson, 2011). Предполагается, что высокая поляризация гаплотипов (диморфная структура) отражает демографические и/или адаптивные процессы с ограниченной рекомбинацией (см., например, Hudson et al., 1994, 1997; Aguadé, 2001; Haubold et al., 2002). Действительно, мы обнаружили низкие частоты рекомбинации для генов *COI* и *bindin*. Метод Хадсона и Каплан (Hudson, Kaplan, 1985) выявил одно рекомбинантное событие в пределах гена *COI* в интервале 936–981 и два рекомбинантных события в пределах гена *bindin* в интервалах 1286–1370 (интрон) и 1513–2184 (интрон – экзон II). Популяционная рекомбинационная частота ($\rho = 4N_e r$, где N_e – эффективная численность популяции и r – частота рекомбинации на нуклеотидный сайт на генерацию), рассчитанная с использованием метода МакВина и соавторов (McVean et al., 2002), составила 0,002 ($Lk = -13658,48$) для *COI* и 0,005 ($Lk = -25906,56$) для *bindin*. Низкие значения рекомбинации для гена *bindin* выявлены и у других видов морских ежей: представителей родов *Echinometra* (Geyer, Lessios, 2009), *Strongylocentrotus* (Pujolar, Pogson, 2011; Balakirev et al., 2016a), *Heliocidaris* (Zigler et al., 2003) и *Paracentrotus* (Calderón et al.,

2009). Таким образом, рекомбинация обнаружена у двух исследованных генов *S. intermedius*, однако частота рекомбинационных событий менее выражена в сравнении, например, с некоторыми генами *Drosophila melanogaster* (Balakirev et al., 2003; Balakirev, Ayala, 2003b, c; 2004a, b) или геном *bindin* у устрицы *Crassostrea gigas* (Moy et al., 2008).

Интересные примеры высокой внутривидовой дивергенции митохондриальных гаплотипов, существенно превышающей типичные межвидовые значения, описаны у ряда беспозвоночных и позвоночных животных (см., например, Jaarola, Searle, 2004; Fernández et al., 2006; Tominaga et al., 2009; Hogner et al., 2012; Mashkaryan et al., 2013; Pavlova et al., 2013; Andriollo et al., 2015; von Beeren et al., 2015; Toon et al., 2016). У дождевых червей *Lumbricus rubellus* обнаружено пять дивергентных (значения p дистанций доходит до 16%) митохондриальных гаплотипов в симпатрии, однако различий по ядерным генам не выявлено (Giska et al., 2015). Экстремально высокие значения дивергенции мтДНК, достигающие при попарных сравнениях 20,80 и 23,68%, обнаружены у двух видов щетинкочелюстных, *Sagitta cephaloptera* и *S. elegans* (Marlétaz et al., 2017). У третьего исследованного вида, *S. setosa*, значения внутривидовых различий не превышали 0,91%, т.е. оказались в пределах значений, обычно наблюдаемых для внутривидовой изменчивости. Важно, что по ядерным генам значения дивергенции в пределах *S. elegans* (и в меньшей степени *S. cephaloptera*) оказались значительно ниже, чем межвидовые дивергенции, характерные для щетинкочелюстных, что указывает на отсутствие криптических видов в исследованной группе. Значения внутривидовой изменчивости мтДНК у щетинкочелюстных сопоставимы, например, с уровнем дивергенции между человеком *Homo sapiens* и утканосом *Ornithorhynchus anatinus*, представляющим одну из самых ранних ветвей млекопитающих (Marlétaz et al., 2017).

Столь же интересно обратное явление – аномально низкие значения межвидовой дивергенции мтДНК, выявленные у несомненно разных биологических видов, демонстрирующих достаточно высокий уровень межвидовой дивергенции по ядерным генам. Наиболее вероятной причиной данного явления оказывается интрогрессия, которая несимметрично затрагивает митохондриальные и ядерные гены (Chan, Levin, 2005; Toews, Brelsford, 2012; Sloan et al., 2017). В литературе описаны многочисленные примеры массивной интрогрессии, достигающей степени переноса полного митохондриального генома (“mitochondrial capture”) при отсутствии

межвидовых передвижений ядерных генов (Bernatchez et al., 1995; Bachtrog et al., 2006; Darling, 2011; Sequeira et al., 2011; Zieliński et al., 2013; Pons et al., 2014; Good et al., 2015; Bronstein et al., 2016; Sloan et al., 2017; Ferreira et al., 2018).

Противоречивые генеалогии митохондриальных и ядерных генов – достаточно частое явление (18–23% у животных; Funk, Omland, 2003; Toews, Brelsford, 2012), что является очевидной проблемой для ДНК-штрихкодирования, демонстрирующей критическую важность использования мультилокусных ядерных данных для объективной оценки криптического разнообразия и делимитации видов.

Неравновесие по сцеплению

Для гена *COI* все возможные попарные ассоциации полиморфных сайтов находятся в полном неравновесии по сцеплению ($P < 0,001$). Все ассоциации остаются существенными с поправкой Бонферрони. Паттерны неравновесия по гену *COI* идентичны отдельно для Т и С форм (рис. 5, А, Б). В пределах гена *bindin* статистически существенное неравновесие выявлено для 233 из 351 (66,36%) попарных сравнений. С поправкой Бонферрони на множественные сравнения число существенных ассоциаций снижается до 29 (8,28%). Отдельно для Т и С форм *Strongylocentrotus intermedius* паттерны неравновесия по сцеплению для гена *bindin* отчётливо различаются (рис. 5, А, Б). В обоих случаях число существенных ассоциаций снижается, но степень снижения существенно более выражена для С формы (36 существенных ассоциаций, что в 6,47 раза меньше в сравнении с полной выборкой), чем для Т формы (161 существенных ассоциаций, что в 1,45 раза меньше в сравнении с полной выборкой). Данный результат демонстрирует различную архитектуру изменчивости по гену *bindin* для Т и С форм у *S. intermedius*.

В пределах *bindin* обнаружена высокая степень ассоциации между интронными сайтами (Balakirev et al., 2016a). Кластеры статистически существенного неравновесия по сцеплению, локализующиеся преимущественно в интронах, были неоднократно обнаружены у *Drosophila* (см., например, Schaeffer, Miller, 1993). Исследования Кирби и Стефана (Kirby, Stephan, 1995) показали, что блоки неравновесия, располагающиеся в интроне локуса *Adh* у *D. pseudoobscura*, обусловлены действием эпистатического отбора, сохраняющего вторичную структуру предшественника мРНК. Лежащий в основе механизм действия эпистатического отбора ос-

новывается на модели компенсаторных приспособительных взаимодействий (Kimura, 1985). В соответствии с этой моделью предполагается, что мутации, возникающие в спиральных РНК, индивидуально являются повреждающими, но становятся нейтральными в определённых комбинациях. Согласно расчётам Стефана (Stephan, 1996), скорость компенсаторной эволюции существенно снижается на расстоянии более чем 100 нуклеотидов, что соответствует полученным нами результатам. Действительно, расстояние между интронными сайтами составляет менее чем 100 нуклеотидов (рис. 2). Таким образом, интронная последовательность гена *bindin*, вероятно, эволюционирует под влиянием эпистатического отбора, направленного на поддержание вторичной структуры предшественника мРНК.

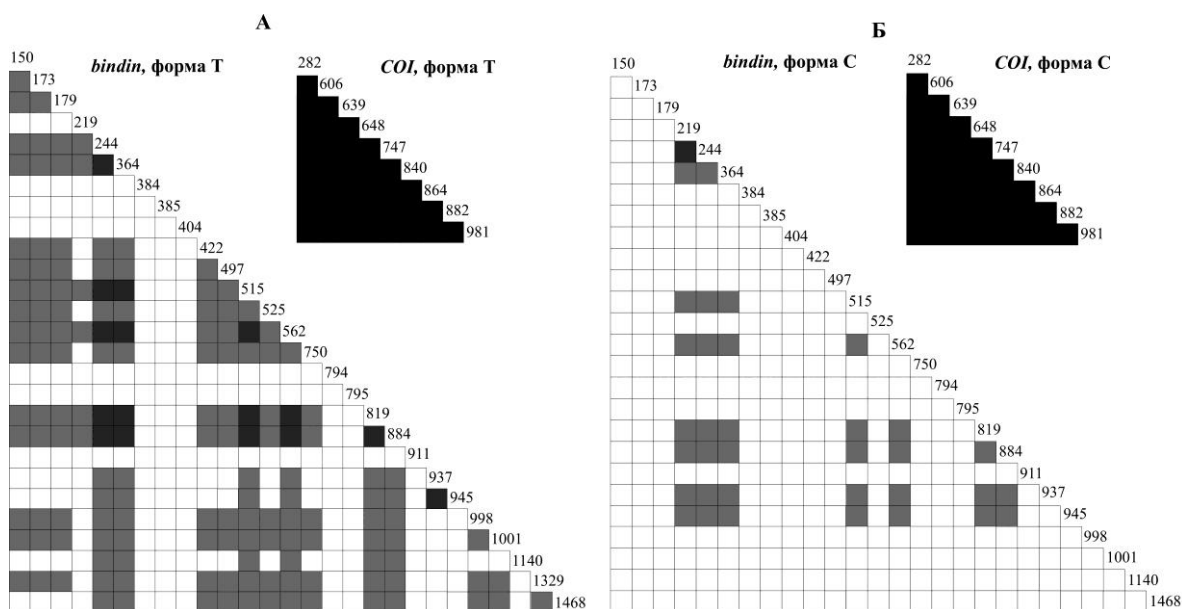


Рис. 5. Точный тест Фишера неслучайных ассоциаций между парами полиморфных сайтов для генов *bindin* и *COI* у двух морфологических форм морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Неравновесие по сцеплению рассчитано отдельно для формы Т (А) и формы С (Б). Каждый квадрат в матриксе представляет сравнение двух полиморфных сайтов. Синглтоны исключены из анализа. Позиции сегрегирующих сайтов приведены на диагонали. Ассоциации, существенные после использования поправки Бонферрони на множественные сравнения, отмечены чёрным цветом. Квадрат серого цвета: $0,01 < P < 0,05$; квадрат тёмно-серого цвета: $0,001 < P < 0,01$. Неокрашенные квадраты обозначают отсутствие существенных ассоциаций.

Мы анализировали взаимоотношение между неравновесием по сцеплению (выраженному в показателе D' – нормализованном эквиваленте D , см. Lewontin 1964) и расстоянием между сайтами, используя метод МакВина с соавторами (McVean et al., 2002), и оценивали существенность коэффици-

ентов корреляции Пирсона (r) посредством 100 000 пермутаций. Для гена *COI* корреляция несущественна ($r = +0,0683$, $P = 0,894$), однако для гена *bindin* выявлено существенное снижение уровня неравновесия по сцеплению при увеличении расстояния между сайтами ($r = -0,1316$, $P = 0,008$). Эти данные согласуются с выявленной рекомбинацией для гена *bindin* и её крайне слабой выраженностью для гена *COI* (см., например, Awadalla et al., 1999).

Паттерны неравновесия по сцеплению и рекомбинации различны для двух исследованных генов. Для гена *COI* единообразное распределение существенных ассоциаций указывает на присутствие двух контрастных наборов нуклеотидных последовательностей, находящихся в полном неравновесии по сцеплению (рис. 5). Это соответствует распределению изменчивости и строго диморфной структуре гаплотипов по гену *COI* (табл. 1). Такой генетический паттерн, вероятно, отражает множественные исторические миграции из генетически различающихся источников с последующим смешением. Очень низкая рекомбинация способствует длительному сохранению во времени диморфной гаплотипной структуры. Таким образом, ген *COI* информативен для выяснения демографической истории вида. Для гена *bindin* паттерны неравновесия по сцеплению не информативны для выяснения истории вида (в связи с наличием рекомбинации), однако контрастные распределения существенных ассоциаций определяют ценность этого гена для исследования адаптивной эволюционной динамики морфологических форм *S. intermedius*.

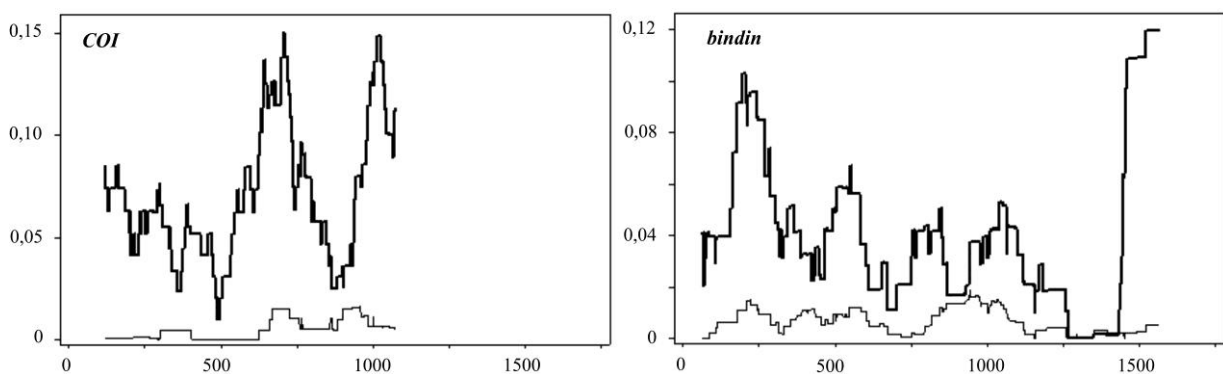


Рис. 6. Распределение нуклеотидного разнообразия (π , тонкая линия) и дивергенции (K , жирная линия) для генов *COI* и *bindin* у *Strongylocentrotus intermedius*. Размер окна – 100 нуклеотидов, инкремент – один нуклеотид.

Для расчёта дивергенции использовались последовательности генов *COI* и *bindin* *S. polyacanthus* (AF077317).

Распределение изменчивости и тесты на нейтральность

Распределение изменчивости у *Strongylocentrotus intermedius* неравномерно на протяжении секвенированной области генов *COI* и *bindin* (рис. 6). Мы исследовали гетерогенность распределения полиморфизма и дивергенции на протяжении нуклеотидных последовательностей *COI* и *bindin* с использованием подхода МакДональда (McDonald, 1996, 1998) и оценивали её существенность посредством Монте-Карло моделирования коалесцентного процесса, инкорпорирующего рекомбинацию. На основании 10 000 модельных экспериментов с параметрами рекомбинации, варьирующими от 1 до 64, тесты не существенны для гена *COI* (показатель $G_{max} = 9,89$, $P = 0,225$; показатель $G_{mean} = 2,06$, $P = 0,313$). Это означает, что выраженные пики дивергенции для *COI* (рис. 6) сопровождаются пиками полиморфизма в соответствии с нейтральными ожиданиями. Для гена *bindin* выявлена существенная гетерогенность в распределении полиморфизма и дивергенции (показатель $G_{max} = 22,22$, $P = 0,011$; показатель $G_{mean} = 6,31$, $P = 0,019$). Наиболее выраженные значения теста МакДональда показывают, что на протяжении гена *bindin* имеются области несоответствия между внутривидовым полиморфизмом и межвидовой дивергенцией. Такие значительные несоответствия отражают возможное действие позитивного отбора. Для выяснения потенциальных мишеней позитивного отбора мы построили графики отношений полиморфизма к дивергенции (рис. 7). Два региона гена *bindin* демонстрируют наиболее высокие уровни средних и максимальных значений показателя G: 1) в начале экзона 1, что совпадает с областью низкого отношения полиморфизма к дивергенции; 2) в интроне, что совпадает с регионом высокого отношения полиморфизма к дивергенции (рис. 6, 7). Регион низкого отношения полиморфизма к дивергенции центрирован на экзон 1 с несинонимичными замещениями (рис. 1). Регион высокого отношения полиморфизма к дивергенции локализован в пределах интрона (рис. 6, 7). Низкое отношение полиморфизма к дивергенции является характерным признаком направленного отбора, тогда как высокое отношение отражает возможное действие балансирующего отбора (McDonald, 1996, 1998). Ранее мы показали, что оба типа позитивного отбора, вероятно, влияют на формирование паттернов изменчивости генов *bar*, *lbe* и *Est-6* у плодовой мушки *Drosophila* (Балакирев, Айала, 2004б; Balakirev et al., 2002, 2006, 2011; Balakirev, Ayala, 2003b, 2004b). Полученные данные позволяют предположить, что оба типа отбора оперируют и в эволюции гена *bindin* у морских ежей (см. подробнее: Balakirev et al., 2016a).

Для гена *bindin* мы выявили существенное отклонение от нейтральности посредством теста МакДональда и Крейтмана (McDonald, Kreitman, 1991) (точный тест Фишера $P = 0,0016$; $G = 10,913$; $P = 0,00096$). Направление отклонения показывает избыток синонимичных сайтов, сегрегирующих в пределах *S. intermedius*, в отношении к числу синонимичных сайтов, фиксированных между видами (*S. intermedius* против *S. polyacanthus*, *S. pallidus* и *S. droebachiensis*). Для гена *COI* тест МакДональда и Крейтмана (McDonald, Kreitman, 1991) несущественен (точный тест Фишера $P = 0,289$; G-тест невыполним, поскольку фиксированные различия между всеми парами видов составляют ноль).

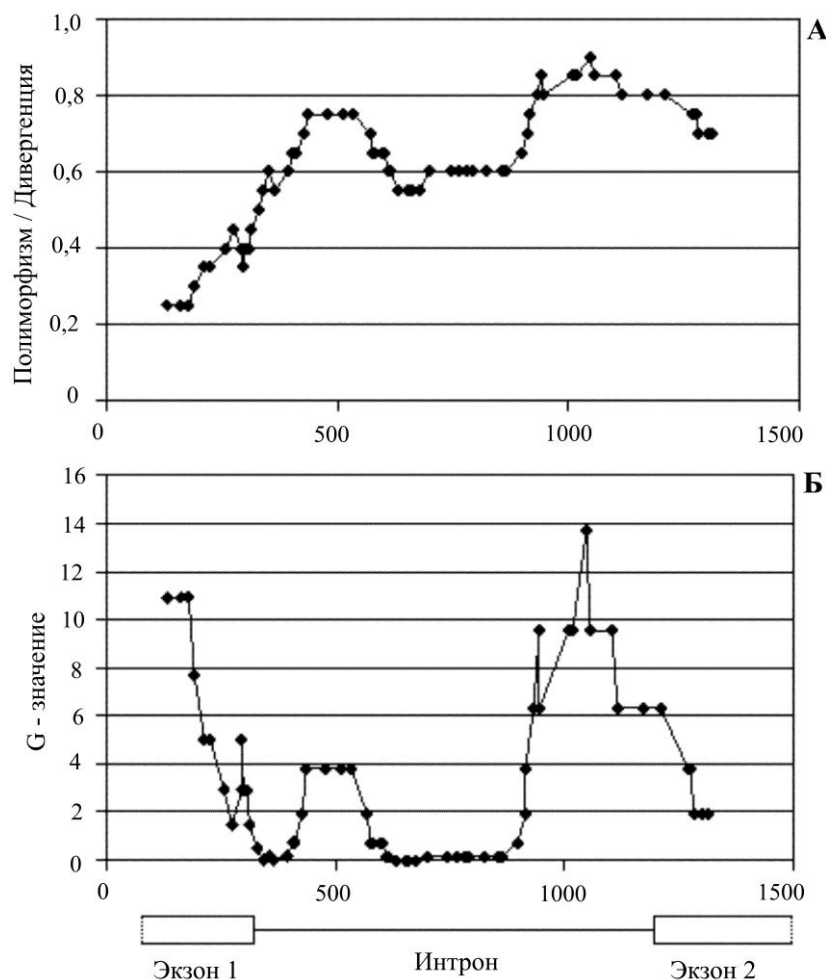


Рис. 7. Графики скользящих окон для (А) отношения полиморфизма к дивергенции и (Б) средних значений показателя G (McDonald, 1996, 1998), рассчитанных для гена *bindin* у *Strongylocentrotus intermedius*. В качестве внешней группы использовали последовательность гена *bindin* *S. polyacanthus* (AF077317). Размер окна – 10 полиморфных замещений для расчёта отношения полиморфизма к дивергенции и 12 полиморфных замещений для расчёта средних значений показателя G. Другие пояснения: см. рис. 4.

По: Balakirev et al. (2016a) с изменениями.

Общепринятые тесты на нейтральность (Hudson et al., 1987; Tajima, 1989; Fu, Li, 1993; Depaulis, Veuille, 1998; Kelly, 1997; Wall, 1999) не выявили значимых отклонений от нейтральности для гена *bindin*. Однако анализ скользящих окон демонстрирует ряд существенных пиков для соответствующих статистик, базирующихся на неравновесии по сцеплению между сегрегирующими сайтами (Kelly, 1997; Wall, 1999). Рисунок 8 иллюстрирует график скользящих окон для *B*-статистики теста на нейтральность Волла (Wall, 1999). Наиболее выраженные пики ($P < 0,001$ при коалесцентных моделированиях без рекомбинаций) центрированы на область несинонимичного полиморфизма в экзоне 1 и область интрона (рис. 2, 7). Интересно, что статистически существенные пики располагаются в одинаковых (или очень близких) координатах для *S. intermedius*, *S. pallidus* и *S. droebachiensis* и совпадают с пиками нуклеотидной изменчивости и неравновесия по сцеплению. Выявленные паттерны характерны для параллельной эволюции, которая обусловлена сходными или идентичными мутациями, максимизирующими адаптацию в независимых эволюционных линиях (см. подробнее: Balakirev et al., 2016a).

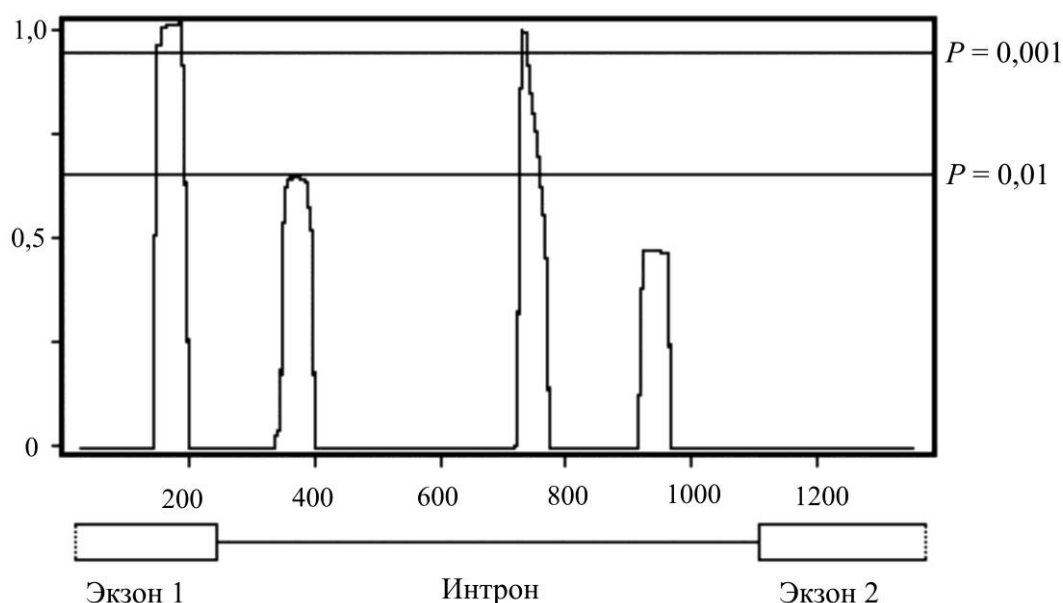


Рис. 8. Графики скользящих окон для показателя *B* теста на нейтральность Волла (Wall, 1999) на протяжении гена *bindin* у *Strongylocentrotus intermedius*. Размер окна – 50 нуклеотидов с 5-нуклеотидным инкрементом. Горизонтальные линии обозначают ожидаемые значения показателя *B* с вероятностью $P = 0,01$ (нижняя линия) и $P = 0,001$ (верхняя линия), полученные с помощью коалесцентных моделирований без рекомбинации с установкой на число полиморфных сайтов. Другие пояснения: см. рис. 4.
По: Balakirev et al. (2016a) с изменениями.

Таким образом, распределение нуклеотидной изменчивости не равномерно и не случайно на протяжении гена *bindin*. Выраженные пики нуклеотидной изменчивости, сопровождаемые пиками неравновесия по сцеплению и центрированные на функционально важные сайты, являются отчётливыми следами влияния позитивного отбора (Strobeck, 1983; Hudson, Kaplan, 1988; McDonald, 1996, 1998; Charlesworth et al., 1997; Kelly, 1997; Nordborg, 1997; Takahata, Satta, 1998; Wall, 1999; Kim, Nielsen, 2004; Charlesworth, 2006). Анализ с использованием моделей максимального правдоподобия (Anisimova, Kosiol, 2009) подтверждает действие позитивного отбора как на кодирующую область гена *bindin*, так и на его интрон. Важно, что число кодонов, эволюционирующих под влиянием позитивного отбора, различается для Т и С форм *S. intermedius* (Balakirev et al., 2016a).

Для гена *COI* тесты Келли (Kelly, 1997) и Волла (Wall, 1999) не выявили существенных отклонений от нейтральных ожиданий. Однако показатели этих тестов (Z_{ns} , B и Q) распределены неравномерно. На протяжении гена *COI* имеются два отчётливых пика в координатах 625 и 850, совпадающие с пиками значений нуклеотидного разнообразия (данные не приведены). Коалесцентное моделирование показывает, что пики Z_{ns} не существенны, но два пика для статистик B и Q маргинально существенны ($P < 0,025$). Этот паттерн может быть следствием либо демографических факторов, либо позитивного отбора, что требует рассмотрения в дальнейших исследованиях морских ежей, поскольку адаптивная эволюция мтДНК показана для многих видов животных (см. обзоры: James et al., 2016; Sloan et al., 2017).

Для гена *bindin* отчётливо выявляется неравномерное распределение численности и степени отличия гаплотипов в пределах двух гаплогрупп (рис. 1; табл. 1). Наличие двух наборов дивергентных гаплотипов позволяет предположить влияние направленного отбора, увеличивающего частоту и снижающего изменчивость последовательностей, несущих благоприятные мутации. Такой паттерн изменчивости, вероятно, является следствием эффекта “селективного выметания” (от англ. selective sweep), в результате которого происходит снижение изменчивости в области, непосредственно окружающей мутацию, на которую воздействует направленный отбор (Maynard Smith, Haigh, 1974). Для проверки этой гипотезы мы использовали гаплотипный тест Хадсона и соавторов (Hudson et al., 1994). Для полного набора последовательностей *bindin* имеется 30 информатив-

ных сайтов; гомогенная подгруппа включает 20 последовательностей с двумя информативными сайтами (табл. 1; рис. 2). Данная конфигурация маргинально маловероятна ($P = 0,03$) при популяционной частоте рекомбинации 0,005, полученной с помощью метода МакВина и соавторами (McVean et al., 2002). Конфигурация становится более асимметричной и менее вероятной (гаплотипный тест $P = 0,006$) при исключении рекомбинантных последовательностей U-7 и G-45 (рис. 1). Таким образом, гаплотипный тест (Hudson et al., 1994) выявляет статистически существенный избыток почти идентичных гаплотипов, что указывает на участие направленного отбора в эволюции гомогенной подгруппы последовательностей гена *bindin*. Регион с аминокислотными замещениями (рис. 1) в экзоне 1 является вероятным кандидатом в качестве мишени для направленного отбора (рис. 7). Результат гаплотипного теста согласуется с результатами тестов МакДональда (см. выше), которые выявляют две вероятные мишени для позитивного отбора (рис. 7). Одна из мишеней локализуется в экзоне 1 и проявляет себя как регион с низким отношением полиморфизма к дивергенции (рис. 7), что указывает на действие направленного отбора (McDonald, 1996, 1998). Для гена *COI* также обнаружено две группы дивергентных гаплотипов (рис. 1; табл. 1). Однако гаплотипы имеют сходную частоту и изменчивость; соответственно, гаплотипный тест не выявляет отклонений от нейтральных ожиданий ($P < 0,05$).

Для гена *COI* у *S. intermedius* на основе теста Фу и Ли (Fu, Li, 1993) выявлено существенное отклонение от нейтральности. Значение показателя D^* негативное ($D^* = -2,932$, $P < 0,02$), что указывает на значительный избыток уникального полиморфизма. Показатель теста Таджимы (Tajima, 1989) существенно не отклоняется от нуля ($D = -0,318$); отрицательное значение указывает на эксцесс низкочастотных вариантов, что согласуется с гипотезой о мутациях с очень слабым неблагоприятным эффектом. Аналогичный характер отклонения от нейтральности для митохондриальных генов выявлен и у многих других организмов (Rand, 2001; Ballard, Whitlock, 2004) и интерпретирован в свете “почти нейтральной” теории молекулярной эволюции (Ohta, 1992). В соответствии с этой теорией несинонимичные мутации с очень слабым неблагоприятным эффектом персестируют в пределах видов как эфемерные варианты, но не привносят свой вклад в межвидовую дивергенцию (Hasegawa et al., 1998; Nielsen, Weinreich, 1999).

Негативные значения показателей тестов Фу и Ли (Fu, Li, 1993) и Таджимы (Tajima, 1989) обычно интерпретируются (в демографической плоскости) как недавняя экспансия популяции. Демографическая интерпретация тестов на нейтральность должна применяться с осторожностью для морских организмов, демонстрирующих высокую плодовитость и высокую дисперсию репродуктивного успеха среди родителей (см. обзор: Hedgecock, Pudovkin, 2011). Популяционная динамика в таких случаях может существенно отклоняться от исходных предположений модели Райта–Фишера и базирующейся на ней коалесцентной теории Кингмана (Kingman, 1982). Такие особенности биологии лучше описываются мультиразветвлёнными генеалогиями и моделями, включающими “множественно объединяющиеся коалесценции” (от англ. multiple merger coalescents; см. обзор: Tellier, Lemaire, 2014). В соответствии с этими моделями избыток низкочастотных вариантов ожидается при равновесии (Sargsyan, Wakeley, 2008; Eldon et al., 2015) и, таким образом, в отличие от стандартной модели коалесценции, не является истинным сигналом популяционного бутылочного горлышка (Hoban et al., 2013) или недавней экспансии (Sargsyan, Wakeley, 2008; Eldon et al., 2015).

Остальные использованные тесты на нейтральность (Hudson et al., 1987; Depaulis, Veuille, 1998) не выявили каких-либо отклонений от нейтральной модели как для гена *COI*, так и для гена *bindin*, что, вероятно, обусловлено ограниченной выборкой последовательностей.

Полные митохондриальные геномы

Определена нуклеотидная последовательность полных митохондриальных геномов у двух индивидуумов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, принадлежащих к Т и С морфологическим формам (Balakirev et al., 2017). Размеры геномов составили 15 705 п.н. Порядок расположения, нуклеотидный состав и размеры генов у *S. intermedius* сходны с таковыми, опубликованными ранее для морских ежей (см., например, Jacobs et al., 1988; Cantatore et al., 1989; De Giorgi et al., 1996; Cea et al., 2015). Выявлено 131 однонуклеотидное различие и одно различие в длине между двумя геномными последовательностями (SIT17 и SIG19). Суммарная дивергенция (D_{xy}) составила $0,0083 \pm 0,0007$. Выявлен низкий уровень дивергенции ($D_{xy} = 0,0049 \pm 0,0004$) между нашими образцами и геномом *S. intermedius* из генного банка (KC490912).

Образец *S. intermedius* из генного банка собран с глубины менее 10 м близ г. Каннын (Южная Корея, Японское море; персональное сообщение профессора Ён-Хо Ли, Институт океанических исследований и технологии, Республика Корея). Следовательно, этот образец представляет типичную морфологическую форму, предпочитающую небольшие глубины (5–10 м). Точка взятия образца из генного банка находится на расстоянии около 2000 км от мыса Золотой, где собраны наши образцы (координаты см. в разделе «Материал и методика»). Несмотря на большое расстояние, нуклеотидное различие между образцом из генного банка и Т формой, исследованной нами, очень низкое ($D_{xy} = 0,0013 \pm 0,0003$), но в 6,5 раза выше ($D_{xy} = 0,0085 \pm 0,0006$) между образцом из генного банка и формой С.

Таким образом, образцы *S. intermedius*, собранные в пределах 150 м, но принадлежащие к разным морфологическим формам, различаются значительно, чем образцы, собранные из удалённых регионов, но принадлежащие к одной морфологической форме. Эти несоответствия между генетическими различиями и географическими дистанциями подтверждают ограниченность генного обмена между Т и С формами *S. intermedius*.

Необходимо, однако, осторожно относиться к результатам сравнений морфологических форм *S. intermedius* по митохондриальным геномам, характеризующимся строго диморфной структурой гаплотипов с высоким уровнем дивергенции ($D_{xy} = 0,0084 \pm 0,0006$; см. выше раздел «Структура гаплотипов»). Выявленные различия могут отражать не дивергенцию морфологических форм, а различия между гаплотипами. Кроме этого для митохондриальных геномов морских ежей (включая *S. intermedius*) обнаружено явление трансвидового полиморфизма (Balakirev, 2019), осложняющего интерпретацию данных по внутривидовой изменчивости мтДНК. Для получения более надёжных данных необходимо сопоставление значений дивергенции для значительно большей выборки полных митохондриальных геномов у Т и С форм *S. intermedius*, включающей основные группы гаплотипов.

Бактериальные симбионты

Сопоставление полученных фрагментов гена 16S rRNA у симбионтов, населяющих *Strongylocentrotus intermedius* с нуклеотидными последовательностями из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), осуществлённое с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1990), обнаружило ряд близких совпадений с бактериями, принадлежащими к типу Bacteroidetes.

Большинство выявленных микроорганизмов являются представителями двух классов, Flavobacteria и Sphingobacteria; только две последовательности обнаружили близкое сходство с представителями класса Bacteroidetes.

Для выяснения таксономической принадлежности полученных клонов Flavobacteria и Sphingobacteria мы использовали две программы, RDP Classifier (Cole et al., 2007) и Greengenes (DeSantis et al., 2006). Преобладающий флотип Flavobacteria (мы используем термин “флотип” (филогенетический тип) для обозначения кластеров родственных последовательностей гена 16S rRNA, характеризующихся уровнем попарной идентичности последовательностей $\geq 97\%$) обнаружил наиболее близкое совпадение (двухпараметрическая дистанция Кимуры составила $0,1525 \pm 0,0116$) с бактериями, принадлежащими роду *Elizabethkingia* (семейство Flavobacteriaceae). Сходные бактерии описаны ранее из клинических образцов человека и водной среды (Kim et al., 2005; Bernardet et al., 2005). Клоны, представляющие класс Sphingobacteria, формируют несколько дивергентных кластеров, филогенетически близких к бактериям из рода *Cytophaga* (семейство Flexibacteriaceae), описанных из морской среды (обзор: Недашковская, 2007). Преобладающий флотип Sphingobacteria обнаруживает наиболее близкие совпадения с некультивируемыми бактериями из группы CFB (*Cytophaga* – *Flavobacterium* – *Bacteroides*) (двухпараметрическая дистанция Кимуры составила $0,1186 \pm 0,0094$), ассоциированными со слизистыми выделениями полихеты *Paralvinella palmiformis* (Alain et al., 2002). Клоны, представляющие класс Bacteroidetes, редки (только 2 из 229) и наиболее близки к бактериям из рода *Prevotella* (семейство Prevotellaceae). Традиционные микробиологические методы не выявили представителей класса Bacteroidetes у *S. intermedius* (Недашковская, 2007).

Интересная особенность данных касается относительного “обилия” представителей Flavobacteria и Sphingobacteria, присутствующих в исследованных клонах. Клоны Flavobacteria представлены шестью родами семейства Flavobacteriaceae: *Elizabethkingia*, *Capnocytophaga*, *Lutibacter*, *Flavobacterium*, *Bizionia* и *Winogradskyella*, тогда как клоны Sphingobacteria представлены единственным родом *Cytophaga* (семейство Flexibacteraceae). Это наблюдение, вероятно, отражает большее эволюционное разнообразие Flavobacteria в сравнении с Sphingobacteria у морских ежей, но может быть и

результатом смещённой специфичности использованных праймеров, а также трудностей микробиологического культивирования *Sphingobacteria*.

Структура микробиома у Т и С форм Strongylocentrotus intermedius

Для анализа микробиома мы исследовали две дополнительные выборки *Strongylocentrotus intermedius* из б. Ольга и мыса Поворотный (см. раздел “Материал и методика”). Увеличение материала необходимо для получения надёжных выводов об ассоциациях между бактериальными симбионтами и морфологическими формами ежей. В анализ также добавлен *Mesocentrotus nudus*, родственный вид морских ежей, обитающий в некоторых частях ареала симпатрично с *S. intermedius* (Бажин, Степанов, 2012).

Структура микробиомов, ассоциированных с Т и С формами *S. intermedius*, исследовалась с использованием подходов Мартина (Martin, 2002) и Лозупоне и Найта (Lozupone, Knight, 2005). Каждый индивидуум морского ежа рассматривался как “внешняя среда”, населенная специфическим набором бактериальных симбионтов. С использованием теста “UniFrac” определяли филогенетическую дистанцию между наборами таксонов на филогенетическом дереве как долю длины ветвей дерева, ведущую к потомкам по нисходящей линии, либо из одной внешней среды, либо из другой, но не обеих (Lozupone, Knight, 2005). С использованием филогенетического теста “P” определяли существенность ковариаций между распределениями уникальных таксонов и филогениями в различных бактериальных сообществах (Martin, 2002). Оба подхода (P-тест и UniFrac-тест) позволяют оценить существенность различий между бактериальными сообществами посредством моделирования методом Монте-Карло (Martin, 2002; Lozupone, Knight, 2005). Для визуализации и сравнения микробиомов, населяющих морфологические формы и виды морских ежей, использовали метод главных компонент.

Клоны, представляющие *Sphingobacteria* и *Flavobacteria*, неравномерно распределены между Т и С формами *S. intermedius* во всех трёх исследованных локальностях (Balakirev et al., 2008). На рис. 9 представлено взаимоотношение исследованных клонов для выборки близ мыса Золотой (см. раздел “Материал и методика”). Отклонение от равного отношения существенно как для Т формы ($\chi^2 = 65,33$; $df = 1$; $P < 0,001$), так и для С формы ($\chi^2 = 22,50$; $df = 1$; $P < 0,001$). Сходное распределение получено для всех трёх локальностей: форма Т преимущественно населена представите-

лями Flavobacteria, тогда как форма С – представителями Sphingobacteria (значение показателя парного t-теста составило 9,69; $P < 0,001$). Однако бактериальные клоны, полученные из морского ежа *M. nudus*, равномерно распределены на филогенетическом дереве ($\chi^2 = 1,52$; $df = 1$; $P > 0,05$) (рис. 9). Суммарное различие (UniFrac-дистанция) микробиомов между Т и С формами *S. intermedius* составило 0,6589, что сопоставимо и даже несколько ниже (UniFrac-дистанция = 0,6424) различия между *S. intermedius* (суммарно для Т и С форм) и *M. nudus*. Эти значения резко контрастируют с генетическими дистанциями по гену *COI* между Т и С формами *S. intermedius* ($D_{xy} = 0,0453$) и видами *S. intermedius* и *M. nudus* ($D_{xy} = 0,1165$) и указывают на то, что микробиомы являются чрезвычайно чувствительными маркерами для анализа морфологических форм *S. intermedius*. Соответственно этим результатам более высокое разрешение при исследовании эволюционной истории этносов (Wirth et al., 2004) и паттернов миграции (Falush et al., 2003) получено при использовании в качестве маркера ассоциированной с человеком бактерии *Helicobacter pylori*, чем генов самого человека.

Популяционно-генетическая структура каждой из бактериальных групп, Sphingobacteria и Flavobacteria, имеет сходные особенности в трёх отдалённых поселениях ежей и характеризуется статистически существенным отклонением от нейтральности и неслучайными ассоциациями с двумя морфологическими формами *S. intermedius*. Показатели тестов на нейтральность (Tajima, 1989; Fu, Li, 1993) высоко существенны. Для Flavobacteria $D = -2,71$, $P < 0,01$; $D^* = -5,73$, $P < 0,01$; для Sphingobacteria $D = -2,77$, $P < 0,01$; $D^* = -5,97$, $P < 0,01$. Сходные паттерны ранее выявлены для многих генов вертикально наследующихся симбионтов (см., например, Funk et al., 2001; Herbeck et al., 2003). Эти паттерны интерпретируются в свете “почти нейтральной” теории молекулярной эволюции (Ohta, 1992), в соответствии с которой мутации с незначительным повреждающим эффектом имеют тенденцию накапливаться у симбиотических бактерий в результате ограниченных эффективных численностей популяций.

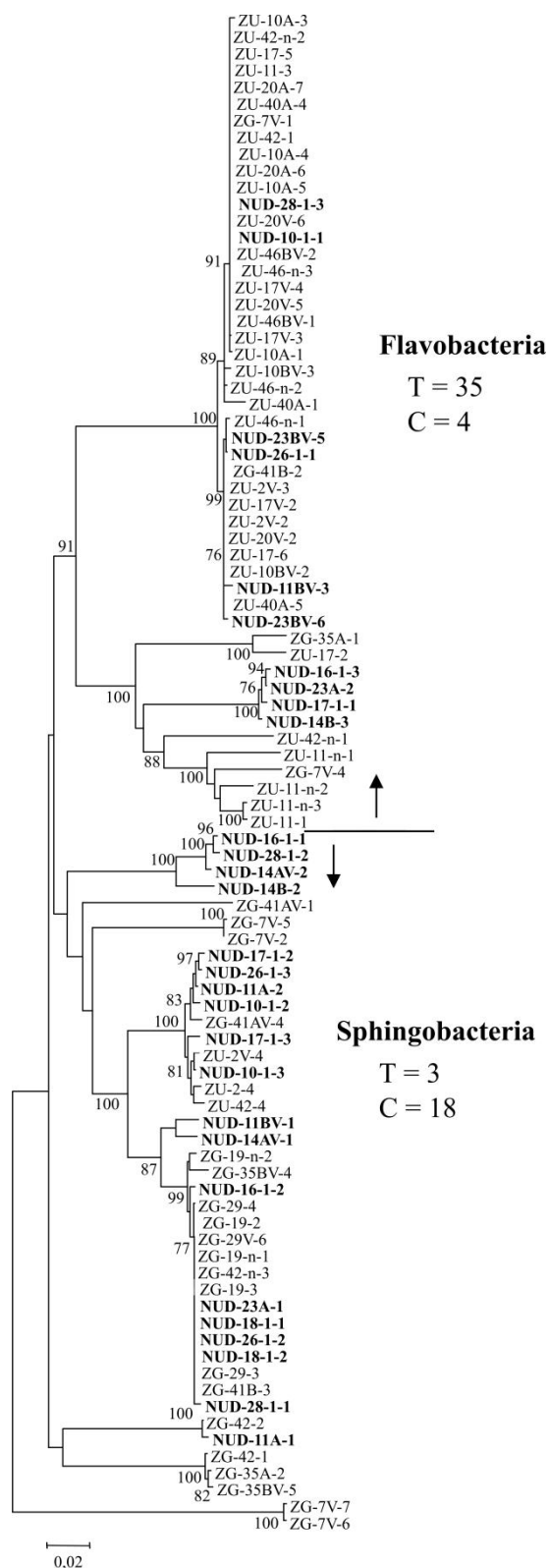


Рис. 9. Бескорневое дерево нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA у бактериальных симбионтов *Strongylocentrotus intermedius*. Бутстрэп-значения получены на базе 10000 репликаций. Бактериальные клоны Т и С форм *S. intermedius* обозначены на дереве символами ZU и ZG с последующими буквами и цифрами, которые обозначают номера исследуемого образца морского ежа и бактериального клона. Жирным шрифтом отмечены бактериальные клоны, полученные из *Mesocentrotus nudus* (NUD). В качестве внешней группы использованы два клона (ZG-7V-6 и ZG-7V-7), представляющие род *Prevotella*. Горизонтальная линия и две разнонаправленные стрелки указывают на две части дерева, содержащие флотипы Flavobacteria и Sphingobacteria. По: Balakirev et al. (2008) с изменениями. Остальные пояснения: см. рис. 3.

Мы обнаружили статистически существенные различия между бактериальными сообществами, ассоциированными с Т и С формами *S. intermedius* из трёх исследованных локальностей. Значимость филогенетического Р-теста ($P < 0,01$ с поправкой Бонферрони; Martin, 2002) означает, что бактериальные сообщества, ассоциированные с Т и С формами

S. intermedius, существенно различаются и кластеризуются в соответствии с внешней средой (индивидуумами, принадлежащими к Т или С формам, см. выше). UniFrac-тесты (Lozupone, Knight, 2005) также высоко существенны для каждой выборки ($P < 0,01$ с поправкой Бонферрони). Этот результат означает, что филоотипы *Sphingobacteria* и *Flavobacteria* существенно кластеризуются в соответствии с Т и С формами и представляют значительную величину уникальных ответвлений на филогенетическом дереве.

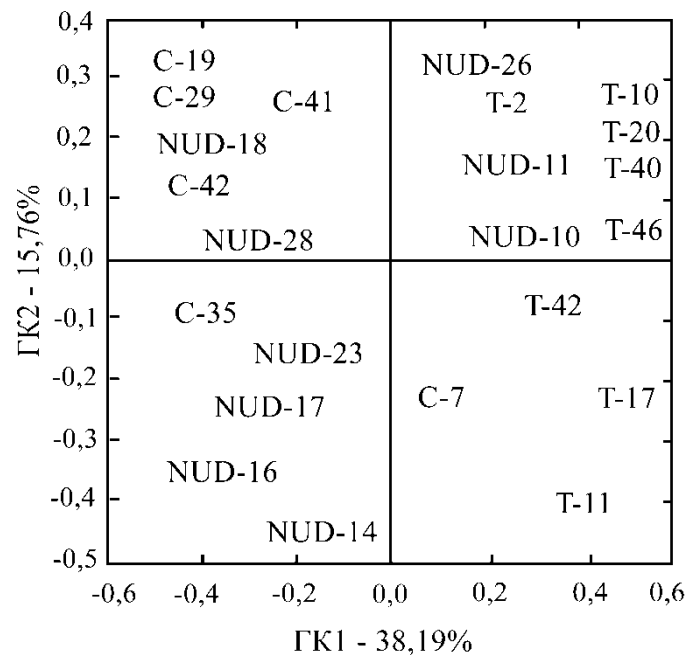


Рис. 10. Первые две главные компоненты изменчивости бактериальных сообществ у *Strongylocentrotus intermedius* и *Mesocentrotus nudus*. На осях диаграммы обозначены проценты изменчивости, объясняющие первую (ГК1) и вторую (ГК2) главные компоненты. NUD – *M. nudus*. Другие пояснения: см. рис. 2. По: Balakirev et al. (2008) с изменениями.

Матрицу исходных UniFrac-дистанций для всех пар особей морских ежей анализировали с использованием метода главных компонент (рис. 10). Диаграмма рассеяния для двух первых главных компонент (ГК1 и ГК2) представляет расположение Т и С форм *S. intermedius*, а также *M. nudus* и выявляет биологически содержательную группировку данных. Две первые главные компоненты, ГК1 и ГК2, совместно объясняют более половины изменчивости в представленных данных и разделяют Т – ассоциированные бактериальные сообщества от С – ассоциированных сообществ (с единственным исключением, рис. 10). Исследованные особи *M. nudus* рассеяны среди Т и С форм *S. intermedius*, хотя все они были собраны с мелководья (2–3 м), где распространена лишь форма Т.

Представленный анализ демонстрирует, что Т и С формы *S. intermedius* населены существенно различающимися и специфичными для каждой формы бактериальными сообществами. Важно, что идентичные паттерны получены для трёх выборок ежей, собранных из географически удалённых локальностей, охватывающих более 700 км морского побережья (см. раздел “Материал и методика”). Бактериальные флотипы и образцы *M. nudus* рассеяны среди флотипов и образцов *S. intermedius* независимо от глубины, на которой они были собраны (рис. 9, 10). Эти результаты позволяют предположить, что бактериальные сообщества являются эволюционной формо- и видоспецифичной характеристикой морских ежей и прямо не связаны с глубиной их обитания. Ранее (Balakirev et al., 2012b) существенные различия микробиома были обнаружены также у генетически не отличающихся морфологических форм водорослей рода *Saccharina*. Результаты по симбиотическим ассоциациям у водорослей и морских ежей подробно рассматриваются в соответствующих публикациях (Balakirev et al., 2008, 2012b).

Заключение

Коротко суммируя результаты, можно сказать, что исследованные морфологические формы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* не имеют фиксированных генетических отличий, демонстрируют низкую генетическую дивергенцию и, следовательно, не могут рассматриваться как различные биологические виды. Однако адаптивный ген *bindin* проявляет отчётливые различия между Т и С формами по уровню и архитектуре изменчивости, выраженности неравновесия по сцеплению и числу сайтов, эволюционирующих под влиянием позитивного отбора. Кроме этого Т и С формы *S. intermedius* ясно различаются по морфологии, предпочитаемым условиям обитания и составам бактериальных симбионтов. Выявленные отличия, вероятно, отражают специфику адаптации к контрастным условиям морской среды в мелко- и глубоководных поселениях *S. intermedius*. Полученные данные позволяют предположить, что дивергентный отбор против потока генов является основным процессом, генерирующим специфические особенности у двух исследованных форм *S. intermedius*, в соответствии с наблюдаемыми паттернами в рамках модели изоляции внешней средой (см., например, Wang, Bradburd, 2014). Важно отметить, что по гену *COI* – основному маркеру ДНК-

штрихкодирования, претендующему на универсальную применимость и эффективность для определения принадлежности организма к определённому таксону, – не выявлено различий между исследованными формами.

Отсутствие фиксированных различий между морфологическими формами морского ежа *S. intermedius* по генам *COI* и *bindin* не означает, что их нет по другим, пока не исследованным локусам. Ранние фазы видообразования, приводящие к репродуктивной изоляции, могут быть связаны с изменениями в крайне ограниченной доле генома, так называемых островах геномной дивергенции (от англ. islands of genomic divergence), или иначе, “геномных островах видообразования” (от англ. genomic islands of speciation) (см., например, Turner et al., 2005; Nosil et al., 2009; Caputo et al., 2016). Такие острова дивергенции на фоне полного сходства всего остального генома обнаружены, например, у морфологических вариантов африканских малярийных комаров *Anopheles gambiae* (Turner et al., 2005; Aboagye-Antwi et al., 2015; Caputo et al., 2016; Pombi et al., 2017), впоследствии описанных как два различных вида – *A. gambiae* и *A. coluzzii* (Coetzee et al., 2013), а также у парapatрических подвидов птиц *Corvus* (Vijay et al., 2018), парapatрических рас бабочек *Heliconius* (Van Belleghem et al., 2017), экоморфологических вариантов африканских цихловых рыб *Astatotilapia* (Malinsky et al., 2015) и коралловых рыб *Hypoplectrus* (Hench et al., 2019). Размеры островов дивергенции ничтожно малы в сравнении с размерами полных геномов. Так, у коралловых рыб *Hypoplectrus* обнаружены только четыре региона, которые проявляют согласующиеся паттерны дивергенции между тремя симпатрическими видами при полном единообразии остального генома. Эти четыре высоко дифференцированных региона содержат лишь четыре гена (включая регуляторные последовательности), определяющие развитие паттернов пигментации (*sox10*, *hoxc13a*) и зрения (*casz1*, *SWS* и *LWS* опсины) (Hench et al., 2019). Острова дивергенции демонстрируют высокий уровень дифференциации при значительном потоке генов и, следовательно, содержат гены, ответственные за репродуктивную изоляцию (возможны, однако, и альтернативные гипотезы, см.: Cruickshank, Hahn, 2014; Wolf, Ellegren, 2017). Исходя из приведённых примеров по островам геномной дивергенции понятна необходимость дальнейшего исследования морфологических форм *S. intermedius* с применением методов секвенирования нового поколения.

Полученные в настоящей работе данные указывают на то, что адаптивные локусы и бактериальные симбионты могут служить в качестве достаточно чувствительных маркёров для анализа близких эволюционных линий морских ежей и, вероятно, других морских организмов. Результаты свидетельствуют об уникальных эволюционных траекториях для каждой из исследованных форм *S. intermedius* и позволяют рассматривать их в качестве экоморфологических адаптаций, находящихся на начальном этапе видообразования (зарождающиеся виды), что определяет необходимость учёта данного обстоятельства при организации промысла с целью сохранения адаптивного разнообразия. В более широкой перспективе настоящее исследование будет способствовать дальнейшему развитию представлений о динамике и механизмах поддержания генетической изменчивости и фундаментальных закономерностях видообразования в море, что обеспечит обоснованную методологическую базу для последующих эволюционно-генетических исследований, направленных на решение практических задач по рациональному использованию, мониторингу и сохранению морских биологических ресурсов.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность Владимиру Андреевичу Павлючкову (Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр), Владивосток, Россия), Марии Анисимовой (Институт прикладных моделирований, Школа естественных наук, Виденсвиль, Швейцария) и Франциско Дж. Айале (Университет Комильяс, Мадрид, Испания) за сотрудничество в работе по морским ежам, а также Елене Ивановне Балакиревой за всестороннюю помощь и поддержку.

Список литературы

Акулин В.Н., Дзизюров В.Д., Поздняков С.У. Аквакультура на Дальнем Востоке: вчера, сегодня, завтра // Тр. ВНИРО. 2015. Т. 153. С. 121–136.

Бажин А.Г., Степанов В.Г. Морфологическая изменчивость некоторых видов морских ежей рода *Strongylocentrotus* в зависимости от факторов среды // Зоол. журн. 2002. Т. 81, № 12. С. 1487–1493.

Бажин А.Г., Степанов В.Г. Морские ежи семейства Strongylocentrotidae морей России. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 2012. 196 с.

Балакирев Е.С., Федосеев В.Я. Генетическая изменчивость и организация рационального промысла камчатского краба *Paralithodes camtschatica* (Tilesius) // Сб. тр. междунар. симп.: “Сознание и наука: Взгляд в Будущее” /ред. Ю.А. Митрофанов. Владивосток: Изд-во ДВГТУ, 2000а. С. 254–261.

Балакирев Е.С., Федосеев В.Я. Оценка генетической изменчивости камчатского краба *Paralithodes camtschatica* (Tilesius) с использованием аллозимных маркеров // Генетика. 2000б. Т. 36, № 8. С. 1041–1048.

Балакирев Е.С., Федосеев В.Я. Анализ генетической (аллозимной) изменчивости камчатского краба *Paralithodes camtschatica* (Crustacea: Decapoda, Lithodidae) // Изв. ТИНРО-Центра. 2001. Т. 128. С. 465–494.

Балакирев Е.С., Айала Ф.Дж. Псевдогены: консервация структуры, экспрессия и функции // Журн. общ. биол. 2004а. Т. 65, № 4. С. 306–321.

Балакирев Е.С., Айала Ф.Дж. Нуклеотидная изменчивость β -эстеразных генов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Усп. совр. биол. 2004б. Т. 124, № 4. С. 385–396.

Гордеева Н.В. Высокие оценки дифференциации популяций горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* по локусу главного комплекса гистосовместимости МНС-I A1 поддерживают гипотезу “локальных стад” // Вопр. ихтиол. 2012. Т. 52, № 1. С. 72–81.

Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях ред. /ред. Ю.П. Алтухов. М.: Наука, 2004. 619 с.

Животовский Л.А. Популяционная структура вида: эко-географические единицы и генетическая дифференциация популяций // Биол. моря. 2016. Т. 42, № 5. С. 323–333.

Заславская Н.И., Ващенко М.А., Жадан П.М. Генетическая структура поселений морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* из северо-западной части Японского моря в связи со сдвигом сроков нереста // Биол. моря. 2012. Т. 38, № 4. С. 305–317.

Кафанов А.И., Павлючков В.А. Экология промысловых морских ежей рода *Strongylocentrotus* материкового япономорского побережья России // Изв. ТИНРО-Центра. 2001. Т. 128. С. 349–373.

Манченко Г.П. Генетическая изменчивость белков у морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Генетика. 1985. Т. 21, № 5. С. 763–769.

Мокрецова Н.Д. Культивирование трепанга // Культивирование тихоокеанских беспозвоночных и водорослей. М.: Агропромиздат, 1987. С. 116–135.

Недашковская О.И. Морские аэробные гетеротрофные бактерии типа *Bacteroidetes*: автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. Владивосток, 2007. 37 с.

Пудовкин А.И., Серов О.Л., Глазко В.И. Аллозимная изменчивость у четырех видов морских ежей из залива Петра Великого Японского моря // Генетика. 1984. Т. 20, № 7. С. 1633–1643.

Федосеев В.Я. Способы искусственного повышения продуктивности природных популяций крабов // Экол. вестн. Приморья. 2000. № 5. С. 3–9.

Aboagye-Antwi F., Alhafez N., Weedall G.D. et al. Experimental swap of *Anopheles gambiae*'s assortative mating preferences demonstrates key role of X-chromosome divergence island in incipient sympatric speciation // PLoS Genet. 2015. Vol. 11, N 4. e1005141.

Advances in Conservation Genetics /J. Hendon (editor). Syrawood Publishing House, 2018. 268 p.

Aguadé M. Nucleotide sequence variation at two genes of the phenylpropanoid pathway, the *FAH1* and *F3H* genes, in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18. P. 1–9.

Ahrens C.W., Rymer P.D., Stow A. et al. The search for loci under selection: trends, biases and progress // Mol. Ecol. 2018. Vol. 27, N 6. P. 1342–1356.

Akaike H. A new look at the statistical model identification // IEEE Trans. Automat. Contr. 1974. Vol. 19. P. 716–723.

Alain K., Olagnon M., Desbruyeres D. et al. Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis* // Microbiol. Ecol. 2002. Vol. 42. P. 463–476.

Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. The problems with hybrids: setting conservation guidelines // Trends Ecol. Evol. 2001. Vol. 16. P. 613–622.

Allendorf F.W., England P.R., Luikart G. et al. Genetic effects of harvest on wild animal populations // Trends Ecol. Evol. 2008. Vol. 23, N 6. P. 327–337.

Allendorf F.W., Hohenlohe P.A., Luikart G. Genomics and the future of conservation genetics // Nat. Rev. Genet. 2010. Vol. 11, N 10. P. 697–709.

Allendorf F.W., Luikart G., Aitken S.N. Conservation and the Genetics of Populations. Oxford, U.K.: Wiley-Blackwell Publ. 2nd ed. 2013. 602 p.

Allendorf F.W., Hard J.J. Human-induced evolution caused by unnatural selection through harvest of wild animals // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2009. Vol. 106, Suppl. 1. P. 9987–9994.

Almeida F.C., DeSalle R. Genetic differentiation and adaptive evolution at reproductive loci in incipient *Drosophila* species // J. Evol. Biol. 2017. Vol. 30. P. 524–537.

Alström P., Rasmussen P.C., Olsson U., Sundberg P. Species delimitation based on multiple criteria: the Spotted Bush Warbler *Bradypterus thoracicus* complex (Aves: Megaluridae) // Zool. J. Linn. Soc. 2008. Vol. 154, N 2. P. 291–307.

Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215. P. 403–410.

Andriollo T., Naciri Y., Ruedi M. Two mitochondrial barcodes for one biological species: The case of European Kuhl's Pipistrelles (Chiroptera) // PLoS One. 2015. Vol. 10, N 8. e0134881.

Anisimova M., Kosiol C. Investigating protein-coding sequence evolution with probabilistic codon substitution models // Mol. Biol. Evol. 2009. Vol. 26, N 2. P. 255–271.

Arif I.A., Khan H.A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review // An. Biodiver. Conserv. 2009. Vol. 32, N 1. P. 9–17.

Asmelash B., Diriba S., Pal S.K. Molecular markers based characterization and conservation of wild animals // Res. J. Rec. Sci. 2017. Vol. 6, N 7. P. 53–62.

Awadalla P., Eyre-Walker A., Smith J.M. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA // Science. 1999. Vol. 286, N 5449. P. 2524–2525.

Bachtrog D., Thornton K., Clark A., Andolfatto P. Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group // Evolution. 2006. Vol. 60, N 2. P. 292–302.

Balakirev E.S. Trans-species polymorphism in mitochondrial genome of camarodont sea urchins // Genes. 2019. Vol. 10, N 8. E592.

Balakirev E.S., Ayala F.J. Is esterase-P a cryptic pseudogene in *Drosophila melanogaster*? // Genetics. 1996. Vol. 144, N 4. P. 1511–1518.

Balakirev E.S., Ayala F.J. Pseudogenes: are they “junk” or functional DNA? // *Annu. Rev. Genetics*. 2003a. Vol. 37. P. 123–151.

Balakirev E.S., Ayala F.J. Nucleotide variation of the *Est-6* gene region in natural populations of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2003b. Vol. 165. P. 1901–1914.

Balakirev E.S., Ayala F.J. Molecular population genetics of the β -*esterase* gene cluster of *Drosophila melanogaster* // *J. Genet.* 2003c. Vol. 82. P. 115–131.

Balakirev E.S., Ayala F.J. The β -*esterase* gene cluster of *Drosophila melanogaster*: Is ψ *Est-6* a pseudogene, a functional gene, or both? // *Genetica*. 2004a. Vol. 121. P. 165–179.

Balakirev E.S., Ayala F.J. Nucleotide variation in the *tinman* and *bagpipe* homeobox genes of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2004b. Vol. 166. P. 1845–1856.

Balakirev E.S., Balakirev E.I., Rodriguez-Trelles F., Ayala F.J. Molecular evolution of two linked genes, *Est-6* and *Sod*, in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1999. Vol. 153. P. 1357–1369.

Balakirev E.S., Balakirev E.I., Ayala F.J. Molecular evolution of the *Est-6* gene in *Drosophila melanogaster*: Contrasting patterns of DNA variability in adjacent functional regions // *Gene*. 2002. Vol. 288. P. 167–177.

Balakirev E.S., Chechetkin V.R., Lobzin V.V., Ayala F.J. DNA polymorphism in the β -*esterase* gene cluster of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2003. Vol. 164. P. 533–544.

Balakirev E.S., Chechetkin V.R., Lobzin V.V., Ayala F.J. Entropy and GC content in the β -*esterase* gene cluster of *Drosophila melanogaster* subgroup // *Mol. Biol. Evol.* 2005. Vol. 22, N 10. P. 2063–2072.

Balakirev E.S., Anisimova M., Ayala F.J. Positive and negative selection in the β -*esterase* gene cluster of the *Drosophila melanogaster* subgroup // *J. Mol. Evol.* 2006. Vol. 62, N 4. P. 496–510.

Balakirev E.S., Pavlyuchkov V.A., Ayala F.J. DNA variation and symbiotic associations in phenotypically-diverse sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105, N 42. P. 16218–16223.

Balakirev E.S., Anisimova M., Ayala F.J. Complex interplay of evolutionary forces in the ladybird homeobox genes of *Drosophila melanogaster* // PLoS One. 2011. Vol. 6, N 7. e22613.

Balakirev E.S., Krupnova T.N., Ayala F.J. DNA variation in the phenotypically-diverse brown alga *Saccharina japonica* // BMC Plant Biol. 2012a. Vol. 12. 108.

Balakirev E.S., Krupnova T.N., Ayala F.J. Symbiotic associations in the phenotypically-diverse brown alga *Saccharina japonica* // PLoS One. 2012b. Vol. 7, N 6. e39587.

Balakirev E.S., Romanov N.S., Mikheev P.B., Ayala F.J. Mitochondrial DNA variation and introgression in Siberian taimen *Hucho taimen* // PLoS One. 2013. Vol. 8, N 8. e71147.

Balakirev E.S., Anisimova M., Pavlyuchkov V.A., Ayala F.J. DNA polymorphism and selection at the *bindin* locus in three *Strongylocentrotus* sp. (Echinoidea) // BMC Genetics. 2016a. Vol. 17. 66.

Balakirev E.S., Parensky V.A., Ayala F. J. Complete mitochondrial genomes of the anadromous and resident forms of the lamprey *Lethenteron camtschaticum* // Mitochond. DNA Part A: DNA Mapp. Seq. Anal. 2016b. Vol. 27, N 5. P. 3753–3754.

Balakirev E.S., Pavlyuchkov V.A., Ayala F.J. Complete mitochondrial genome of the phenotypically-diverse sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* (Echinoidea) // Mitochond. DNA Part B: Resources. 2017. Vol. 2, N 2. P. 613–614.

Ballard J.W., Whitlock M.C. The incomplete natural history of mitochondria // Mol. Ecol. 2004. Vol. 13. P. 729–744.

Balment R.J., Lu W., Weybourne E., Warne J.M. Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: a review with insights from mammalian models // Gen. Comp. Endocrin. 2006. Vol. 147. P. 9–16.

Barao K.R., Goncalves G.L., Mielke O.H. et al. Species boundaries in *Philaethria* butterflies: an integrative taxonomic analysis based on genitalia ultrastructure, wing geometric morphometrics, DNA sequences, and amplified fragment length polymorphisms // Zool. J. Linn. Soc. 2014. Vol. 170, N 4. P. 690–709.

Barton N.H. What role does natural selection play in speciation? // Phil. Trans. R. Soc. B. 2010. Vol. 365. P. 1825–1840.

Bergelson J., Roux F. Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana* // Nat. Rev. Genet. 2010. Vol. 11. P. 867–879.

Bernardet J.-F., Vancanneyt M., Matte-Tailliez O. et al. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals // Syst. Appl. Microbiol. 2005. Vol. 28. P. 640–660.

Bernardi G., Nelson P., Paddock M. et al. Genomic islands of divergence in the Yellow Tang and the Brushtail Tang Surgeonfishes // Ecol. Evol. 2018. Vol. 8, N 17. P. 8676–8685.

Bernatchez L., Glémet H., Wilson C.C., Danzmann R.G. Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1995. Vol. 52. P. 179–185.

Bernatchez L., Wellenreuther M., Araneda C. et al. Harnessing the power of genomics to secure the future of seafood // Trends Ecol. Evol. 2017. Vol. 32, N 9. P. 665–680.

Bhattacharya M., Sharma A.R., Patra B.C. DNA barcoding to fishes: current status and future directions // Mitochond. DNA A: DNA Mapp. Seq. Anal. 2016. Vol. 27, N 4. P. 2744–2752.

Biermann C.H. The molecular evolution of sperm bindin in six species of sea urchins (Echinoidea: Strongylocentrotidae) // Mol. Biol. Evol. 1998. Vol. 15. P. 1761–1771.

Blackall L.L., Wilson B., van Oppen M.J.H. Coral-the world's most diverse symbiotic ecosystem // Mol. Ecol. 2015. Vol. 24, N 21. P. 5330–5347.

Bordenstein S.R. Symbiosis and the origin of species. Insect symbiosis. Boca Raton, FL: CRC Press. 2003. P. 283–304.

Briggs J.C. Emergence of a sixth mass extinction? // Biol. J. Linn. Soc. 2017. Vol. 122. P. 243–248.

Brodersen J., Seehausen O. Why evolutionary biologists should get seriously involved in ecological monitoring and applied biodiversity assessment programs // Evol. Appl. 2014. Vol. 7, N 9. P. 968–983.

Bronstein O., Kroh A., Haring E. Do genes lie? Mitochondrial capture masks the Red Sea collector urchin's true identity (Echinodermata: Echinoidea: Tripneustes) // Mol. Phylogenet. Evol. 2016. Vol. 104. P. 1–13.

Calderón I., Turon X., Lessios H.A. Characterization of the sperm molecule bindin in the sea urchin genus *Paracentrotus* // J. Mol. Evol. 2009. Vol. 68. P. 366–376.

Calderón I., Ventura C.R.R., Turon X., Lessios H.A. Genetic divergence and assortative mating between colour morphs of the sea urchin *Paracentrotus gaimardi* // Mol. Ecol. 2010. Vol. 19. P. 484–493.

Cantatore P., Roberti M., Rainaldi G., Gadaleta M.N., Saccone C. The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus* // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 10965–10975.

Caputo B., Pichler V., Mancini E. et al. The last bastion? X chromosome genotyping of *Anopheles gambiae* species pair males from a hybrid zone reveals complex recombination within the major candidate “genomic island of speciation” // Mol. Ecol. 2016. Vol. 25, N 22. P. 5719–5731.

Cea G., Gaitan-Espitia J.D., Cardenas L. Complete mitogenome of the edible sea urchin *Loxechinus albus*: genetic structure and comparative genomics within Echinozoa // Mol. Biol. Rep. 2015. Vol. 42. P. 1081–1089.

Ceballos G., Ehrlich P.R., Barnosky A.D. et al. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction // Sci. Adv. 2015. Vol. 1, N 5. e1400253.

Ceballos G., Ehrlich P.R., Dirzo R. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2017. Vol. 114, N 30. P. E6089–E6096.

Chan K.M.A., Levin S.A. Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA // Evolution. 2005. Vol. 59. P. 720–729.

Charlat S., Hurst G.D.D., Merçot H. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections // Trends Genet. 2003. Vol. 19, N 4. P. 217–223.

Charlesworth D. Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions // PLoS Genet. 2006. Vol. 2, N 4. e64.

Charlesworth B., Nordborg M., Charlesworth D. The effects of local selection, balanced polymorphism and background selection on equilibrium patterns of genetic diversity in subdivided populations // Genet. Res. 1997. Vol. 70. P. 155–174.

Clucas G.V., Kerr L.A., Cadrin S.X. et al. Adaptive genetic variation underlies biocomplexity of Atlantic Cod in the Gulf of Maine and on Georges Bank // PLoS ONE. 2019. Vol. 14, N 5. e0216992.

Coetzee M., Hunt R.H., Wilkerson R. et al. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex // *Zootaxa*. 2013. Vol. 3619. P. 246–274.

Cole J.R., Chai B., Farris R.J. et al. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data // *Nucl. Acids Res.* 2007. Vol. 35. P. D169–D172.

Collevatti R.G., Novaes E., Silva-Junior O.B. et al. A genome-wide scan shows evidence for local adaptation in a widespread keystone Neotropical forest tree // *Heredity*. 2019. Vol. 123, N 2. P. 117–137.

Cruickshank T.E., Hahn M.W. Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are due to reduced diversity, not reduced gene flow // *Mol. Ecol.* 2014. Vol. 23, N 13. P. 3133–3157.

Cuellar-Pinzon J., Presa P., Hawkins S.J. et al. Genetic markers in marine fisheries: types, tasks and trends // *Fish. Res.* 2016. Vol. 173, N SI. P. 194–205.

Cure K., Thomas L., Hobbs J.A. et al. Genomic signatures of local adaptation reveal source-sink dynamics in a high gene flow fish species // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, N 1. 8618.

Darling J.A. Interspecific hybridization and mitochondrial introgression in invasive *carcinus* shore crabs // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, N 3. e17828.

Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9, N 8. P. 772.

De Giorgi C., Martiradonna A., Lanave C., Saccone C. Complete sequence of the mitochondrial DNA in the sea urchin *Arbacia lixula*: conserved features of the echinoid mitochondrial genome // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1996. Vol. 5. P. 323–332.

Depaulis F., Veuille M. Neutrality tests based on the distribution of haplotypes under an infinite-site model // *Mol. Biol. Evol.* 1998. Vol. 15. P. 1788–1790.

DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Keller K. et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes // *Nucl. Acids Res.* 2006. Vol. 34. P. W394–W399.

Des Roches S., Post D.M., Turley N.E. et al. The ecological importance of intraspecific variation // *Nat. Ecol. Evol.* 2018. Vol. 2, N 1. P. 57–64.

De Vos J.M., Joppa L.N., Gittleman J.L. et al. Estimating the normal background rate of species extinction // *Conserv. Biol.* 2015. Vol. 29, N 2. P. 452–462.

Do Prado F.D., Vera M., Hermida M. et al. Parallel evolution and adaptation to environmental factors in a marine flatfish: Implications for fisheries and aquaculture management of the turbot (*Scophthalmus maximus*) // *Evol. Appl.* 2018. Vol. 11, N 8. P. 1322–1341.

Du J., Gu T., Tian H. et al. Grouped nucleotide polymorphism: a major contributor to genetic variation in *Arabidopsis* // *Gene*. 2008. Vol. 426. P. 1–6.

Dupuis J.R., Roe A.D., Sperling F.A. Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough // *Mol. Ecol.* 2012. Vol. 21, N 18. P. 4422–4436.

Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucl. Acids Res.* 2004. Vol. 32, N 5. P. 1792–1797.

Eldon B., Birkner M., Blath J., Freund F. Can the site-frequency spectrum distinguish exponential population growth from multiple-merger coalescents? // *Genetics*. 2015. Vol. 199, N 3. P. 841–856.

Falush D., Wirth T., Linz B. et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations // *Science*. 2003. Vol. 299. P. 1582–1585.

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach // *J. Mol. Evol.* 1981. Vol. 17. P. 368–376.

Feral J.P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2002. Vol. 268, N 2. P. 121–145.

Fernández H., Hughes S., Vigne J.-D. et al. Divergent mtDNA lineages of goats in an Early Neolithic site, far from the initial domestication areas // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. Vol. 103, N 42. P. 15375–15379.

Ferreira M., Fernandes A.M., Aleixo A. et al. Evidence for mtDNA capture in the jacamar *Galbula leucogastra/chalcothorax* species-complex and insights on the evolution of white-sand ecosystems in the Amazon basin // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018. Vol. 129. P. 149–157.

Filatov D.A. PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets // *Mol. Ecol. Notes*. 2002. Vol. 2. P. 621–624.

Fišer C., Robinson C.T., Malard F. Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept // *Mol. Ecol.* 2018. Vol. 27, N 3. P. 613–635.

Flanagan S.P., Forester B.R., Latch E.K. et al. Guidelines for planning genomic assessment and monitoring of locally adaptive variation to inform species conservation // *Evol. Applic.* 2018. Vol. 11, N 7. SI. P. 1035–1052.

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A., McInnes K.H. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge, U.K.: Cambridge Univ. Press. 2nd ed. 2010. 642 p.

Frankham R., Ballou J.D., Ralls K. et al. Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations. New York: Oxford Univ. Press, 2017. 432 p.

Fu Y.-X., Li W.-H. Statistical tests of neutrality of mutations // *Genetics*. 1993. Vol. 133. P. 693–709.

Funk D.J., Wernegreen J.J., Moran N.A. Intraspecific variation in symbiont genomes: bottlenecks and the aphid-Buchnera association // *Genetics*. 2001. Vol. 157. P. 477–489.

Funk D.J., Omland K.E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2003. Vol. 34. P. 397–423.

Galliart M., Bello N., Knapp M. et al. Local adaptation, genetic divergence, and experimental selection in a foundation grass across the US Great Plains' climate gradient // *Global Change Biol.* 2019. Vol. 25, N 3. P. 850–868.

Gao B., Klein L.E., Britten R.J., Davidson E.H. Sequence of mRNA coding for bindin, a species-specific sea urchin sperm protein required for fertilization // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986. Vol. 83. P. 8634–8638.

Garcia de Leaniz C., Fleming I.A., Einum S. et al. A critical review of adaptive genetic variation in Atlantic salmon: implications for conservation // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2007. Vol. 82. P. 173–211.

Geyer L.B., Lessios H. Lack of character displacement in the male recognition molecule, bindin, in Atlantic sea urchins of the genus *Echinometra* // *Mol. Biol. Evol.* 2009. Vol. 26. P. 2135–2146.

Giska I., Sechi P., Babik W. Deeply divergent sympatric mitochondrial lineages of the earthworm *Lumbricus rubellus* are not reproductively isolated // *BMC Evol. Biol.* 2015. Vol. 15. 217.

Good J.M., Vanderpool D., Keeble S., Bi K. Negligible nuclear introgression despite complete mitochondrial capture between two species of chipmunks // *Evolution*. 2015. Vol. 69. P. 1961–1972.

Grant W.S. Understanding the adaptive consequences of hatchery-wild interactions in Alaska salmon // *Environ. Biol. Fish.* 2012. Vol. 94. P. 325–342.

Grant W.S., Jasper J., Bekkevold D., Adkison M. Responsible genetic approach to stock restoration, sea ranching and stock enhancement of marine fishes and invertebrates // Rev. Fish Biol. Fisheries. 2017. Vol. 27. P. 615–649.

Guichoux E., Garnier-Géré P., Lagache L. et al. Outlier loci highlight the direction of introgression in oaks // Mol. Ecol. 2013. Vol. 22, N 2. P. 450–462.

Haasl R., Payseur B.A. Fifteen years of genomewide scans for selection: trends, lessons and unaddressed genetic sources of complication // Mol. Ecol. 2016. Vol. 25, N 1. P. 5–23.

Hasegawa M., Cao Y., Yang Z. Preponderance of slightly deleterious polymorphism in mitochondrial DNA: Nonsynonymous/synonymous rate ratio is much higher within species than between species // Mol. Biol. Evol. 1998. Vol. 15. P. 1499–1505.

Haubold B., Kroymann J., Ratzka A. et al. Recombination and gene conversion in a 170-kb genomic region of *Arabidopsis thaliana* // Genetics. 2002. Vol. 161. P. 1269–1278.

Hauser L., Carvalho G.R. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts // Fish Fisher. 2008. Vol. 9. P. 333–362.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. R. Soc. Lond. B. 2003. Vol. 270, N 1512. P. 313–321.

Hedgecock D., Pudovkin A.I. Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary // Bull. Mar. Sci. 2011. Vol. 87. P. 971–1002.

Hemmer-Hansen J., Nielsen E.E., Frydenberg J., Loeschcke V. Adaptive divergence in a high gene flow environment: Hsc70 variation in the European flounder (*Platichthys flesus* L.) // Heredity. 2007. Vol. 99, N 6. P. 592–600.

Hench K., Vargas M., Höppner M.P., McMillan W.O., Puebla O. Interchromosomal coupling between vision and pigmentation genes during genomic divergence // Nat. Ecol. Evol. 2019. Vol. 3. P. 657–667.

Hendry A.P., Gotanda K.M., Svensson E.I. Human influences on evolution, and the ecological and societal consequences // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2017. Vol. 372, N 1712. 20160028.

Herbeck J.T., Funk D.J., Degnan P.H., Wernegreen J.J. A conservative test of genetic drift in the endosymbiotic bacterium *Buchnera*: slightly deleterious mutations in the chaperonin groEL // Genetics. 2003. Vol. 165. P. 1651–1660.

Hermansen R.A., Oswald B.P., Knight S. et al. The Adaptive Evolution Database (TAED): A new release of a database of phylogenetically indexed gene families from chordates // *J. Mol. Evol.* 2017. Vol. 85, N 1–2. P. 46–56.

Hoban S.M., Mezzavilla M., Gaggiotti O.E. et al. High variance in reproductive success generates a false signature of a genetic bottleneck in populations of constant size: a simulation study // *BMC Bioinform.* 2013. Vol. 14. 309.

Hoey J.A., Pinsky M.L. Genomic signatures of environmental selection despite near-panmixia in summer flounder // *Evol. Appl.* 2018. Vol. 11, N 9. P. 1732–1747.

Höglund J. Evolutionary Conservation Genetics. New York: Oxford Univ. Press, 2009. 208 p.

Hogner S., Laskemoen T., Lifjeld J.T. et al. Deep sympatric mitochondrial divergence without reproductive isolation in the common redstart *Phoenicurus phoenicurus* // *Ecol. Evol.* 2012. Vol. 2. P. 2974–2988.

Holderegger R., Kamm U., Gugerli F. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics // *Landscape Ecol.* 2006. Vol. 21, N 6. P. 797–807.

Hu M., Chilton N.B., Gasser R.B. The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: Recent progress, and implications for population genetics and systematic // *Adv. Parasitol.* 2004. Vol 56. P. 133–212.

Huber T., Faulkner G., Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments // *Bioinformatics.* 2004. Vol. 20. P. 2317–2319.

Hudson R.R. Properties of a neutral allele model with intragenic recombination // *Theor. Popul. Biol.* 1983. Vol. 23. P. 183–201.

Hudson R.R. Gene genealogies and the coalescent process // *Oxf. Surv. Biol.* 1990. Vol. 7. P. 1–44.

Hudson R.R. Two-locus sampling distributions and their application // *Genetics.* 2001. Vol. 159. P. 1805–1817.

Hudson R.R. Generating samples under a Wright-Fisher neutral model of genetic variation // *Bioinformatics.* 2002. Vol. 18. P. 337–338.

Hudson R.R., Kaplan N. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences // *Genetics.* 1985. Vol. 111. P. 147–164.

Hudson R.R., Kreitman M., Aguadé M. A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data // *Genetics*. 1987. Vol. 116. P. 153–159.

Hudson R.R., Kaplan N. The coalescent process in models with selection and recombination // *Genetics*. 1988. Vol. 120. P. 831–840.

Hudson R.R., Bailey K., Skarecky D. et al. Evidence for positive selection in the superoxide dismutase (*Sod*) region of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1994. Vol. 136. P. 1329–1340.

Hudson R.R., Sáez A.G., Ayala F.J. DNA variation at the *Sod* locus of *Drosophila melanogaster*: an unfolding story of natural selection // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. Vol. 94. P. 7725–7729.

Hugerth L.W., Andersson A.F. Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: From sampling to hypothesis testing // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. 1561.

Huggett M.J., Williamson J.E., de Nys R. et al. Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae // *Oecologia*. 2006. Vol. 149, N 4. P. 604–619.

Hurst G.D.D., Werren J.H. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution // *Nat. Rev.* 2001. Vol. 2. P. 597–606.

Jaarola M., Searle J.B. A highly divergent mitochondrial DNA lineage of *Microtus agrestis* in southern Europe // *Heredity*. 2004. Vol. 92. P. 228–234.

Jacobs H.T., Elliott D.J., Math V.B., Farquharson A. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA // *J. Mol. Biol.* 1988. Vol. 202. P. 185–217.

James J.E., Piganeau G., Eyre-Walker A. The rate of adaptive evolution in animal mitochondria // *Mol. Ecol.* 2016. Vol. 25. P. 67–78.

Johannesson K. What can be learnt from a snail? // *Evol. Appl.* 2015. Vol. 9, N 1. P. 153–165.

Jorde P.E., Synnes A.E., Espeland S.H. et al. Can we rely on selected genetic markers for population identification? Evidence from coastal Atlantic cod // *Ecol. Evol.* 2018. Vol. 8, N 24. P. 12547–12558.

Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules. // *Mammalian Protein Metabolism* /H.M. Munro (ed.). New York: Academic Press, 1969. P. 21–120.

Kang B., Liu M., Huang X.-X. et al. Fisheries in Chinese seas: What can we learn from controversial official fisheries statistics? // *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 2018. Vol. 28, N 3. P. 503–519.

Kelly J.K. A test of neutrality based on interlocus associations // *Genetics*. 1997. Vol. 146. P. 1197–1206.

Kim Y., Nielsen R. Linkage disequilibrium as a signature of selective sweeps // *Genetics*. 2004. Vol. 167, N 3. P. 1513–1524.

Kim K.K., Kim M.K., Lim J.H. et al. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. Vol. 55. P. 1287–1293.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. Vol. 16, N 2. P. 111–120.

Kimura M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1983. 386 p.

Kimura M. The role of compensatory neutral mutations in molecular evolution // *J. Genet.* 1985. Vol. 64, N 1. P. 7–19.

Kingman J.F.C. The coalescent // *Stoch. Proc. Appl.* 1982. Vol. 13, N 3. P. 235–248.

Kirby D.A., Stephan W. Haplotype test reveals departure from neutrality in a segment of the *white* gene of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1995. Vol. 141, N 4. P. 1483–1490.

Kirk H., Freeland J.R. Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. Vol. 12. P. 3966–3988.

Knowlton N. Sibling species in the sea // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1993. Vol. 24. P. 189–216.

Knowlton N. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea // *Hydrobiologia*. 2000. Vol. 420. P. 73–90.

Koricheva J., Hayes D. The relative importance of plant intraspecific diversity in structuring arthropod communities: A meta-analysis // *Funct. Ecol.* 2018. Vol. 32. P. 1704–1717.

Kuntz T.M., Gilbert J.A. Introducing the microbiome into precision medicine // *Trends Pharm. Sci.* 2017. Vol. 38, N 1. P. 81–91.

Kuparinen A., Festa-Bianchet M. Harvest induced evolution: insights from aquatic and terrestrial systems // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2017. Vol. 372. 20160036.

Kuparinen A., Hutchings J.A. Genetic architecture of age at maturity can generate divergent and disruptive harvest-induced evolution // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2017. Vol. 372. 20160035.

Laikre L., Schwartz M.K., Waples R.S. et al. Compromising genetic diversity in the wild: unmonitored large-scale release of plants and animals // *Trends Ecol. Evol.* 2010. Vol. 25. P. 520–529.

Lee Y.H. Molecular phylogenies and divergence times of sea urchin species of Strongylocentrotidae, Echinoida // *Mol. Biol. Evol.* 2003. Vol. 20. P. 1211–1221.

Leliaert F., Verbruggen H., Vanormelingen P. et al. DNA-based species delimitation in algae // *Eur. J. Phycol.* 2014. Vol. 49, N 2. P. 179–196.

Le Pennec G., Butlin R.K., Jonsson P.R. et al. Adaptation to dislodgement risk on wave-swept rocky shores in the snail *Littorina saxatilis* // *PLoS One.* 2017. Vol. 12, N 10. e0186901.

Leroy G., Carroll E.L., Bruford M.W. et al. Next-generation metrics for monitoring genetic erosion within populations of conservation concern // *Evol. Appl.* 2017. Vol. 11, N 7. P. 1066–1083.

Lessios H.A. Speciation genes in free-spawning marine invertebrates // *Integr. Compar. Biol.* 2011. Vol. 51, N 3. P. 456–465.

Lewontin R.C. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models // *Genetics.* 1964. Vol. 49. P. 49–67.

Lewontin R.C. The detection of linkage disequilibrium in molecular sequence data // *Genetics.* 1995. Vol. 140. P. 377–388.

Li G., Quiros C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* // *Theor. Appl. Genet.* 2001. Vol. 103. P. 455–461.

Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics.* 2009. Vol. 25. P. 1451–1452.

Lindquist N., Barber P.H., Weisz J.B. Episymbiotic microbes as food and defence for marine isopods: unique symbioses in a hostile environment // *Proc. R. Soc. B.* 2005. Vol. 272. P. 1209–1216.

Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. Vol. 71. P. 8228–8235.

Malinsky M., Challis R.J., Tyers A.M. et al. Genomic islands of speciation separate cichlid ecomorphs in an East African crater lake // *Science.* 2015. Vol. 350. P. 1493–1498.

Manchenko G.P., Yakovlev S.N. Genetic divergence between three sea urchin species of the genus *Strongylocentrotus* from the Sea of Japan // *Biochem. Syst. Ecol.* 2001. Vol. 29. P. 31–44.

Marlétaz F., Le Parco Y., Liu S., Peijnenburg K.T.C.A. Extreme mitogenomic variation in natural populations of chaetognaths // *Genome Biol. Evol.* 2017. Vol. 9, N 6. P. 1374–1384.

Martin A.P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. Vol. 68. P. 3673–3682.

Martin D.P., Murrell B., Golden M. et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes // *Virus Evol.* 2015. Vol. 1, N 1. vev003.

Mashkaryan V., Vamberger M., Arakelyan M. et al. Gene flow among deeply divergent mtDNA lineages of *Testudo graeca* (Linnaeus, 1758) in Transcaucasia // *Amphibia-Reptilia.* 2013. Vol. 34. P. 337–351.

Mateus C.S., Stange M., Berner D. et al. Strong genome-wide divergence between sympatric European river and brook lampreys // *Curr. Biol.* 2013. Vol. 23, N 15. P. 649–650.

Mathieson I., Lazaridis I., Rohland N. et al. Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians // *Nature.* 2015. Vol. 528, N 7583. P. 499–503.

Maynard Smith J., Haigh J. The hitch-hiking effect of a favourable gene // *Genet. Res.* 1974. Vol. 23, N 1. P. 23–35.

McCartney M.A., Lessios H.A. Adaptive evolution of sperm binding tracks egg incompatibility in neotropical sea urchins of the genus *Echinometra* // *Mol. Biol. Evol.* 2004. Vol. 21. P. 732–745.

McDonald J.H. Detecting non-neutral heterogeneity across a region of DNA sequence in the ratio of polymorphism to divergence // *Mol. Biol. Evol.* 1996. Vol. 13. P. 253–260.

McDonald J.H. Improved tests for heterogeneity across a region of DNA sequence in the ratio of polymorphism to divergence // *Mol. Biol. Evol.* 1998. Vol. 15. P. 377–384.

McDonald J.H., Kreitman M. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila* // *Nature.* 1991. Vol. 351. P. 652–654.

McFarlane S.E., Pemberton J.M. Detecting the true extent of introgression during anthropogenic hybridization // *Trends Ecol. Evol.* 2019. Vol. 34, N 4. P. 315–326.

McVean G., Awadalla P., Fearnhead P. A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences // *Genetics*. 2002. Vol. 160. P. 1231–1241.

Metz E.C., Palumbi S.R. Positive selection and sequence rearrangements generate extensive polymorphism in the gamete recognition protein bindin // *Mol. Biol. Evol.* 1996. Vol. 13. P. 397–406.

Milano I., Babbucci M., Cariani A. et al. Outlier SNP markers reveal fine-scale genetic structuring across European hake populations (*Merluccius merluccius*) // *Mol. Ecol.* 2014. Vol. 23, N 1. P. 118–135.

Mills L.S. Conservation of Wildlife Populations. Demography, Genetics, and Management. Oxford, U.K.: John Wiley & Sons, Ltd. 2nd ed. 2013. 326 p.

Mimura M., Yahara T., Faith D.P. et al. Understanding and monitoring the consequences of human impacts on intraspecific variation // *Evol. Appl.* 2017. Vol. 10, N 2. P. 121–139.

Minor J.E., Fromson D.R., Britten R.J., Davidson E.H. Comparison of the bindin proteins of *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus*, and *Lytechinus variegatus*: sequences involved in the species specificity of fertilization // *Mol. Biol. Evol.* 1991. Vol. 8. P. 781–795.

Miya M., Nishida M. The mitogenomic contributions to molecular phylogenetics and evolution of fishes: a 15-year retrospect // *Ichthyol. Res.* 2014. Vol. 62. P. 29–71.

Moran N. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. Vol. 104. P. 8627–8633.

Moy G.W., Vacquier V.D. Bindin genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* // *Gene*. 2008. Vol. 423. P. 215–220.

Moy G.W., Springer S.A., Adams S.L. et al. Extraordinary intraspecific diversity in oyster sperm bindin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105. P. 1993–1998.

Moya A., Peretó J., Gil R., Latorre A. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses // *Nat. Rev. Genet.* 2008. Vol. 9. P. 218–229.

Naciri Y., Linder H.P. Species delimitation and relationships: The dance of the seven veils // *Taxon*. 2015. Vol. 64, N 1. P. 3–16.

Nadeau N., Jiggins C.D. A golden age for evolutionary genetics? Genomic studies of adaptation in natural populations // *Trends Genet.* 2010. Vol. 26, N 11. P. 484–492.

Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.

Nielsen E.S., Henriques R., Toonen R.J. et al. Complex signatures of genomic variation of two non-model marine species in a homogeneous environment // *BMC Genomics*. 2018. Vol. 19, N 1. 347.

Nielsen R., Weinreich D.M. The age of nonsynonymous and synonymous mutations in animal mtDNA and implications for the mildly deleterious theory // *Genetics*. 1999. Vol. 153. P. 497–506.

Nielsen R. Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics // *Heredity*. 2001. Vol. 86. P. 641–647.

Nielsen E.E., Cariani A., Aoidh E.M. et al. Gene-associated markers provide tools for tackling illegal fishing and false eco-certification // *Nat. Commun.* 2012. Vol. 3. 851.

Nordborg M. Structured coalescent processes on different time scales // *Genetics*. 1997. Vol. 146. P. 1501–1514.

Nosil P., Funk D.J., Ortiz-Barrientos D. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence // *Mol. Ecol.* 2009. Vol. 18, N 3. P. 375–402.

Nwankwo E.C., Pallari C.T., Hadjioannou L. et al. Rapid song divergence leads to discordance between genetic distance and phenotypic characters important in reproductive isolation // *Ecol. Evol.* 2018. Vol. 8, N 1. P. 716–731.

Ohta T. The nearly neutral theory of molecular evolution // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1992. Vol. 23. P. 263–286.

Orr H.A., Masly J.P., Presgraves D.C. Speciation genes // *Curr. Opin. Genet. Develop.* 2004. Vol. 14. P. 675–679.

Osio G.C., Orio A., Millar C.P. Assessing the vulnerability of Mediterranean demersal stocks and predicting exploitation status of unassessed stocks // *Fish. Res.* 2015. Vol. 171. P. 110–121.

Palumbi S.R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1994. Vol. 25. P. 547–572.

Palumbi S.R. Speciation and the evolution of gamete recognition genes: pattern and process // *Heredity*. 2009. Vol. 102, N 1. P. 66–76.

Pampoulie C., Ruzzante D.E., Chosson V. et al. The genetic structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) around Iceland: insight from microsatellites, the *Pan I* locus, and tagging experiments // *Can. J. Genet. Cytol.* 2006. Vol. 63, N 12. P. 2660–2674.

Pardo-Diaz C., Salazar C., Jiggins C.D. Towards the identification of the loci of adaptive evolution // *Methods Ecol. Evol.* 2015. Vol. 6. P. 445–464.

Park Y.J., Lee J.K., Kim N.S. Simple sequence repeat polymorphisms (SSRPs) for evaluation of molecular diversity and germplasm classification of minor crops // *Molecules.* 2009. Vol. 14, N 11. P. 4546–4569.

Pauly D., Zeller D. Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. 10244.

Pavlova A., Amos J.N., Joseph L. et al. Perched at the mito-nuclear crossroads: divergent mitochondrial lineages correlate with environment in the face of ongoing nuclear gene flow in an Australian bird // *Evolution.* 2013. Vol. 67, N 12. P. 3412–3428.

Payne J.L., Bush A.M., Heim N.A. et al. Ecological selectivity of the emerging mass extinction in the oceans // *Science.* 2016. Vol. 353, N 6305. P. 1284–1286.

Pelletier F., Coltman D.W. Will human influences on evolutionary dynamics in the wild pervade the Anthropocene? // *BMC Biol.* 2018. Vol. 16, N 1. 7.

Pespeni M.H., Palumbi S.R. Signals of selection in outlier loci in a widely dispersing species across an environmental mosaic // *Mol. Ecol.* 2013. Vol. 22, N 13. P. 3580–3597.

Pfenninger M., Schwenk K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions // *BMC Evol. Biol.* 2007. Vol. 7. 121.

Phair N.L., Toonen R.J., Knapp I. et al. Shared genomic outliers across two divergent population clusters of a highly threatened seagrass // *PeerJ.* 2019. Vol. 7. e6806.

Pinsky M.L., Palumbi S.R. Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations // *Mol. Ecol.* 2014. Vol. 23, N 1. P. 29–39.

Pombi M., Kengne P., Gimonneau G. et al. Dissecting functional components of reproductive isolation among closely related sympatric species of the *Anopheles gambiae* complex // *Evol. Appl.* 2017. Vol. 10, N 10. P. 1102–1120.

Pons J.M., Sonsthagen S., Dove C., Crochet P.A. Extensive mitochondrial introgression in North American Great Black-backed Gulls (*Larus marinus*) from the American Herring Gull (*Larus smithsonianus*) with little nuclear DNA impact // *Heredity.* 2014. Vol. 112. P. 226–239.

Population Genetics and Fishery Management /N. Ryman and F. Utter (ed.). Washington Sea Grant Program. Seattle, London: Washington Univ. Press, 1987. 420 p.

Pujolar J.M., Pogson G.H. Positive Darwinian selection in gamete recognition proteins of *Strongylocentrotus* sea urchins // *Mol. Ecol.* 2011. Vol. 20. P. 4968–4982.

Rand D.M. The units of selection on mitochondrial DNA // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2001. Vol. 32. P. 415–448.

Resch A.M., Carmel L., Mariño-Ramírez L. et al. Widespread positive selection in synonymous sites of mammalian genes // *Mol. Biol. Evol.* 2007. Vol. 24. P. 1821–1831.

Rhymer J.M., Simberloff D. Extinction by hybridization and introgression // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1996. Vol. 27. P. 83–109.

Roberts D.W., Wolfe A.D. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: a potential resource for studies in plant molecular biology // *Appl. Plant. Sci.* 2014. Vol. 2, N 7. 1400017.

Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Syst. Biol.* 2012. Vol. 61. P. 1–4.

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

Sargsyan O., Wakeley J. A coalescent process with simultaneous multiple mergers for approximating the gene genealogies of many marine organisms // *Theor. Popul. Biol.* 2008. Vol. 74. P. 104–114.

Schaeffer S.W., Miller E.L. Estimates of linkage disequilibrium and the recombination parameter determined from segregating nucleotide sites in the alcohol dehydrogenase region of *Drosophila pseudoobscura* // *Genetics.* 1993. Vol. 135, N 2. P. 541–552.

Schwartz M.K., Luikart G., Waples R.S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management // *Trends Ecol. Evol.* 2007. Vol. 22, N 1. P. 25–33.

Schwarz G.E. Estimating the dimension of a model // *Ann. Stat.* 1978. Vol. 6. P. 461–464.

Schwentner M., Timms B.V., Richter S. An integrative approach to species delineation incorporating different species concepts: a case study of

Limnadopsis (Branchiopoda: Spinicaudata) // Biol. J. Linn. Soc. 2011. Vol. 104. P. 575–599.

Sella G., Petrov D.A., Przeworski M., Andolfatto P. Pervasive natural selection in the *Drosophila* genome? // PLoS Genet. 2009. Vol. 5, N 6. e1000495.

Sequeira F., Sodr  D., Ferrand N. et al. Hybridization and massive mtDNA unidirectional introgression between the closely related Neotropical toads *Rhinella marina* and *R. schneideri* inferred from mtDNA and nuclear markers // BMC Evol. Biol. 2011. Vol. 11. 264.

Sheets E.A., Warner P.A., Palumbi S.R. Accurate population genetic measurements require cryptic species identification in corals // Coral Reefs. 2018. Vol. 37, N 2. P. 549–563.

Shoemaker D.D., Katju V., Jaenike J.J. *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria* // Evolution. 1999. Vol. 53. P. 1157–1164.

Silliman K. Population structure, genetic connectivity, and adaptation in the Olympia oyster (*Ostrea lurida*) along the west coast of North America // Evol. Appl. 2019. Vol. 12, N 5. P. 923–939.

Sloan D.B., Havird J.C., Sharbrough J. The on-again, off-again relationship between mitochondrial genomes and species boundaries. // Mol. Ecol. 2017. Vol. 26, N 8. P. 2212–2236.

Stephan W. The rate of compensatory evolution // Genetics. 1996. Vol. 144, N 1. P. 419–426.

Stewart F.J., Newton I.L.G., Cavanaugh C.M. Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic-anoxic interfaces // Trends Microbiol. 2005. Vol. 13. P. 439–448.

Strobeck C. Expected linkage disequilibrium for a neutral locus linked to a chromosomal arrangement // Genetics. 1983. Vol. 103. P. 545–555.

Studer R.A., Penel S., Duret L., Robinson-Rechavi M. Pervasive positive selection on duplicated and nonduplicated vertebrate protein coding genes // Genome Res. 2008. Vol. 18, N 9. P. 1393–1402.

Suzuki M., Nakagawa Y., Harayama S., Yamamoto S. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophage-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. Vol. 51. P. 1639–1652.

Swanson W.J., Vacquier V.D. Reproductive protein evolution // Annu. Rev. Ecol. Syst. 2002. Vol. 33. P. 161–179.

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Genetics. 1989. Vol. 123. P. 585–595.

Tajima K., Hirano T., Shimizu M., Ezura Y. Isolation and pathogenicity of the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // Fish. Sci. 1997a. Vol. 63. P. 249–252.

Tajima K., Hirano T., Nakano K., Ezura Y. Taxonomical study on the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // Fish. Sci. 1997b. Vol. 63. P. 897–900.

Takahata N., Satta Y. Footprints of intragenic recombination at HLA loci // Immunogenetics. 1998. Vol. 47. P. 430–441.

Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. P. 2725–2729.

Tarvin R.D., Powell E.A., Santos J.C. et al. The birth of aposematism: High phenotypic divergence and low genetic diversity in a young clade of poison frogs // Mol. Phylogenet. Evol. 2017. Vol. 109. P. 283–295.

Teeter K., Naeemuddin M., Gasperini R. et al. Haplotype dimorphism in a SNP collection from *Drosophila melanogaster* // J. Exp. Zool. 2000. Vol. 288. P. 63–75.

Tellier A., Lemaire C. Coalescence 2.0: a multiple branching of recent theoretical developments and their applications // Mol. Ecol. 2014. Vol. 23, N 11. P. 2637–2652.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.

Toews D.P., Brelsford A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals // Mol. Ecol. 2012. Vol. 21. P. 3907–3930.

Tominaga K., Watanabe K., Kakioka R. et al. Two highly divergent mitochondrial DNA lineages within *Pseudogobio esocinus* populations in central Honshu, Japan // Ichthyol. Res. 2009. Vol. 56, N 2. P. 195–199.

Toon A., Daghish G.J., Ridley A.W. et al. Random mating between two widely divergent mitochondrial lineages of *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Laemophloeidae): A test of species limits in a phosphine-resistant stored product // Pest. J. Econ. Entomol. 2016. Vol. 109, N 5. P. 2221–2228.

Turner T.L., Hahn M.W., Nuzhdin S.V. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae* // PLoS Biol. 2005. Vol. 3, N 9. e285.

Ueda H. Physiological mechanism of homing migration in Pacific salmon from behavioral to molecular biological approaches // Gen. Comp. Endocrinol. 2011. Vol. 170, N 2. P. 222–232.

Utter F.M. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective // J. Fish Biol. 1991. Vol. 39. P. 1–20.

Vacquier V.D., Moy G.W. Isolation of bindin: the protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1977. Vol. 74, N 6. P. 2456–2460.

Vacquier V.D., Swanson W.J., Hellberg M.E. What have we learned about sea urchin sperm bindin? // Dev. Growth. Differ. 1995. Vol. 37. P. 1–10.

Van Belleghem S.M., Rastas P., Papanicolaou A. et al. Complex modular architecture around a simple toolkit of wing pattern genes // Nat. Ecol. Evol. 2017. Vol. 1, N 3. 0052.

Vieira M.L., Santini L., Diniz A.L. Munhoz Cde F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful // Genet. Mol. Biol. 2016. Vol. 39, N 3. P. 312–328.

Vijay N., Bossu C.M., Poelstra J.W. et al. Evolution of heterogeneous genome differentiation across multiple contact zones in a crow species complex // Nat. Commun. 2018. Vol. 7. 13195.

von Beeren C., Stoeckle M.Y., Xia J. et al. Interbreeding among deeply divergent mitochondrial lineages in the American cockroach (*Periplaneta americana*) // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. 8297.

Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucl. Acids Res. 1995. Vol. 23. P. 4407–4414.

Wall J.D. Recombination and the power of statistical tests of neutrality // Genet. Res. 1999. Vol. 74. P. 65–79.

Wang I.J., Bradburd G.S. Isolation by environment // Mol. Ecol. 2014. Vol. 23. P. 5649–5662.

Wang Y.-H., Hsiao Y.-W., Lee K.-H. et al. Acoustic differentiation and behavioral response reveals cryptic species within *Buergeria treefrogs* (Anura, Rhacophoridae) from Taiwan // PLoS One. 2017. Vol. 12, N 9. e0184005.

Waples R.S., Punt A.E., Cope J.M. Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? // Fish Fisher. 2008. Vol. 9. P. 423–449.

Watts G.S., Youens-Clark K., Slepian M.J. et al. 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria // J. Appl. Microbiol. 2017. Vol. 123, N 6. P. 1584–1596.

Wayne M.L., Simonsen K. Statistical tests of neutrality in the age of weak selection // Trends Ecol. Evol. 1998. Vol. 13. P. 1292–1299.

Wei C., Dong L., Li S.H. et al. From the Himalayas to a continental island: Integrative species delimitation in the brownish-flanked bush warbler *Horornis fortipes* complex // Mol. Phylogenet. Evol. 2019. Vol. 131. P. 219–227.

Weigand H., Leese F. Detecting signatures of positive selection in non-model species using genomic data // Zool. J. Linn. Soc. 2018. Vol. 184, N 2. P. 528–583.

Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18, N 24. P. 7213–7218.

Wernegreen J.J. Endosymbiosis: Lessons in conflict resolution // PLoS Biol. 2004. Vol. 2, N 3. e68.

Werren J.H. *Wolbachia* and speciation. Endless Forms: Species and Speciation /D.J. Howard, S.H. Berlocher (editors). Oxford: Oxford Univ. Press, 1998. P. 245–260.

Whitlock R. Relationships between adaptive and neutral genetic diversity and ecological structure and functioning: A meta-analysis // J. Ecol. 2014. Vol. 102. P. 857–872.

Whitney J.L., Bowen B.W., Karl S.A. Flickers of speciation: Sympatric colour morphs of the arc-eye hawkfish, *Paracirrhites arcatus*, reveal key elements of divergence with gene flow // Mol. Ecol. 2018. Vol. 27, N 6. P. 1479–1493.

Wilding C.S., Weedall G.D. Morphotypes of the common beadlet anemone *Actinia equina* (L.) are genetically distinct // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2019. Vol. 510. P. 81–85.

Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 8, N 22. P. 6531–6535.

Wirth T., Wang X., Linz B. et al. Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: Lessons from Ladakh // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2004. Vol. 101. P. 4746–4751.

Wolf J.B., Ellegren H. Making sense of genomic islands of differentiation in light of speciation // Nat. Rev. Genet. 2017. Vol. 18, N 2. P. 87–100.

Woo P.C., Lau S.K., Teng J.L. et al. Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories // *Clin. Microbiol. Infect.* 2008. Vol. 14, N 10. P. 908–934.

Worm B., Hilborn R., Baum J.K. et al. Rebuilding global fisheries // *Science*. 2009. Vol. 325, N 5940. P. 578–585.

Wu C.-I., Ting C.-T. Genes and speciation // *Nat. Rev. Genet.* 2004. Vol. 5. P. 114–122.

Yang C.H., Chang H.W., Ho C.H. et al. Conserved PCR primer set designing for closely-related species to complete mitochondrial genome sequencing using a sliding window-based PSO algorithm // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, N 3. e17729.

Yildirim Y., Tinnert J., Forsman A. Contrasting patterns of neutral and functional genetic diversity in stable and disturbed environments // *Ecol. Evol.* 2018. Vol. 8, N 23. P. 12073–12089.

Zhivotovsky L.A., Yurchenko A.A., Nikitin V.D. et al. Eco-geographic units, population hierarchy, and a two-level conservation strategy with reference to a critically endangered salmonid, Sakhalin taimen *Parahucho perryi* // *Conserv. Genet.* 2015. Vol. 16, N 2. P. 431–441.

Zieliński P., Nadachowska-Brzyska K., Wielstra B. et al. No evidence for nuclear introgression despite complete mtDNA replacement in the Carpathian newt (*Lissotriton montandoni*) // *Mol. Ecol.* 2013. Vol. 22. P. 1884–1903.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. 1994. Vol. 20, N 2. P. 176–183.

Zigler K.S., Raff E.C., Popodi E. et al. Adaptive evolution of bindin in the genus *Heliocidaris* is correlated with the shift to direct development // *Evolution*. 2003. Vol. 57. P. 2293–2302.

Zigler K.S., McCartney M.A., Levitan D.R., Lessios H.A. Sea urchin bindin divergence predicts gamete compatibility // *Evolution*. 2005. Vol. 59. P. 2399–2404.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВРЕДНОСНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА АКВАТОРИИ МОРЕЙ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО РЕГИОНА

К.В. Ефимова^{1,2}, Т.Ю. Орлова¹

¹*Национальный научный центр морской биологии (ННЦМБ)
им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041;*

²*Лаборатория экологии и эволюционной
биологии водных организмов,
Дальневосточный федеральный университет,
Владивосток 690091
e-mail: xengen88@gmail.com*

MOLECULAR-ECOLOGICAL MONITORING OF HARMFUL MICROALGAE IN THE SEAS OF THE FAR EASTERN REGION

K.V. Efimova^{1,2}, T.Y. Orlova¹

¹*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center
of Marine Biology, FEB RAS,
Vladivostok 690041;*

²*Laboratory of Ecology and Evolutionary Biology
of Aquatic Organisms,
Far Eastern Federal University, Vladivostok 690091
e-mail: xengen88@gmail.com*

Обобщены результаты молекулярно-экологического мониторинга вредоносных цветений водорослей (ВЦВ) дальневосточных морей России за период 2014–2018 гг. В ходе выполнения проекта были дополнены сведения о флоре, филогении, генетическом разнообразии вредоносных и токсичных видов акватории Японско-

го и Берингова морей. Выявлено, что в рекреационных и промысловых районах этих морей массовые цветения и токсичные приливы были вызваны продуцентами палитоксинов, диарейных токсинов, ихтиотоксинов, а также видами, формирующими высокоплотные биомассы, которые вызывают аноксию, гипоксию и повре-

ждение жабр рыб. Массовая гибель горбуши в Олюторском заливе была вызвана цветением продуцента тяжелых нейротоксинов *Alexandrium fundyense*. Выявлены и описаны новый для науки вид и уникальные штаммы известных микроводорослей; некоторые из них впервые обнаружены в Тихом океане и морях России. Большинство обнаруженных микроводорослей представляют ценность в области биотехнологии, фармацевтики, косметической и биотехнологической промышленности во всем мире.

The results of molecular-ecological monitoring of harmful algal blooms (HABs) of the Far Eastern seas of Russia are summarized for the period 2014–2018. During the project, additional information on the flora, phylogeny, and genetic diversity of HAB and toxic species was obtained from

the coastal waters of the Sea of Japan and the Bering Sea. It was revealed that HAB and toxic tides in recreational and fishing areas were caused by the producers of palytoxins, diarrheal toxins, ichthyotoxins, as well as the high-biomass producers who can cause hypoxia, anoxia and fish gill damage. Massive salmon deaths in the Gulf Olyutorskii are caused by the producer of heavy neurotoxins and high-biomass, dinoflagellates *Alexandrium fundyense*. New species and unique strains of known microalgae have been identified and described; some of them have been found in the Pacific Ocean and the seas of Russia for the first time. Most of the considered microalgae have variety applications in biotechnology, food, pharmaceuticals and cosmetics around the world.

Введение

Вследствие быстрой урбанизации и развития прибрежных районов, а также сопутствующего загрязнения сточными водами, прибрежные зоны и водно-болотные угодья являются одними из наиболее подверженных стрессу природных систем в мире. По мере увеличения антропогенного загрязнения многие устьевые и морские прибрежные воды подвергаются более частым и обширным вредоносным цветениям водорослей (ВЦВ) (Hallegraeff, 1993; Heisler et al., 2008).

Стратегии, применяемые для мониторинга и управления ВЦВ в прибрежных водах, защиты рыбных ресурсов, минимизации экономических и экосистемных потерь, защиты здоровья населения, существенно различаются в зависимости от локализации и типа ВЦВ (NHMRC, 2008). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рассмотрела это явление в рамках Руководства по безопасным рекреационным водным средам в 2003 г.

(WHO, 2003), рекомендовав проводить адекватное планирование контроля в районах, потенциально попадающих под угрозу, включая оценку риска, управление и опрос населения.

ВЦВ обычно дифференцируют в две группы. К первой группе относятся виды, которые производят сильнодействующие токсины, имеющие широкий спектр воздействий на морские ресурсы напрямую или через трофические цепи. Ко второй группе относятся виды, вызывающие нетоксичные ВЦВ, которые могут наносить ущерб экосистемам и коммерческим объектам, в том числе опреснительным установкам, из-за биомассы скопившихся водорослей. Цветения ускоряют засорение фильтров среды или способствуют (био)загрязнению мембран предварительной обработки и обратного осмоса.

Морские биотоксины представляют собой химические соединения, продуцируемые через пути вторичного метаболизма у некоторых микроводорослей, в частности динофлагеллят и диатомовых водорослей (Ajani et al., 2017). Эти контаминаты накапливаются в рыбе, крабах, омарах, двустворчатых моллюсках (мидии, устрицы, морские гребешки) и вызывают отравление у потребителей морепродуктов, а также животных и птиц. Приблизительно 60000 интоксикаций в год регистрируются у людей во всем мире, со средней смертностью ~ 1,5% (Kantiani et al., 2010). При этом не учитываются случаи длительного поступления малых доз токсинов, которые, вызывая мутации в онкогенах, могут спровоцировать развитие злокачественных новообразований (Fujiki et al., 1988; García et al., 2004).

Во всем мире программы экологического мониторинга опираются на комбинацию подходов, включающие оценки представленности различных видов, подход, который особенно проблематичен при исследовании территорий, где в условиях симпатрии встречаются как токсичные, так и нетоксичные виды (John et al., 2014).

Несмотря на то множество известных видов фитопланктона и водорослей считающихся опасными, они по-прежнему представляют собой лишь небольшую долю из десятков тысяч видов водорослей Мирового океана. Лундхольм и соавторы (см. Lundholm et al., 2017) представили список 144 известных на то время вредоносных видов. Список содержит виды-продуценты токсинов и соединений, не являющихся токсинами (например, антибиотики, активные формы кислорода, полиненасыщенные жирные кислоты, слизь), но представляющим смертельную опасность для морских животных. В список входят также виды, образующие плотные массовые цветения.

ния. Клетки могут достигать концентраций, достаточных для того, чтобы вода приобретала цвет («красный, коричневый, зелёный и золотистый приливы»), хотя также отмечаются вспышки бесцветных приливов. Используемые в настоящее время меры по борьбе с ВЦВ предполагают физическое, химическое или биологическое воздействие и применяются в пресноводных и морских системах для контроля ВЦВ в любых масштабах (Sengco et al., 2005; Zheng et al., 2013; Wang et al., 2014, 2015; Sun et al., 2015; Yu et al., 2017). Большинство из разработанных химических и физико-химических методов видоспецифичны, что является одним из ключевых обоснований для проведения генотипирования и точной идентификации. Молекулярно-генетические методы позволяют не только решить задачу в короткие сроки, но также являются единственным возможным инструментом в установлении видовой принадлежности криптоических микроводорослей (Monti et al., 2007; Penna et al., 2007; Perini et al., 2011).

Происходящие изменения климата, которые будут способствовать формированию цветений, а также увеличение активности человека в прибрежных районах и внесение с балластными водами патогенных и чужеродных видов-вселенцев, вероятно, в ближайшие годы значительно увеличат уже существующую негативную нагрузку от ВЦВ.

Основываясь на ежегодном «Обзоре состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации» (последний выпуск за 2017 г. доступен на сайте Росгидромета <http://www.meteorf.ru/>), за последние годы прибрежные районы страны показывают в основном ухудшение качества вод. Качество прибрежных вод дальневосточных морей ухудшилось от «умеренно загрязненных» до «грязных». Внимание обращают на себя загрязнения биогенными элементами и их соединениями (азот, N; фосфор, P; кремний, Si; железо, Fe), как основные триггеры развития фитопланктона (Li et al., 2015). Логично, что в данном регионе проблема вредоносных видов микроводорослей обострилась. С 2007 г. на базе Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (ИБМ ДВО РАН) (ныне Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского (ННЦМБ ДВО РАН) был официально создан Центр мониторинга вредоносных микроводорослей и биотоксичности прибрежных морских акваторий Дальнего Востока РФ (<http://www.imb.dvo.ru/misc/toxicalgae/index.htm>). Отсутствие официально зафиксированных случаев отравления у тихоокеанского побережья России может быть связано с недостатком исследований фитопланктона на некоторых слабоизученных акваториях, отсутствием системы обязательного

государственного мониторинга ВЦВ, отсутствием постоянного санитарного контроля фикотоксина в морепродуктах, по сравнению с европейскими странами и соседним государствам АТР. Кроме того, неспецифичность клинической картины отравления при длительном поступлении малых доз токсинов и другие причины могут объяснить, почему такие случаи отравлений не были детектированы (Орлова, 2005; Вершинин, Орлова, 2008; Orlova et al., 2002). Применение генетических методов идентификации вредоносных микроводорослей на акватории дальневосточных морей было запущено нами в 2012 г. с выходом публикации в 2014 г. (Efimova et al., 2014). Одной из ключевых организационно-методических принципов мониторинга является использование экспресс-методов оценки состава компонентов, к которым относят молекулярные методы диагностики (Medlin, Kooistra, 2010). Традиционно идентификация проводится методом секвенирования, и общепринятыми генами являются малая (18S, *SSU*) и большая (28S, *LSU*) субъединицы ядерной рибосомной ДНК/РНК, с последующим редактированием хроматограмм и выравниванием нуклеотидных последовательностей с референсной базой (Guillou et al., 2002; Casabianca et al., 2017). Для экологического мониторинга важно знать не только видовую принадлежность потенциально опасных объектов, угрожающих акватории, но и наличие, способность и особенности синтеза вторичных метаболитов (поликетидов), к которым относят различные соединения, в частности токсины, антибиотики и статины. Учитывая это, важными геномными участками, помимо общепринятых генов пула рибосомальной РНК (рРНК), для идентификации и мониторинга являются гены поликетидсинтаз (PKS, Polyketide synthase), участвующие в синтезе поликетидов, и нерибосомные пептидазы (NRPS, Nonribosomal peptides). Используются методы, основанные на амплификации, такие как ПЦР и ПЦР в режиме реального времени (Real Time-PCR) (Penna et al., 2009; Medlin, Orozco, 2017), *in situ* (FISH) и сэндвич-гибридизация (Yek et al., 2013; Medlin et al., 2013). В частности, домены генного кластера *sxt*, который отвечает за синтез сакситоксинов (STX) у динофлагеллят, были адаптированы для разработки количественной ПЦР для оценки токсического потенциала вредоносных цветений, вызываемых различными видами (Al-Tebrineh et al., 2012; Murray et al., 2011; Gao et al., 2015).

Далее мы представляем сведения, полученные в результате молекулярно-экологического мониторинга акватории зал. Петра Великого Японского моря и Олюторского залива Берингова моря, в период с 2014 по 2018 г.

Род *Prorocentrum* Ehrenberg, 1834

Род представлен видами, вызывающими ВЦВ, а также видами-продуцентами DST-токсина, окадаиковой кислоты (ОА), йессотоксинов (УТХ). Недавно УТХ был исключен из группы диарейных токсинов (Багрянцева и др., 2018). По своему химическому строению и действию сходен с бреветоксинами и сигуатоксинами, вследствие чего представляет наибольшую опасность (Alfonso et al., 2003; Paz et al., 2008).

Род содержит около 60 видов, из которых 29 известны как бентосные (Norpenrath et al., 2013). Одним из самых изучаемых видов рода во всем мире является *P. lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. Согласно многочисленным публикациям (см. Коновалова, 1998; Orlova, 2014; Selina, Levchenko, 2011; Selina, 2016), вид широко распространен в зал. Петра Великого и ежегодно встречался на макрофитах. Информация о *P. lima* сопровождалась кратким морфологическим описанием и схематическими рисунками или фотографиями, сделанными под световым микроскопом. Этого было недостаточно для достоверного и точного определения вида. В связи с тем что вид имеет статус потенциально токсичной микроводоросли, с 2009 по 2014 гг. проводился его мониторинг на акватории российских вод Японского моря (Селина, 2017).

В 2013 г. из эпифитона б. Жидкова Японского моря был выделен и культивирован вид, предварительно идентифицированный как *P. lima*. Методами ВЭЖХ было показано, что вид способен продуцировать динофизистоксин-1 (DTX-1) (Kameneva et al., 2015). На основании полученных данных по двум молекулярным маркерам (фрагменты 18S рДНК и D1-D2 регион 28S рДНК) установлено, что отобранные в генетический анализ отдельные клетки и культуры, морфологически определённые как *P. lima*, проявили высокую степень сходства с *P. foraminosum* – видом, официально зарегистрированным в южных водах Кельтского моря (о. Груа, Бискайский залив) и южных водах Северного моря (о. Зильт). Вид проявил 99% степень сходства по фрагменту 18S рДНК с единственной представленной в геномном банке последовательностью *P. foraminosum* (о. Груа, Бискайский залив).

Морфология динофлагелляты *P. foraminosum* Faust, 1993 схожа с таковой у распространенного *P. lima* (Faust et al., 1999), который неоднократно входил в список потенциально токсичных микроводорослей дальневосточных морей России (Orlova, 2014).

Несмотря на морфологическое сходство, *P. lima* и *P. foraminosum* имеют высокие генетические различия, а максимальный процент гомологии между последовательностями 18S рДНК составил лишь 95%. *P. foraminosum* чётко

генетически дифференцируется относительно других 27 видов рода, представленных в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Нужно отметить, что по данному маркеру последовательности большей части видов рода полностью идентичны друг другу. На представленном ML-дереве (рис. 1) на основе 18S рДНК виды рода чётко и достоверно кластеризуются в соответствии с видовой принадлежностью. Обе анализируемые нами культуры сформировали общую кладу с атлантическим *P. foraminosum* (JX912166). Что касается D1-D2 региона 28S рДНК, то гомология между тихоокеанским *P. foraminosum* Vladivostok и атлантическим штаммом составила 95% с рассчитанной величиной генетических расстояний (p) равной 0.01, что соответствует уровню внутривидовой изменчивости для представителей рода по данному фрагменту и существенно ниже величины 0.116 между *P. foraminosum* Vladivostok и генетически близким видом *P. levis*. Изменчивость тихоокеанского и атлантического *P. foraminosum* характеризуется нуклеотидными заменами и вставками/делециями по данному D1-D2 региону 28S рДНК. Реконструкция филогенетических связей D1-D2 региона 28S рДНК представлена на рис. 2.

Анализ D8-D10 региона 28S рДНК после выравнивания последовательностей ограничился длиной 336 п.о. из-за небольшого количества доступных для рода *Prorocentrum* последовательностей. В результате была выявлена наибольшая межвидовая изменчивость, локализованная в участке D8 последовательностей. Наименьшие генетические расстояния проявились между *P. foraminosum*/*P. micans* (AY822609) и *P. foraminosum*/*P. rhathymum* (JQ616833) с величиной $p=0.054$; наибольшие межвидовые генетические расстояния среди видов, анализируемых с *P. foraminosum*, показаны между последним и *P. lima* (JQ616843) с величиной $p=0.115$.

В результате работы были получены первые для *P. foraminosum* последовательности к D8-D10 региону 28S рДНК и участку ITS1–5.8S рДНК–ITS2, имеющие высокую разрешающую способность для дифференциации низкого таксономического уровня (вид, штамм). Также получены первые молекулярно-генетические данные для единственного на сегодня тихоокеанского токсичного штамма *P. foraminosum* по всем четырём рибосомным генам ядерной ДНК: 18S рДНК, ITS1–5.8S рДНК–ITS2, D1-D2 и D8-D10 доменам 28S рДНК.

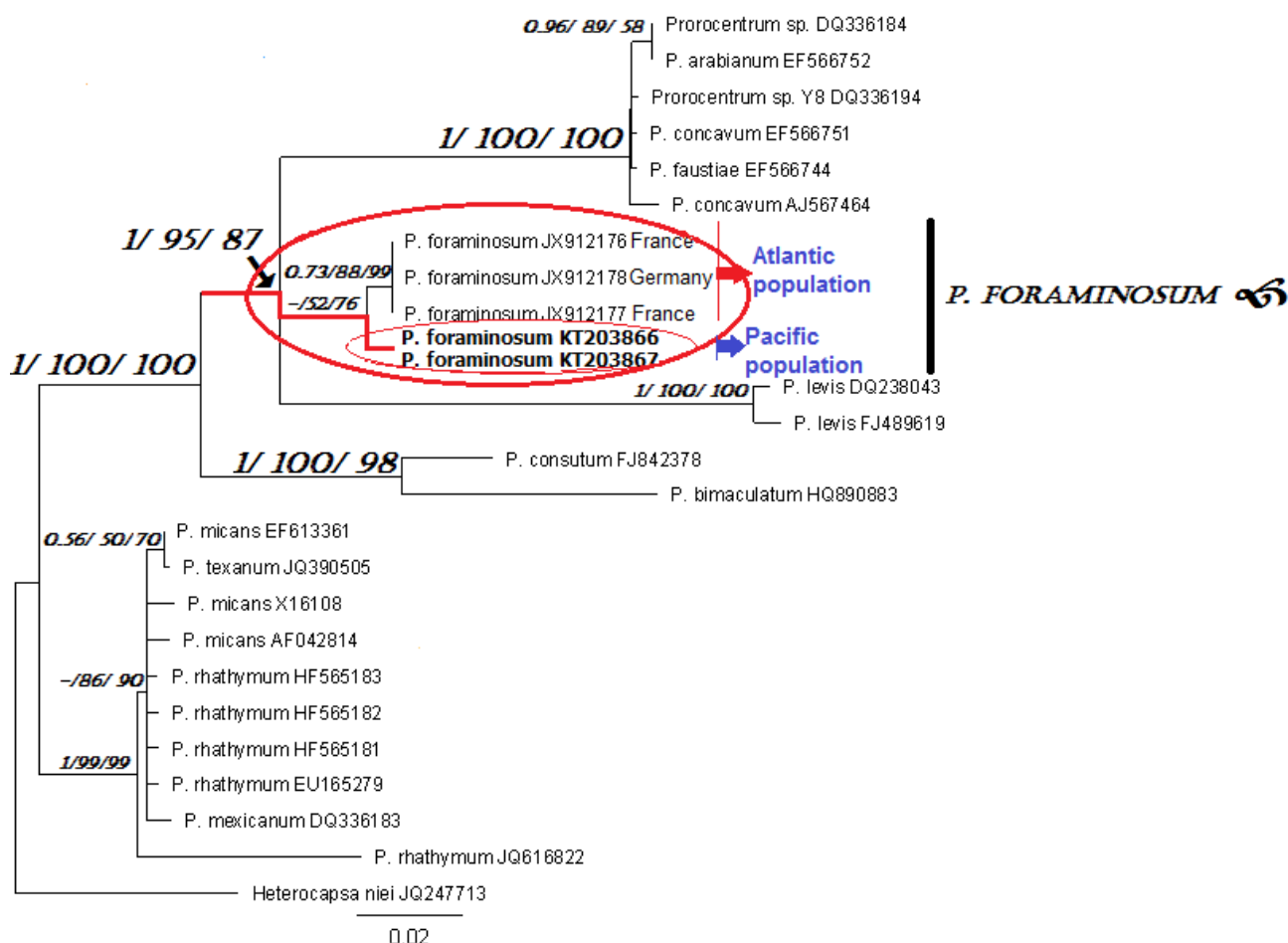


Рис. 2. Реконструкция филогенетического положения и связей представителей рода *Prorocentrum* по D1-D2 региону 28S рДНК.

Достоверность ветвления указана в виде поддержек: байесовские апостериорные вероятности, бутстреп-индексы максимального правдоподобия (ML) и ближайшего связывания (NJ) (PP/VP/VP).

Род *Alexandrium* Halim, 1960

Молекулярно-генетический анализ является важной частью комплексного исследования, совместно проводимого сотрудниками КамчатНИРО и СахНИРО относительно масштабного вредоносного цветения водорослей (ВЦВ), явившегося причиной массового мора горбуши в июле 2017 г. в Олюторском заливе.

В июле 2017 г. в прибрежной зоне Олюторского залива, где были установлены ставные невода, попавшие в полосу «цветения» *Alexandrium*, наблюдалось необычное поведение горбуши. Рыбы, прошедшие через скопления *Alexandrium*, необычно быстро становились снулыми. В неводах рыба очень быстро залегала. Благодаря поступившим сведениям о сложившейся ситуации в прибрежных водах северо-восточного побережья

Камчатки было организовано обследование территории, которое впервые удалось исследовать комплексно. Токсичные виды *Alexandrium* периодически формируют чрезвычайно плотные массовые скопления у берегов Камчатки, где воспроизводится основная часть горбуши, нерки, кижуча и чавычи российского Дальнего Востока (Карпенко, 2013). Сотрудниками КамчатНИРО и СахНИРО под руководством Е.В. Лепской были собраны сведения о поведении горбуши при попадании в зону «цветения», об особенностях поведения морских птиц, качестве воздуха в прибрежной зоне, погодных условиях, предшествовавших «цветению», содержанию биогенных элементов в прибрежной воде в начале «цветения». Проведена оценка численности динофлагеллят. По спутниковым данным восстановлена динамика развития «цветения» по накоплению хлорофилла-*a*. Также по спутниковым данным восстановили динамику температуры поверхности воды в прибрежной зоне Олюторского залива. Методом авиаучета оценили степень заполнения нерестилищ в главных реках воспроизводства горбуши и кеты в Олюторском заливе – Пахачи и Апука и в терминальных соседних реках. Выявлено наличие сакситоксина в пробе воды со взвесью клеток микроводорослей. При анализе проб на концентрацию сакситоксина был детектирован высокий уровень в 330 мкг/л, при этом пределы летальной дозы составляют 300 мкг⁻¹ на кг съедобных тканей моллюсков (Лепская и др., 2017; Lepskaya et al., 2018). При морфологическом исследовании клеток мы установили, что «цветение» вызвала динофлагеллята из видового комплекса *Alexandrium tamarense* (“Atama-complex”). Отдельные виды этого рода способны продуцировать сакситоксин (SXT) – соединение нейропаралитического действия, вызывающий синдром паралитического отравления моллюсками (PSP). Кроме того, виды *Alexandrium* являются известными продуцентами ихтиотоксинов (Emura et al., 2004) и аллелохимических веществ (Arzul et al., 1999; Tillmann et al., 2008), и их плотные клеточные скопления могут приводить к аноксии, гипоксии и повреждению жабр у рыб (Fuentes-Grünwald et al., 2008).

Ранее в Олюторском заливе на основе морфологии были обнаружены два таксона *Alexandrium*: *A. tamarense* (Lebour, 1925) Balech, 1995 и *A. ostenfeldii* (Paulsen) Balech & Tangen, 1985 (Селина и др., 2006; Orlova et al., 2007). Запутанная таксономия рода была успешно пересмотрена в работе Джона с коллегами (John et al., 2014) и выполнено полноценное описание видов “Atama-complex” согласно «Международному кодексу но-

менклатуры водорослей, грибов и растений» (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, ICN) (McNeill et al., 2012). Авторами показано, что виды хорошо дифференцируются на основании риботипирования, а также по наличию или отсутствию гена сакситоксина в геноме и непосредственно способности к продуцированию токсина. С этой целью используется домен *sxtA4* гена *sxtA*.

На основе генетических расстояний между последовательностями *LSU*, *ITS/5.8S* и *SSU*, компенсаторной замены оснований (СВС) в участке *ITS2*, данных о токсичности и репродуктивной несовместимости между представителями пяти филогенетических групп видового комплекса *Alexandrium tamarense* показано, что каждая группа представляет собой самостоятельный вид (John et al., 2014).

Таким образом, “Atama-complex” был разделен на 5 групп (риботипов) с подробным описанием каждой (John et al., 2014): два из них имеют ген синтеза сакситоксина и продуцируют токсин – *Alexandrium fundyense* Valech, 1985 (Группа I) и *Alexandrium pacificum* Litaker, 2014 (Группа IV); два другие не имеют гена синтеза сакситоксина и не способны продуцировать токсин – *Alexandrium mediterraneum* John, 2014 (Группа II) и *Alexandrium tamarense* (Группа III). Единственный вид *Alexandrium australiense* Murray, 2014 (Группа V), представлен смешанными изолятами, в геномах которых ген сакситоксина присутствует, но при этом изоляты могут как продуцировать, так и не продуцировать сам токсин. Кроме того, виды “Atama-complex” не дифференцируются между собой с использованием морфологических критериев, поэтому границы видов здесь определяются главным образом на основе молекулярных критериев. В настоящее время во всем мире программы экологического мониторинга опираются на комбинацию подходов, включающую оценку представленности различных видов таких сложных таксономических комплексов, подход, который особенно проблематичен при исследовании территорий, где в условиях симпатрии встречаются как токсичные, так и нетоксичные виды (John et al., 2014). Так, отмечаются симпатричные цветения токсичной Группы I и нетоксичной Группы III, которые встречаются в Северном и Ирландском морях (Brosnahan et al., 2010; Touzet et al., 2009; Toebe et al., 2013). Цветения нетоксичной Группы II и токсичной Группы IV происходят в Средиземном море (Lilly et al., 2007; Masseret et al., 2009); цветения Групп I, III и IV отмечены в японских водах (Adachi et al., 1996). Группа V, включающая обе формы (токсичную и неток-

сичную), совместно с токсичной группой IV развиваются в водах южной Австралии (Murray et al., 2012).

Проведение молекулярно-генетического анализа для установления видовой принадлежности динофлагелляты рода *Alexandrium*, вызвавшей «красный прилив» в июле 2017 г. в Олюторском заливе, а также проведение скрининга проб на наличие гена сакситоксина является чрезвычайно важным этапом мониторинговых исследований, который был впервые применен нами в данном регионе.

Пробу морской воды с клетками концентрировали центрифугированием, фиксировали этиловым спиртом и транспортировали в лабораторию на генетический анализ. Геномную ДНК выделяли из клеточной биомассы с использованием коммерческих наборов NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co.), предварительно промыв пробу деионизованной водой и 1xTris-EDTA буфером (pH 8.0) для удаления спирта. Амплификацию и последующее секвенирование последовательностей D8-D10 домена *LSU* рДНК проводили с помощью праймеров F08/RB (Chinain et al., 1999) по методике, описанной ранее (Efimova et al., 2014; Kameneva et al., 2015). Редактирование и анализ полученных последовательностей осуществляли с помощью программы Geneious R11 (v11.0.3, Biomatters Limited, Auckland, New Zealand). Поиск генетически близких референсных сиквенсов осуществлялся с помощью BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

VI и ML деревья строили с использованием программы Geneious R11.0.4 и сервера IQ-TREE (Nguyen et al., 2015) под оптимальной моделью нуклеотидных замен. Для набора данных для *LSU* рДНК наилучшей выбрана модель TIM+F+R2 согласно информационному критерию Акаике (AIC) и TIMe+R2 согласно Байесу (BIC). Коррекция выбранной модели на погрешность согласно AIC (+ASC, Lewis, 2001) применялась во избежание завышения длин ветвей. При оценке параметров деревьев оптимальное значение $\ln L = -2545.132$. Для расчёта статистической достоверности топологии деревьев использовались бутстреп-анализ на 1000 «ultra-fast bootstrap» (UFBoot2) реплик (Hoang et al., 2017) с 0.99 минимальной корреляцией в качестве критерия конвергенции, 1000 реплик в SH-aLRT (тест Шимодайра–Хасегава на правдоподобие) тест [-alrt] (Guindon et al., 2010) и приближительный тест Байеса [-aBayes] (Anisimova et al., 2011).

В ходе работы от тотальной ДНК из клеточной биомассы были получены два дифференцированных варианта последовательностей *LSU*

рДНК и также для *SSU* рДНК. Наличие двух аллелей (А и В) генов рРНК у *A. fundyense* было показано ранее (Scholin et al., 1993, 1995). На реконструкциях видно, что обе последовательности из Олюторского залива принадлежат общей кладе *A. fundyense* и хорошо отделены от остальных групп *Alexandrium*.

BI, ML и NJ анализы на основе *LSU* рДНК представили деревья сходной топологии (рис. 3). Филогенетические реконструкции показывают, что обе последовательности от исследуемых проб биомасс *Alexandrium* достоверно кластеризовались совместно с доступными в базе вида *A. fundyense*, т.е., Группа I (ранее известная как северо-американский риботип) из других географических районов. Генетически близкими к исследуемым нами образцам явились канадские северо-атлантические штаммы из зал. Фанди ССМР1980 (JF521646), ССМР1979 (JF521645), ССМР1846 (JF521643), ССМР1978 (JF521644), GT7 (FJ411138), американский северо-атлантический из Портсмута, Нью-Хэмпшир ССМР1719 (JF521642); штамм из зал. Мэйн GTCA28 (FJ411135), штамм GTPP01 (FJ411130) из массачусетского пруда Перч, штамм 2000-СВ-08 (FJ411132) из зал. Каско для образца Alex D8-D10_2; норвежский штамм IMR_S_182008 (JF521629), второй аллель гена канадских штаммов ССМР1979 (JF521627), ССМР1978 (JF521626), ССМР1846 (JF521625), японский штамм AX-03 (DQ785890), южно-корейские из зал. Масан НУ970328М (AY831406), НУ981028М (DQ785889), НУ97403М (DQ785888) для Alex D8-D10_1.

Для вида *A. fundyense* было показано, что он всегда продуцирует токсины и токсичные соединения, в отличие от некоторых других видов рода, которые способны их синтезировать, но делают это при определенных условиях. Конкретно у *A. fundyense* были обнаружены следующие опасные соединения: N-сульфокарбомил C1/2 и гоньятоксин (GTX) 1/4, небольшая доля неосакситоксина (NEO), N-сульфокарбомил C3/4 и следы GTX2/3 и декарбомил гоньятоксин (dcGTX)2/3, восьмикратная изменчивость между штаммами в содержании STX (Bolch, de Salas, 2007).

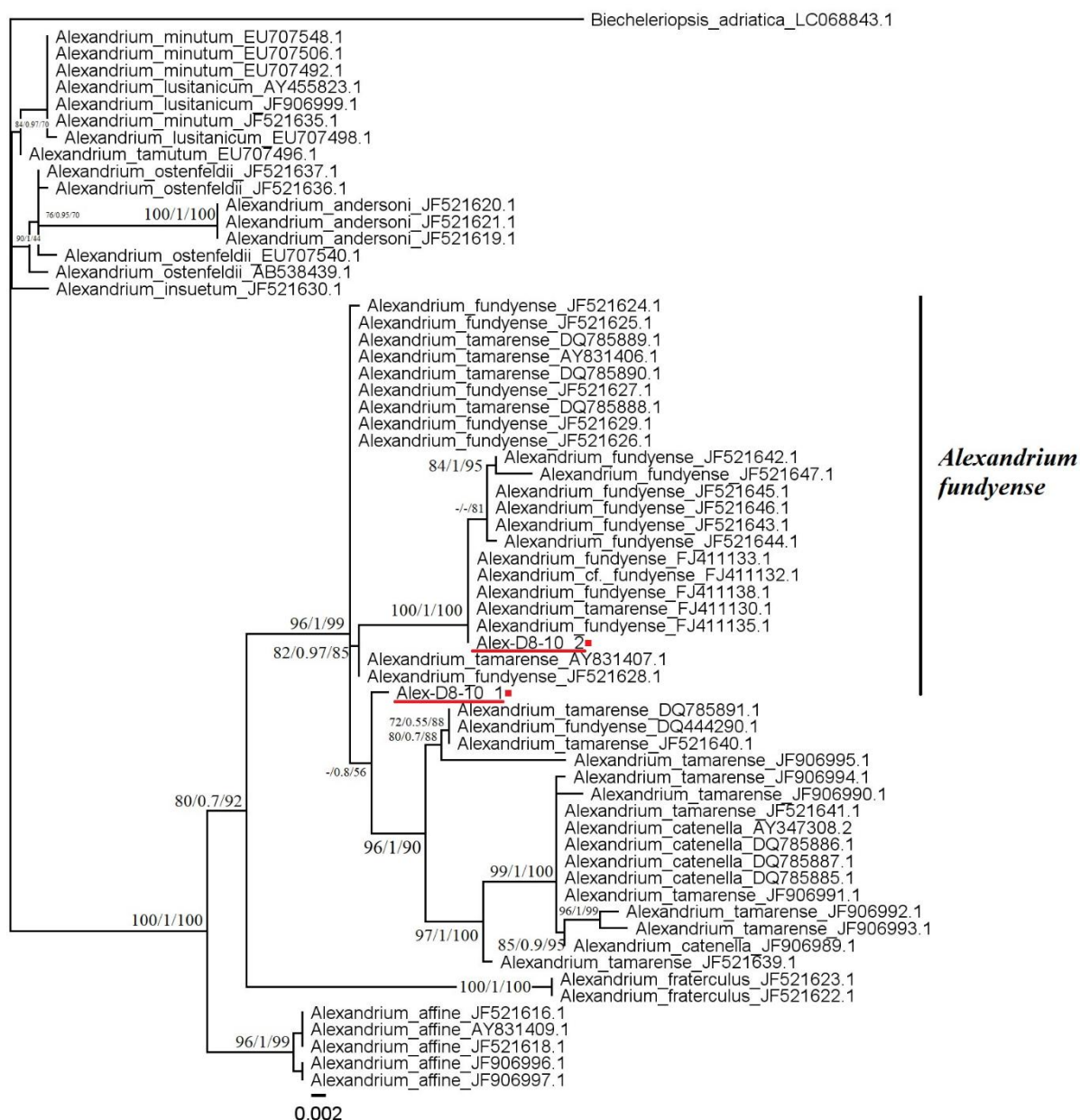


Рис. 3. Филогенетическое положение и связи образцов *Alexandrium* Олюторского залива, реконструированные на основе последовательностей D8/D10 региона *LSU* рДНК представителей рода *Alexandrium*. SH-aLRT поддержки (%)/aBayes-апостериорные вероятности/ultrafast bootstrap support (%). Размер шкалы соответствует числу нуклеотидных замен на сайт.

Детекция гена сакситоксина *sxtA* в пробе олюторского *A. fundyense*

SxtA является уникальным стартовым геном синтеза STX у цианобактерий. Этот ген имеет подобную поликетидсинтазам (PKS) структуру, характеризующуюся четырьмя каталитическими доменами с активными S-аденозилметионин-(SAM)-зависимой метилтрансферазой (*sxtA1*), GCN5-связанной N-ацетилтрансферазой (*sxtA2*), ацил-переносящим белком

(*sxtA3*) и аминотрансферазой класса II (*sxtA4*) (Kellmann et al., 2008). Гены *sxt* высоко консервативны между видами цианобактерий, и считается, что генный кластер возник, по крайней мере, 2100 миллионов лет назад (MurRAY et al., 2011). Исследования показывают, что транскрипты *sxtA* динофлагеллят, которые филогенетически тесно связаны с *sxtA* цианобактерий и другими предполагаемыми генами, вовлеченными в синтез токсинов бактерий, также имеют структуру доменов, сходную с цианобактериальным *sxtA*. Предполагается, что такое сходство, скорее всего, связано с событием горизонтального переноса гена (HGT) между предковыми STX-продуцирующими бактериями и динофлагеллятами. Среди динофлагеллят STX продуцируются видами родов *Alexandrium* и *Pyrodinium*, которые принадлежат семейству Gonyaulacaceae отряда Gonyaulacales, а также одному виду рода *Gymnodinium*, который принадлежит к семейству Gymnodiniaceae в отряде Gymnodiniales. Согласно работе Стюкен (Stüken et al., 2011), в геномной ДНК *Alexandrium catenella* ACSH02 (умеренный азиатский риботип) присутствовало 100–240 копий домена *sxtA4*. Все геномные последовательности *sxtA4* из 15 различных штаммов *Alexandrium* и одного штамма *Gymnodinium catenatum* Graham, 1943 образовали единый хорошо поддерживаемый филогенетический кластер, состоящий из нескольких слегка отличающихся последовательностей клонов одного и того же штамма, распределенных по всему дереву. Важное обнаружение было сделано в результате проведенного транскриптомного анализа *A. fundyense* CCMP1719 и *A. minutum* CCMP113, показавшее, что ген *sxtA* (возможно, другие *sxt*-гены) кодируются в ядерном геноме динофлагеллят, и синтез STX у динофлагеллят происходит не от со-культивируемых бактерий (Stüken et al., 2011).

Образец отобранной биомассы из Олюторского залива содержал сакситоксин в расчёте 330 мкг/л (Лепская и др., 2017; Lepskaya et al., 2018), также молекулярный скрининг показал наличие самого гена. С использованием пар праймеров к *sxtA4* (Stüken et al., 2011) были получены нуклеотидные последовательности, которые далее сравнивали с опубликованными в GenBank других сакситоксин-продуцирующих видов и штаммов. Последовательность *sxtA4* олюторского *A. fundyense* оказалась полностью идентична двум последовательностям северо-атлантических штаммов CCMP1719 из зал. Мэйн и CCMP1979 из зал. Фанди.

Под *Ostreopsis* Schmidt, 1901

Представители рода *Ostreopsis* – эпибентосные морские динофлагелляты, известные как продуценты палитоксина (ПТХ) и его аналогов – ова-токсина (ovatoxin a – k), маскаренотоксинов (mascarenotoxin-a/c), остреоцина-D (ostreocin-D), остреотоксинов (ostreotoxin-1 и ostreotoxin-3), остреола А (ostreol A), гомопалитоксина (homopalalytoxin), бисгомопалитоксина (bishomopalalytoxin), неопалитоксина (neopalalytoxin), деопалитоксина (deopalalytoxin) и 42-гидроксипалитоксина (42-hydroxypalalytoxin) (Ajani et al., 2017). Более десяти лет виды рода вызывают цветения вдоль средиземноморского побережья, приводящие к серьезным массовым отравлениям людей (Ciminiello et al., 2008, 2014). Случаи отравлений, связанные с цветением *Ostreopsis* spp., отмечались и на юге Японских островов (Sato et al., 2011). Молекулярно-генетический анализ *Ostreopsis* spp. у побережья Японии, проведенный Сато с соавторами, сгруппировал последовательности как в случае ITS-региона, так и в случае D8-D10 домена 28S рДНК в ряд дифференцированных клад, монофилия которых была подтверждена высокими статистическими поддержками ветвей (Sato et al., 2011). Несмотря на отсутствие морфологических различий, полученные клады имели высокие значения генетических различий, а виды, принадлежащие к соответствующимкладам, проявили чёткую связь дифференциации по физико-экологическим характеристикам и токсичности (Sato et al., 2011; Suzuki et al., 2012; Yamaguchi et al., 2012; Tanimoto et al., 2013).

При первом исследовании эпифитных динофлагеллят в прибрежной зоне зал. Петра Великого Японского моря были обнаружены морфовиды *O. ovata* Fukuyo, 1981 и *O. siamensis* Schmidt, 1901 (Selina, Orlova, 2010). Проведенный в дальнейшем филогенетический анализ по последовательностям ITS-региона и D1-D2 домену 28S рДНК клоновых культур и отдельных клеток *Ostreopsis* spp. не подтвердил предполагаемую ранее принадлежность анализируемых *Ostreopsis* spp. к видам *Ostreopsis* cf. *ovata* и *Ostreopsis* cf. *siamensis* (Efimova et al., 2014). Многолетние наблюдения за бентосными динофлагеллятами в зал. Петра Великого показали, что клетки *Ostreopsis* spp. появляются на макрофитах, как правило, в августе, в период наибольшего (22–24°C) прогрева вод и достигают максимальной концентрации в сентябре при температуре 17–21°C (Selina et al., 2014). Кроме того, экспериментально показано, что снижение солености стимулировало рост культуры российского штамма с генотипом *Ostreopsis* sp. 1

(Селина и др., 2018), в то время как обратная реакция наблюдалась у средиземноморских и японских штаммов *Ostreopsis* spp. (Morton et al., 1992; Granéli et al., 2011; Pistocchi et al., 2011; Pezolesi et al., 2012; Tanimoto et al., 2013; Carnicer et al., 2016). Эти факты свидетельствуют в пользу высказанного ранее предположения, что атлантические и тихоокеанские популяции *O. ovata* в силу своих молекулярных, физиологических, экологических и токсикологических особенностей могут являться разными видами (Penna et al., 2010; Parsons et al., 2012).

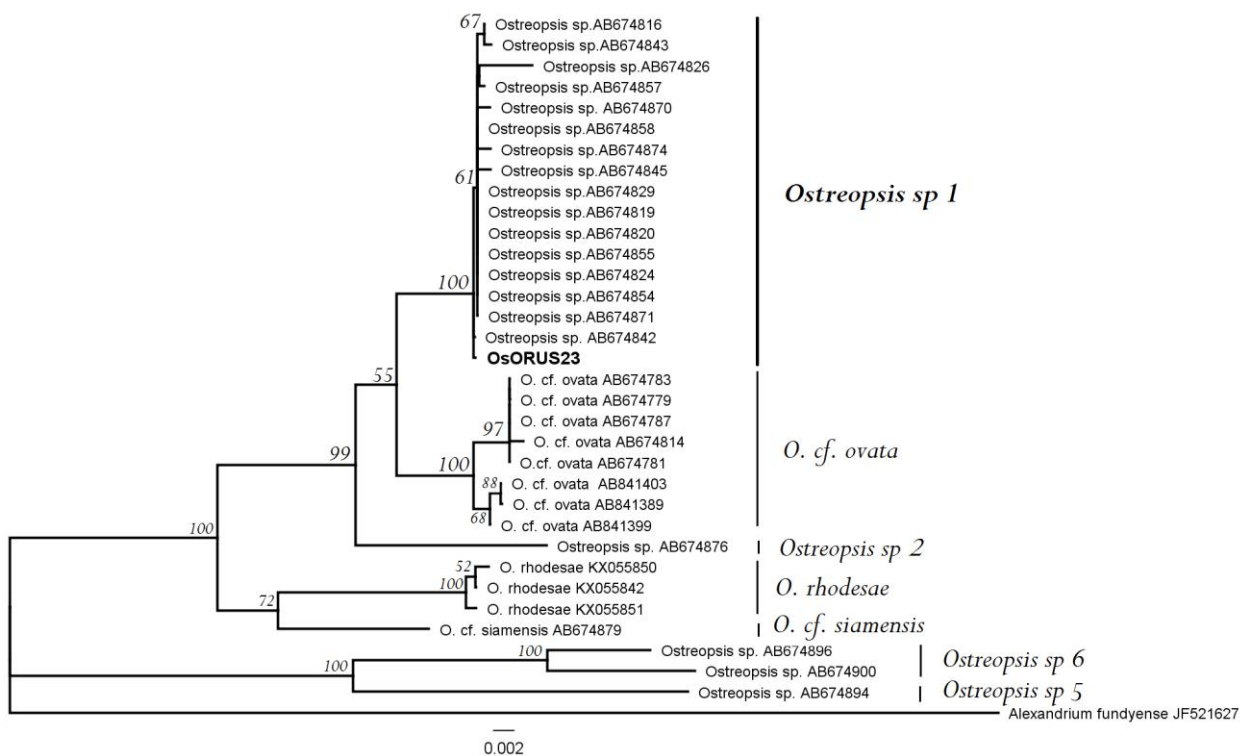


Рис. 4. ML-дерево, реконструированное по последовательностям D8-D10 домена (28S рДНК) (824 п.о.) представителей рода *Ostreopsis*, достоверность ветвления указана в виде бутстреп-индексов максимального правдоподобия (ML). Последовательность *Alexandrium fundyense* взята в качестве внешней группы.

На основании полученных данных по двум молекулярным маркерам (ITS-региона и D8-D10 домен 28S рДНК) было подтверждено, что культура исследованного клона *Ostreopsis* sp. ORUS23 имеет генотип *Ostreopsis* sp. 1 (рис. 4), характеризующийся высокой токсичностью у прибрежных вод Японии (Sato et al., 2011; Suzuki et al., 2012). Диапазон различий последовательностей, относящихся к единому генотипу в 4%, обусловлен гипервариабельностью ITS-региона у *Ostreopsis* (Sato et al., 2011; Efimova et al., 2014) и его многокопийностью (Efimova et al., 2014). Проведенный

анализ позволил получить последовательности к D8-D10 домену 28S рДНК и подтвердил, что D8-D10 домен 28S рДНК является лучшим на сегодняшний день молекулярно-генетическим маркером, имеющим высокую разрешающую способность для рода *Ostreopsis*.

***Scrippsiella trochoidea* (Stein) Balech ex A.R & Loeblich III, 1976**

Scrippsiella trochoidea – космополитный вид динофлагеллят, вызывающий ВЦВ, который внесён в список ЮНЕСКО. Вид способен пролиферировать в температурном диапазоне от 10°C до 30°C и солености от 5 до 55‰ (Braarud, 1951; Kim, Han, 2000), оставаясь жизнеспособными даже при 5°C (Ishikawa, 1995). Цисты *S. trochoidea* широко распространены и зарегистрированы в Западной Пацифике, Средиземном море, Карибском регионе, на западном и восточном побережьях Северной Америки, побережье Перу, западном побережье Европы, на западе Африки и Ирана (Wall et al., 1970; Montresor et al., 1994; Nehring, 1994; Morquecho, Lechuga-Devéze, 2003; Orlova et al., 2004; Attaran-Fariman, Bolch, 2012). В Амурском заливе Японского моря, вегетативные клетки динофлагеллят с морфотипом *S. trochoidea* встречаются в течение всего года, и их концентрация может достигать миллиона клеток на литр (Orlova et al., 2009).

В начале 2000-х гг. Монтресор с соавторами, проводя молекулярно-филогенетический анализ рДНК генов, наряду с высокой морфологической и физиологической обнаружили и высокую генетическую изменчивость в пределах одной морфы *S. trochoidea*, предположив наличие нескольких неразрешенных криптических видов (Montresor et al., 2003). Разграничение видов внутри группы, основанное только на морфологии клеток, провести невозможно; в этой связи объединённые молекулярные данные и морфологический анализ цист и проросших клеток на сегодняшний день являются наиболее надёжными критериями видовой диагностики данной группы динофлагеллят (Attaran-Fariman, Bolch, 2012).

Несмотря на усиленное изучение таксономии рода *Scrippsiella* Balech ex A.R. Loeblich III, 1965, и видового комплекса *S. trochoidea* в частности, на данный момент невозможно выявить специфические и одновременно надёжные характеристики, конгруэнтные, по крайней мере, генетическим данным. Штаммы одного и того же риботипа демонстрируют значительную морфологическую изменчивость, а разные виды демонстрируют генетические (но не морфологические) отличия (одинаковый рисунок пла-

стин и похожие шипы у покоящихся стадий) (Montresor et al., 2003; Gottschling et al., 2005).

Нами проведена видовая идентификация и установлены родственные связи двух клеточных культур морских динофлагеллят с морфотипом *S. trochoidea* 2010 и 2012 гг., пророщенных из цист донных осадков (30 см) Амурского залива (Японское море) (рис. 5) (Morozova et al., 2016).

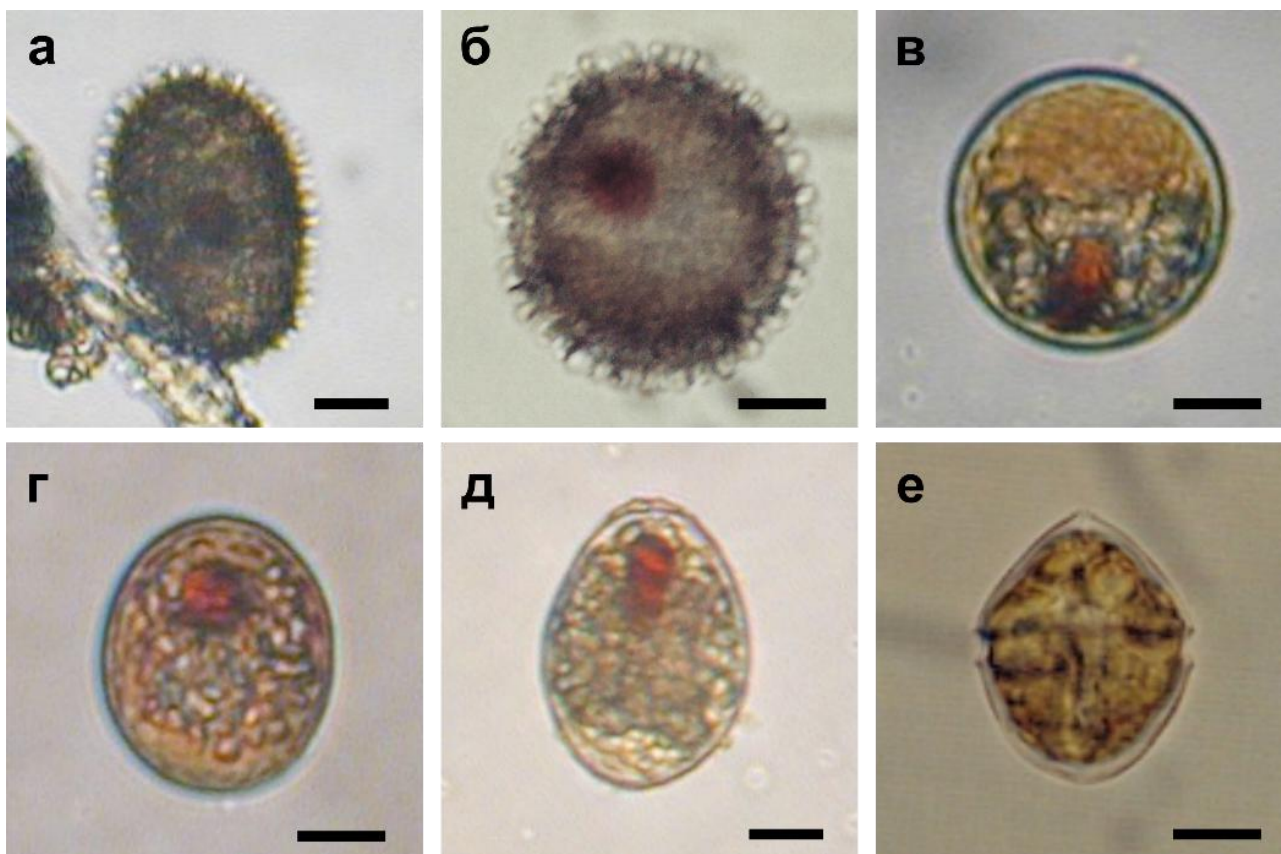


Рис. 5. Общий вид цист и вегетативных клеток динофитовой водоросли *Scrippsiella trochoidea* из Амурского залива Японского моря: а–б – известковые цисты, в–д – безизвестковые цисты, е – вегетативная клетка. СМ. Масштабная линейка – 10 мкм. (Микрофотографии предоставлены Морозовой Т.В.)

Показано, что анализируемые российские штаммы кластеризовались совместно с атлантическим штаммом *S. trochoidea* GeoV 335 из северной части Ионического моря (рис. 6). В результате проведённого молекулярно-генетического анализа культур 2010 и 2013 гг. были секвенированы последовательности D1-D2 региона 28S рДНК и полный ITS регион (ITS1 ITS1ITS1–5.8S рДНК 5.8S рДНК 5.8S рДНК 5.8S рДНК 5.8S рДНК 5.8S рДНК –ITS2 ITS2ITS2) общей длиной 1297 п.о. Нуклеотидные последовательности по отдельно рассматриваемым культурам были полностью идентичны друг другу. В GenBank депонирована последовательность

штамма АВ-2010 (KJ996096). 95% область покрытия этой последовательности была наиболее близка к *S. trochoidea* GeoB 335 (KF751926). Обнаружено 5.69% (70 п.о.) различий, в том числе 17 п.о. в ITS1, 21 п.о. в ITS2 и 29 п.о. в виде замен и 3 п.о. в виде вставки в D1-D2 области 28S рДНК. Согласно полученным молекулярно-генетическим данным, подтверждена принадлежность анализируемых культур видовому комплексу *S. trochoidea*. В результате анализа, вопреки распространенному мнению о зависимости между риботипом и географическим происхождением у организмов, для *S. trochoidea* такой связи обнаружено не было. Вероятно, отсутствие прямой связи географически близких штаммов объясняется различными экотипами у вида, как и в обратном случае, близкая связь географически обособленных штаммов, характеризующихся не идентичным, а по крайней мере близким экотипом. Риботип не всегда согласуется (совпадает) с географической принадлежностью, поскольку показывает степень родственных связей между видами, а географическая принадлежность характеризуется экотипом, т.е. специфическими функциональными характеристиками (Заварзин, 1987). Это может объяснять выявленную для некоторых видов микроводорослей внутривидовую генетическую подразделённость относительно сезона, т.е. формирование уже не столько популяций, сколько рас. Возможно, существует и другое объяснение обнаруженному ближайшему сходству риботипов двух не контактирующих штаммов АВ-2010 и GeoB 335. Криптическая природа всех известных членов видового комплекса *S. trochoidea*, высокая степень различий между ними и достоверно высокие значения ветвей на филограммах могут указывать на таксономическую самостоятельность этих видов. Это подкрепляется и отсутствием где-либо ещё в мире зарегистрированных подобных АВ-2010 и GeoB 335 риботипов.

***Pseudohaptolina sorokinii* Stonik, Efimova & Orlova, 2016**

Гаптофитовые водоросли (Haptophyta) являются важными первичными продуцентами в морском пелагическом сообществе. Известно, что представители родов *Chrysochromulina* Lackey, 1939 и *Prymnesium* Massart ex Conrad, 1926 нередко вызывают цветение воды в морских и солоноватых водах, приводящее к массовому морю рыб и беспозвоночных (Moestrup, 1994; Edvardsen, Paasche, 1998; Edvardsen, Imai, 2006).

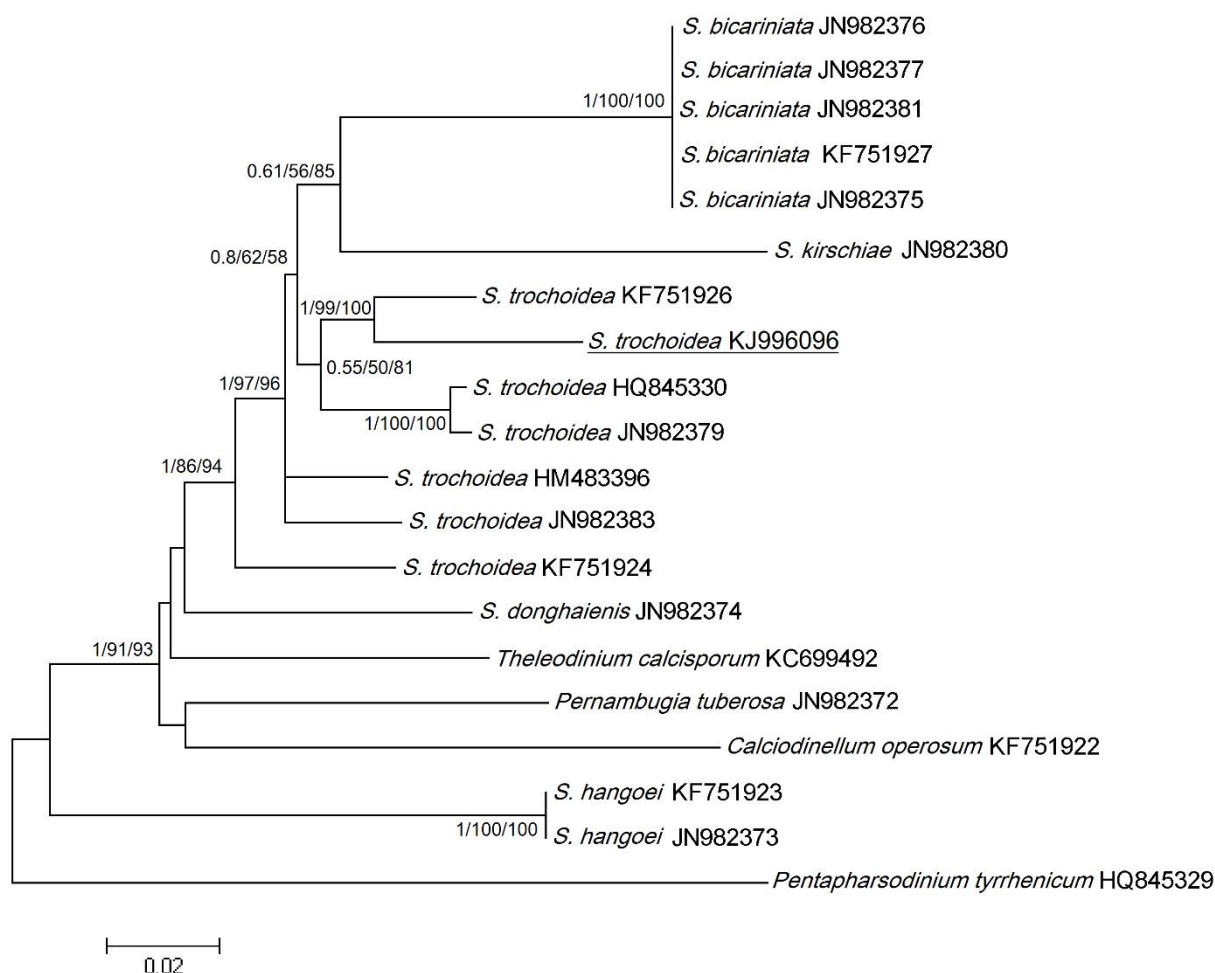


Рис. 6. Консенсусное ML-дерево на основе ITS региона и 28S рДНК (D1-D2) *Scrippsiella* и ближайших представителей других родов, достоверность ветвления указана в виде поддержек: байесовские апостериорные вероятности, бутстреп-индексы максимального правдоподобия (ML) и ближайшего связывания (NJ) (PP/BP/VP). Дерево укоренено последовательностью *Pentapharsodinium tyrrhenicum* HQ845329 в качестве внешней группы.

Видовая идентификация примнезиевых затруднена из-за высокой изменчивости морфологических признаков и недостаточных генетических данных в мировых базах для этой разнообразной группы. Практически ничего не известно об этом важном компоненте нано- и пикопланктона в российских морских водах (Orlova et al., 2009). Это создает сложность в выявлении и идентификации этих организмов с использованием рутинных наблюдений с помощью световой микроскопии (LM) и фиксированного материала (Thronsen, 1993). Массовое подледное цветение, вызванное мелкими одноклеточными жгутиковыми, произошло в марте 2013 г. и повторно в 2015 г. в прибрежных водах г. Владивостока, в Амурском заливе Японского моря. Плотные скопления микроводорослей наблюдались в утренние часы в майне, прорубленной в 60-сантиметровом слое льда. Ин-

тенсивный коричневый цвет наблюдался на поверхности воды и вдоль стенок майны. Ответственный за данное цветение организм был первоначально идентифицирован с помощью LM как *Chrysochromulina* sp. 2 (sensu M. Iwataki в Omura et al., 2012). Морфология вида близка к таковой вида *Chrysochromulina birgeri* Hällfors & Niemi, 1974, описанного из финских и японских вод (Hällfors, Thomsen, 1979; Takahashi, 1981; Hällfors, 1989). Тем не менее были обнаружены и некоторые несоответствия по морфологической шкале между нашими образцами и описанным ранее видом *C. birgeri*. После опубликованных работ (см. выше) данный вид более нигде не регистрировался, в связи с чем молекулярно-генетические данные для *C. birgeri* отсутствуют. Последующее изучение с применением молекулярно-генетического подхода определило, что организм, вызвавший коричневый прилив, принадлежит роду *Pseudohaptolina* Edvardsen et Eikrem, 2011, который ранее был выделен из рода *Chrysochromulina* (Edvardsen et al., 2011). На основании морфологических и генетических данных нами описан новый вид гаптофитовой водоросли, *Pseudohaptolina sorokinii*, как организм, явившийся причиной массового подледного цветения в Амурском заливе в марте 2013 и 2015 гг. (Orlova et al., 2016).

Мониторинг проводился в Амурском заливе, во внутренней полузакрытой части зал. Петра Великого северо-западной части Японского моря. Район взятия проб находился в 15 км от устья р. Раздольная, которая является одной из крупнейших рек в бассейне зал. Петра Великого и характеризуется высокой концентрацией биогенных веществ и некоторых металлов (Shulkin et al., 2013). В связи со своей геоморфологией Амурский залив характеризуется ранним образованием льда и длительным периодом покрытия. Ледяной покров полностью становится к концу декабря, а начинает сходить только в середине марта. Во время цветения в марте 2013 г. кромка льда майны имела интенсивный коричневый цвет (рис. 7). Температуры воды составляла -1.8°C и толщина льда – 60 см.

Морфологический анализ клеток с помощью световой микроскопии позволил обнаружить сходство с видом *C. birgeri*, описанным из морского льда и последний раз зарегистрированным в 1989 г. Причина отсутствия публикаций по данному виду, скорее всего, заключается в высокой чувствительности водоросли к изменениям условий среды, поэтому зачастую водоросль может оставаться незарегистрированной.



Рис. 7. Подлёдное коричневое цветение в северо-западной части Японского моря (Амурский зал.), вызванное гаптофитовой микроводорослью *Pseudohaptolina sorokinii*. Масштаб: 1 м.

Трудность обнаружения и исследования многих гаптофитовых обусловлена их высокой чувствительностью к резким изменениям условий окружающей среды, хранению и фиксации материала. Отмечено быстрое разрушение клеток при нагревании препарата на предметном столике микроскопа. В связи с этим клетки анализировались сразу после отбора.

Полученные в результате секвенирования последовательности сравнивали с последовательностями известных видов примнезиевых из базы NCBI. Филогенетические деревья, построенные по методам Байеса (BI), максимального правдоподобия (ML) и ближайшего связывания (NJ), имели сходную топологию между собой и конгруэнтную консенсусным деревьям на основе 18S рРНК и объединенным фрагментам 18S рРНК+28S рРНК+16S рибосомальной пластидной ДНК, представленным в работе Эдвардсен с соавторами (Edwardsen et al., 2011). Выведенные клады обо-

значены согласно выше указанной работе (Edwardsen et al., 2011). Реконструированное в настоящей работе консенсусное ML-дерево на основе 18S рРНК представлено на рис. 8.

Последовательности 18S рРНК анализируемых клеток проявили 98% сходства с последовательностью вида *Pseudohaptolina arctica* Edwardsen & Eikrem, 2011 (AM491016), и сформировали общую кладу рода *Pseudohaptolina* (B1-3) (рис. 8). Клада явилась сестринской для клады B1-2, сформированной представителями рода *Dicrateria* Parke, 1949 (*Dicrateria* + *Imantonia*), с высокой поддержкой узла 1.00/98/98.

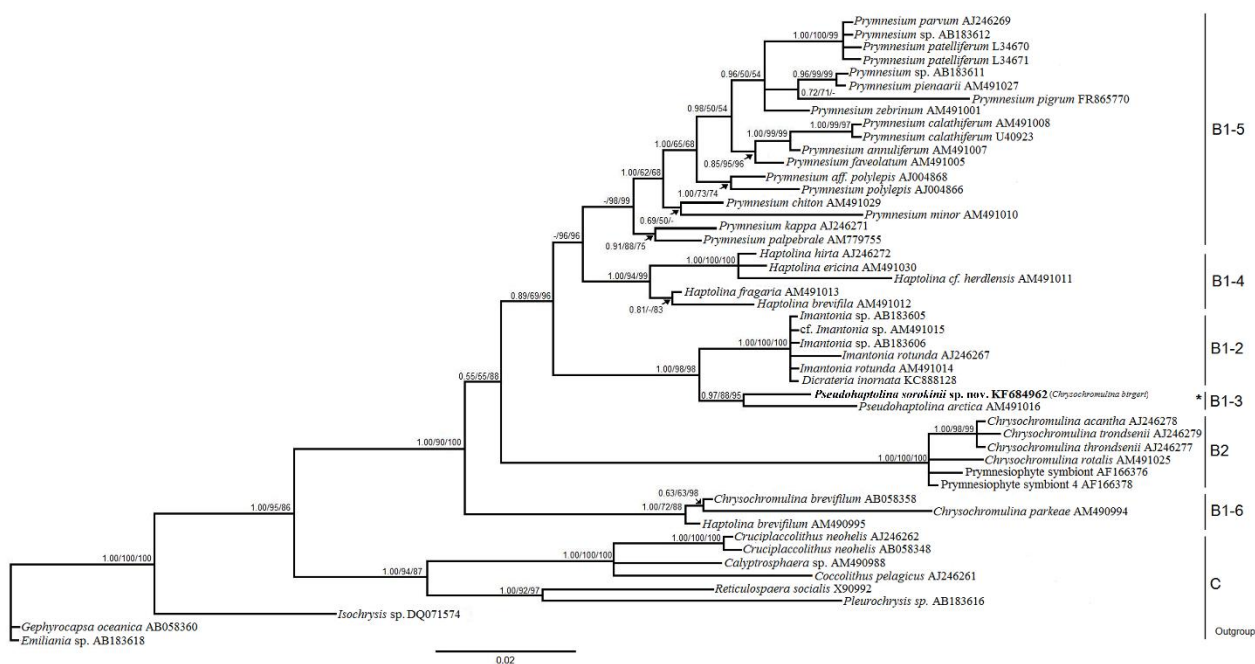


Рис. 8. Консенсусное ML-дерево, построенное на основе 18S рРНК, представителей Prymnesiophyceae. Значения апостериорных вероятностей для BI и бутстреп-индексов для ML и NJ указаны >0.5/50/50 и представлены в порядке BI/ML/NJ.

Величина генетической дифференциации (p) 18S рРНК между исследуемым видом и *P. arctica* соответствует величине видового уровня между другими представителями Prymnesiales и составила 1.1% (0.011). При сравнении последовательностей 18S рРНК *P. sorokinii* (KF684962) и *P. arctica* (AM491016) выявлены нуклеотидные замены в 17 позициях, 3 позиции вырожденных оснований «S» в последовательности в *P. arctica*, а также 4 однонуклеотидные инсерции/делеции.

Согласно предложенной недавно новой классификации порядка Prymnesiales в семейство Prymnesiaceae Conrad ex. O.C.Schmidt emend. Edwardsen, Eikrem et Medlin наряду с известными родами *Prymnesium*

Massart, 1920 *emend.* Edvardsen, Eikrem et Probert, 2011; *Platyochrysis* Geitler, 1930 и *Chrysochromulina* Lackey, 1939 были отнесены два недавно описанных рода гаптофитовых микроводорослей *Haptolina* Edvardsen et Eikrem, 2011 и *Pseudohaptolina* Edvardsen et Eikrem, 2011 (см. Edvardsen et al., 2011). До недавнего времени был известен только один вид рода *Pseudohaptolina* – холодноводный *P. arctica* Edvardsen et Eikrem, 2011. Для достоверной идентификации таксонов в пределах порядка требуются молекулярно-генетические исследования, которые в комплексе с морфологическим методом позволили нам описать новый для науки вид *Pseudohaptolina sorokinii* Stonik, Efimova & Orlova, 2016. Тотальный препарат микроводоросли депонирован в музей ННЦМБ ДВО РАН (ИБМ ДВО РАН) под маркировкой PHS13.

Результаты работы позволили расширить представления о флористическом составе гаптофитовых водорослей из дальневосточных морей России и гидрологических условиях возникновения подледного цветения этих организмов в Японском море.

Полученные данные дополняют список видов потенциально токсичных микроводорослей, вызывающих цветения воды в прибрежных водах северо-западной части Японского моря, где располагаются рекреационные зоны и хозяйства аквакультуры. Экстремально высокая плотность *P. sorokinii* в Амурском заливе указывает на необходимость мониторинга видового состава и плотности гаптофитовых – потенциальных продуцентов ихтиотоксинов в районе исследования.

Заключение

Результаты работы позволили расширить представления о вредоносных и токсичных видах микроводорослей из дальневосточных морей России. Молекулярно-генетический анализ культур, экологических проб и отдельных клеток выявил потенциальных продуцентов паралитических токсинов (paralytic shellfish poisoning, PSP), диарейных токсинов (diarrhetic shellfish poisoning, DSP), нейротоксинов (neurotoxic shellfish poisoning, NSP), а также виды, вызывающие ВЦВ.

Суммируя полученные молекулярно-генетические данные, было показано, что именно вид *Prorocentrum foraminosum*, а не *Prorocentrum lima*, являлся объектом многолетнего мониторинга зал. Петра Великого Японского моря; впервые показано, что вид продуцирует один из основных диарейных токсинов, DTX-1, накапливающихся в среде и в тканях морских двустворча-

тых моллюсков. Вид является новым для дальневосточных морей и морей России в целом. Это первая официально зарегистрированная популяция для Тихого океана и третья известная популяция в мире.

С помощью молекулярно-генетического анализа было установлено, что причиной «красного прилива» в июле 2017 г. в Олюторском заливе Берингова моря, приведшего к массовой гибели горбуши и птиц восточно-камчатского шельфа, явилась токсичная динофлагеллята *Alexandrium fundyense*, ранее известная как северо-американский риботип. Молекулярный скрининг проб на наличие гена сакситоксина показал положительный результат. Выявлено, что генетически близкими риботипами явились атлантические северо-американские из заливов Мэйн и Фанди.

Риботипирование исследованного клона *Ostreopsis* sp. ORUS23 из Японского моря определило его принадлежность в группе *Ostreopsis* sp. 1, характеризующейся высокой токсичностью у прибрежных вод Японии.

Установлено, что основной доминирующий тип цист в поверхностных осадках (0–14 см) Амурского залива принадлежит вредоносным динофлагеллятам из видового комплекса *Scrippsiella trochoidea* (~39% от общей концентрации цист).

Описан новый для науки вид гаптофитовой микроводоросли *Pseudohaptolina sorokinii* Stonik, Efimova & Orlova, 2016, вызывающий подледное цветение при отрицательных температурах воды. Это вторая находка представителя уникального рода *Pseudohaptolina* – криофильных гаптофитовых водорослей, распространение которых ранее было ограничено только арктическими водами Канады. Экстремально высокая плотность обнаруженного нами вида указывает на необходимость мониторинга потенциальных продуцентов ихтиотоксинов в российских морских водах.

Благодарность

Авторы выражают благодарность всем соавторам совместных комплексных исследований, частью которых являлся молекулярно-генетический мониторинг, а именно, сотрудникам лаборатории морской микробиоты ННЦМБ им. Жирмунского ДВО РАН (г. Владивосток), в особенности к.б.н. Стоник И.В., к.б.н. Селиной М.С., к.б.н. Морозовой Т.В., Литвиновой Н.Г. Также авторы признательны к.б.н., зав. лабораторией гидробиологии КамчатНИРО (г. Петропавловск-Камчатский) Лепской Е.В. за предоставленную информацию и пробы *Alexandrium* spp., собранные в Олюторском заливе (Берингово море).

Список литературы

- Багрянцева О.В., Гмошинский И.В., Евстратова А.Д. и др. Токсичность йессотоксина в эксперименте *in vivo* // Анализ риска здоровью. 2018. № 3. С. 112–119.
- Вершинин А.О., Орлова Т.Ю. Токсичные и вредные водоросли в прибрежных водах России // Океанология. 2008. Т. 48, № 4. С. 568–582.
- Заварзин Г.А. Особенности эволюции прокариот. Эволюция и биоэкологические кризисы. М.: Наука, 1987. С. 144–158.
- Коновалова Г.В. Динофлагелляты (Dinophyta) дальневосточных морей России и сопредельных акваторий Тихого океана. Владивосток: Дальнаука, 1998. 299 с.
- Карпенко В.И. Оценка состояния запасов и управление промыслом тихоокеанских лососей на Камчатке. Методическое пособие по направлению подготовки бакалавров, специалистов и магистров специальности 110900.62, 110900.68 (110901.62, 111400.65, 111400.68) «Водные биоресурсы и аквакультура». Петропавловск-Камчатский, 2013. 64 с.
- Лепская Е.В., Могильникова Т.А., Шубкин С.В., Тепнин О.Б. Первые риски промысла во время "красных приливов" у восточной Камчатки // Бюллетень изучения тихоокеанских лососей на Дальнем Востоке. 2017. № 12. С. 106–112.
- Орлова Т.Ю. Красные приливы и токсичные микроводоросли в дальневосточных морях России // Вестн. ДВО РАН. 2005. № 1. С. 27–31.
- Селина М.С., Коновалова Г.В., Морозова Т.В., Орлова Т.Ю. Род *Alexandrium* Halim, 1960 (Dinophyta) у тихоокеанского побережья России: видовой состав, распределение, динамика // Биол. моря. 2006. Т. 32, № 6. С. 384–394.
- Селина М.С. Морфология и сезонная динамика потенциально токсичной микроводоросли *Prorocentrum foraminosum* Faust 1993 (Dinophyta) в заливе Петра Великого Японского моря // Биол. моря. 2017. Т. 43, № 3. С. 169–174.
- Селина М.С., Морозова Т.В., Айздайчер Н.А., Ефимова К.В. Морфологические, генетические и физиологические характеристики бентосной динофлагелляты рода *Ostreopsis*, изолированной из прибрежных вод северо-западной части Японского моря // Биол. моря. 2018. Т. 44, № 1. С. 16–25.
- Adachi M., Sako Y., Ishida Y. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions // J. Phycol. 1996. Vol. 32. P. 424–432.

Ajani P., Harwood T., Murray S. Recent Trends in Marine Phycotoxins from Australian Coastal Waters // *Marine Drugs*. 2017. Vol. 15. E 33. 10.3390/md15020033.

Alfonso A., de la Rosa L., Vieytes M.R., Yasumoto T., Botana L.M. Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes // *Biochem. Pharmacol.* 2003. Vol. 65, N 2. P. 193–208.

Al-Tebrineh J., Merrick C., Ryan D. et al. Community composition, toxigenicity, and environmental conditions during a cyanobacterial bloom occurring along 1,100 Kilometers of the Murray River // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. N 78. P. 263–272.

Anisimova M., Gil M., Dufayard J.F., Dessimoz C., Gascuel O. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes // *Systemat. Biol.* 2011. Vol. 60, N 5. P. 685–699.

Arzul G., Seguel M., Guzman L., Erard-Le Denn E. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1999. Vol. 232. P. 285–295.

Attaran-Fariman G., Bolch C. Morphology and Phylogeny of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) a potentially harmful bloom forming species isolated from the sediments of Iran's south coast // *Iranian J. Fisher. Sci.* 2012. Vol. 11, N 2. P. 252–270.

Bolch C.J.S., de Salas M.F. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium* “tamarensis complex” to Australasia // *Harmful Algae*. 2007. N 6. P. 465–485.

Braarud T. Salinity as an ecological factor in marine phytoplankton // *Physiologia Plantarum*. 1951. Vol. 4. P. 28–34.

Brosnahan M.L., Kulis D.M., Solow A.R. et al. Outbreeding lethality between toxic Group I and non-toxic Group III *Alexandrium tamarense* spp. isolates: Predominance of heterotypic encystment and implications for interactions and biogeography // *Deep-Sea Res. II*. 2010. Vol. 57. P. 175–189.

Carnicer O., García-Altres M., Andree K.B. et al. *Ostreopsis* cf. *ovata* from western Mediterranean Sea: physiological responses under different temperature and salinity conditions // *Harmful Algae*. 2016. Vol. 57. P. 98–108.

Casabianca S., Cornetti L., Capellacci S., Vernesi C., Penna A. Genome complexity of harmful microalgae // *Harmful Algae*. 2017. Vol. 6, N 63. P. 7–12.

Chinain M., Faust M.A., Paullac S. Morphology and molecular analyses of three species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov // J. Phycol. 1999. Vol. 35. P. 1282–1296.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E. et al. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2008. N 19. P. 111–120.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E. et al. First finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* toxins in marine aerosols // Environ. Sci. Technol. 2014. N 48. P. 3532–3540.

Edwardsen B., Eikrem W., Throndsen J. et al. Ribosomal DNA phylogenies and a morphological revision provide the basis for a revised taxonomy of the Prymnesiales (Haptophyta) // Europ. J. Phycol. 2011. Vol. 46, N 3. P. 202–228.

Edwardsen B., Imai I. The ecology of harmful flagellates within Prymnesiophyceae and Raphidophyceae // Ecology of harmful algae, ecological studies/ Ed. by E. Graneli, J.T. Turner. Berlin: Springer, 2006. P. 67–79.

Edwardsen B., Paasche E. Bloom dynamics and physiology of *Prymnesium* and *Chrysochromulina* // Physiological ecology of harmful algal blooms/ Ed. by D.M. Anderson, A.D. Cembella, G.M. Hallegraeff. Berlin: NATO ASI Series, Springer-Verlag, 1998. P. 193–208.

Efimova K.V., Orlova T.Yu., Brykov V.I.A. Phylogenetic characterization of cryptic species of the marine dinoflagellate, *Ostreopsis* sp. Schmidt, 1902, from Russian coastal waters, the Sea of Japan // J. Biodiver. Environ. Sci. 2014. Vol. 5, N 4. P. 317–332.

Emura A., Matsuyama Y., Oda T. Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori* // Harmful Algae. 2004. Vol. 3, N 1. P. 29–37.

Faust M.A., Larsen J., Moestrup Ø. Potentially toxic phytoplankton, 3: Genus *Prorocentrum* (Dinophyceae) // ICES Identification Leaflets for Plankton. Copenhagen: International Council for the Exploitation of the Sea. 1999. N 184. pp. 1–24.

Fuentes-Grünwald C., Clement A., Aguilera A.B. *Alexandrium catenella* bloom and the impact on fish farming in the XI region, Chile // Proceeding of the International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Copenhagen, 2008. P. 183–186.

Fujiki H., Suganuma M., Suguri H. et al. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin // *Japan J. Cancer Res.* 1988. N 79. P. 1089–1093.

Gao Y., Yu R.C., Murray S.A. et al. High specificity of a quantitative PCR assay targeting a saxitoxin gene for monitoring toxic algae associated with paralytic shellfish toxins in the Yellow Sea // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. Vol. 81. P. 6973–6981.

García C., González V., Cornejo C., Palma-Fleming H., Lagos N. First evidence of Dinophysistoxin-1 ester and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked bivalves collected in the Patagonia fjords // *Toxicon.* 2004. Vol. 43, N 2. P.121–131.

Gottschling M., Knop R., Plotner J. et al. A molecular phylogeny of *Scrippsiella sensu lato* (Calciodinellaceae, Dinophyta) with interpretations on morphology and distribution // *Europ. J. Phycol.* 2005. Vol. 40. P. 207–220.

Granéli E., Vidyarthna N.K., Funari E. et al. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? // *Harmful Algae.* 2011. Vol. 10, N 2. P. 165–172.

Guillou L., Nézan E., Cueff V. et al. Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French Coasts // *Protist.* 2002. N 153. P. 223–238.

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // *Syst. Biol.* 2010. Vol. 59. P. 307–321.

Hallegraeff G.M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase // *Phycologia.* 1993. Vol. 32, N 2. P. 79–99.

Hällfors G. *Chrysochromulina birgeri* Hällfors & Niemi (Prymnesophyceae). Baltic Sea phytoplankton identification sheet no. 2 // *Acta Botanica Fennica.* 1989. N 26. P. 91–92.

Hällfors G., Thomsen A. Further observations on *Chrysochromulina birgeri* (Prymnesiophyceae) from the Tvärminne archipelago, SW coast of Finland // *Acta Bot. Fennica.* 1979. N 110. P. 41–46.

Heisler J., Glibert P.M., Burkholder J.M. et al. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus // *Harmful Algae.* 2008. Vol. 8, N 1. P. 3–13.

Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation // *Mol. Biol. Evol.* 2017. Vol. 35. P. 518–522.

Hoppenrath M., Chomérat N., Horiguchi T. et al. Taxonomy and phylogeny of the benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae) – a proposal and review // Harmful Algae 2013. Vol 27. P. 1–28.

Ishikawa A. Population dynamics of *Scrippsiella* spp. and other cyst-forming armored dinoflagellates with special reference to the role of cysts. PhD thesis. Sendai: Tohoku University, Sendai. 1995. 184 p.

John U., Litaker R.W., Montresor M. et al. Formal revision of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification // Protist. 2014. Vol. 165, N 6. P. 779–804.

Kameneva P.A., Efimova K.V., Rybin V.G., Orlova T.Yu. Detection of dinophysistoxin-1 in clonal culture of marine dinoflagellate *Prorocentrum foraminosum* (Faust M.A., 1993) from the Sea of Japan // Toxins. 2015. Vol. 7, N 10. P. 3947–3959.

Kantiani L., Llorca M., Sanchis J., Farre M., Barcelo D. Emerging food contaminants: A review // Anal. Bioanal. Chem. 2010. N 398. P. 2413–2427.

Kellmann R., Mihali T.K., Jeon Y.J. et al. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2008. Vol. 74, N 13. P. 4044–4053.

Kim Y.O., Han M.S. Seasonal relationships between cyst germination and vegetative population of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) // Mar. Ecol. Progress Ser. 2000. Vol. 204. P. 111–118.

Lepskaya E., Mogilnikova T., Shubkin S., Tepnin O. Red tides of *Alexandrium* affecting salmon in Kamchatka, Russia // Harmful Algae News. 2018. N 59. P. 20–21.

Li Q., Legendre L., Jiao N. Phytoplankton responses to nitrogen and iron limitation in the tropical and subtropical Pacific Ocean // J. Plankton Res. 2015. Vol. 37. P. 306–319.

Lilly E.L., Halanych K.M., Anderson D.M. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* species complex // J. Phycol. 2007. N 43. P. 1329–1338.

Lundholm N., Moestrup Ø., Akselmann R. et al. IOC-UNESCO taxonomic reference list of harmful micro algae. 2017. [EB/OL]. <http://www.marinespecies.org/hab>.

Masseret E., Grzebyk D., Nagai S. et al. Unexpected genetic diversity among and within populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* as revealed by nuclear microsatellite markers // Appl. Environ. Microbiol. 2009. N 75. P. 2037–2045.

McNeill J., Barrie F.R., Buck W.R. et al. International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011 // *Regnum Vegetabile*. 2012. Vol. 154. P. 1–240.

Medlin L.K., Kooistra W.H.C.F. Methods to estimate the diversity in the marine photosynthetic protist community with illustrations from case studies: a review // *Diversity*. 2010. N 2. P. 973–1014.

Medlin L.K., Montresor M., Graneli E. et al. MIDTAL (Microarrays for the Detection of toxic Algae) // *Phytotaxa*. 2013. N 127. P. 201–210.

Medlin L.K., Orozco J. Molecular techniques for the detection of organisms in aquatic environments, with emphasis on harmful algal bloom species // *Sensors*. 2017. N 17. E1184.

Moestrup Ø. Economic aspects: ‘blooms’, nuisance species and toxins // *The haptophyte algae. Systematics Association Special Volume/ Ed. by J.C. Green, B.S.C. Leadbeater. Oxford, UK: Clarendon Press, 1994. P. 265–285.*

Monti M., Minocci M., Beran A., Iveša L. First record of *Ostreopsis* cf. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea // *Mar. Pollut. Bull.* 2007. Vol. 54, N 5. P. 598–601.

Montresor M., Montesarchio E., Marino D., Zingone A. Calcareous dinoflagellate cysts in marine sediments of the Gulf of Naples (Mediterranean Sea) // *Rev. Palaeobot. and Palynol.* 1994. Vol. 84. P. 45–56.

Montresor M., Sgrosso S., Procaccini G., Kooistra W. Intraspecific diversity in *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae): evidence for cryptic species // *Phycol.* 2003. Vol. 42. P. 56–70.

Morquecho L., Lechuga-Devéze C.H. Dinoflagellate cysts in recent sediments from Bahía Concepción, Gulf of California // *Bot. Mar.* 2003. Vol. 46. P. 132–141.

Morozova T.V., Orlova T.Y., Efimova K.V., Lazaryuk A.Y., Burov B.A. *Scrippsiella trochoidea* cysts in recent sediments from Amur Bay, Sea of Japan: distribution and phylogeny // *Bot. Mar.* 2016. Vol. 59 (2–3). P. 159–172.

Morton S.L., Norris D.R., Bomber J.W. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1992. Vol. 157, N 1. P. 79–90.

Murray S.A., Wiese M., Stüken A. et al. SxtA-based quantitative molecular assay to identify saxitoxin-producing harmful algal blooms in marine waters // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. Vol. 77. P. 7050–7057.

Murray S., Wiese M., Neilan B.A. et al. A reinvestigation of saxitoxin production and sxtA in the 'non-toxic' *Alexandrium tamarense* Group V clade // Harmful Algae. 2012. N 18. P. 96–104.

Nehring S. *Scrippsiella* spp. resting cysts from the German Bight (North Sea): a tool for more complete check-lists of dinoflagellates // Netherlands J. Sea Res. 1994. Vol. 33, N 1. P. 57–63.

Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // Mol. Biol. Evol. 2015. Vol. 32. P. 268–274.

NHMRC (National Health and Medical Research Council) // Guidelines for Managing Risks in Recreational Water. Canberra, Australia, 2008.

Omura T., Iwataki M., Borja V.M., Takayama H., Fukuyo Y. Marine phytoplankton of the Western Pacific // Japan: Tokyo, Kouseisha Kouseikaku, 2012. 160 p.

Orlova T.Y. Diversity of potentially toxic microalgae on the east coast of Russia, in Marine Biodiversity and Ecosystem Dynamics of the Northwest Pacific Ocean. Beijing: Science Press, 2014. P. 77–91.

Orlova T.Yu., Efimova K.V., Stonik I.V. Morphology and molecular phylogeny of *Pseudohaptolina sorokinii* sp. nov. (Prymnesiales, Haptophyta) from the Sea of Japan, Russia // Phycol. 2016. Vol. 55, N 5. P. 506–514.

Orlova T.Y., Konovalova G.V., Stonik I.V. et al. Harmful algal blooms on the eastern coast of Russia // In: HABs in the PICES Region of the North Pacific (Ed. by F.J.R. Taylor & V.L. Trainor). PICES Sci. Rept. 2002. N 23, pp. 47–73.

Orlova T.Yu., Morozova T.V., Gribble K.E., Kulis D.M., Anderson D.M. Dinoflagellate cysts in recent marine sediments from the east coast of Russia // Bot. Mar. 2004. Vol. 47, N 3. P. 184–201.

Orlova T.Y., Selina M.S., Lilly E.L., Kulis D.M., Anderson D.M. Morphogenetic and toxin composition variability of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) from the east coast of Russia // Phycol. 2007. Vol. 46. P. 534–548.

Orlova T.Y., Stonik I.V., Shevchenko O.G. Species composition of planktonic microalgae in Amurskii Bay, Sea of Japan // Rus. J. Mar. Biol. 2009. N 35. P. 48–61.

Parsons M.L., Aligizaki K., Bottein M.-Y.D. et al. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology // Harmful Algae. 2012. Vol. 14. P. 107–129.

Paz B., Daranas A.H., Norte M. et al. Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview // Mar. Drugs. 2008. Vol. 6. P. 73–102.

Penna A., Bertozzini E., Battocchi C. et al. Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular methods // J. Plankton Res. 2007. Vol. 29, N 1. P. 19–38.

Penna A., Battocchi C., Garcés E. et al. Detection of microalgal resting cysts in European coastal sediments using a PCR-based assay // Biol. Mar. Mediterr. 2009. N 16. P. 150–153.

Penna A., Fraga S., Battocchi C. et al. A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt // J. Biogeogr. 2010. Vol. 37, N 5. P. 830–841.

Perini F., Casabianca A., Battocchi C. et al. New approach using the Real-Time PCR method for estimation of the toxic marine dinoflagellate // PLoS One. 2011. Vol. 6, N 3. e17699.

Pezzolesi L., Guerrini F., Ciminiello P. et al. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis* cf. *ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays // Water Res. 2012. Vol. 46, N 1. P. 82–92.

Pistocchi R., Pezzolesi L., Guerrini F. et al. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata* // Toxicon. 2011. Vol. 57, N 3. P. 421–428.

Sato S., Nishimura T., Uehara K. et al. Phylogeography of *Ostreopsis* along west Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan // PLoS ONE. 2011. Vol. 6, N 12. e27983.

Scholin C.A., Anderson D.M., Sogin M.L. Two distinct small-subunit ribosomal RNA genes in the North American toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) // J. Phycol. 1993. Vol. 29. P. 209–216.

Scholin C.A., Hallegraeff G.M., Anderson D.M. Molecular evolution of the *Alexandrium tamarensis* species complex (Dinophyceae): dispersal in the North American and West Pacific region // Phycol. 1995. Vol. 34. P. 472–485.

Selina M.S., Orlova T.Yu. First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan // Bot. Mar. 2010. Vol. 53. P. 243–249.

Selina M.S., Levchenko E.V. Species composition and morphology of dinoflagellates (Dinophyta) of epiphytic assemblages of Peter the Great Bay in the Sea of Japan // Russ. J. Mar. Biol. 2011. Vol. 37, N 1. P. 23–32.

Selina M.S., Morozova T.V., Vyshkvartsev D.I., Orlova T.Yu. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species // Harmful Algae. 2014. Vol. 32. P. 1–10.

Selina M.S. Seasonal and long-term dynamics of sand-dwelling dinoflagellates (Dinoflagellata) in Peter the Great Bay, Sea of Japan // Russ. J. Mar. Biol. 2016. Vol. 42, N 6. P. 458–470.

Sengco M.R., Hagström J.A., Granéli E., Anderson D.M. Removal of *Prymnesium parvum* (Haptophyceae) and its toxins using clay minerals // Harmful Algae. 2005. Vol. 4. P. 261–274.

Shulkin V.M., Orlova T.Y., Shevchenko O.G., Stonik I.V. The effect of river runoff and phytoplankton production on the seasonal variation of the chemical composition of the coastal waters of Amursky Bay, Sea of Japan // Rus. J. Mar. Biol. 2013. Vol. 39, N 3. P. 197–207.

Stüken A., Orr R.J., Kellmann R. et al. Discovery of nuclear-encoded genes for the neurotoxin saxitoxin in dinoflagellates // PLoS One. 2011. Vol. 6(5). e20096.

Sun P.-F., Lin H., Wang G., Lu L.-L., Zhao Y.-H. Preparation of a new-style composite containing a key bioflocculant produced by *Pseudomonas aeruginosa* ZJU1 and its flocculating effect on harmful algal blooms // J. Hazard. Mater. 2015. Vol. 284. P. 215–221.

Suzuki T., Watanabe R., Uchida H. et al. LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan // Harmful Algae. 2012. Vol. 20. P. 81–91.

Takahashi E. Floristic study of ice algae in the sea ice of a lagoon, Lake Saroma, Hokkaido, Japan // Memoirs of the National Institute of Polar Research. Ser. E. Biological and Medical Sciences. 1981. N 34. P. 49–56.

Tanimoto Y., Yamaguchi H., Yoshimatsu T. et al. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of toxic *Ostreopsis* sp. 1 and *Ostreopsis* sp. 6 (Dinophyceae) isolated from Japanese coastal waters // Fish. Sci. 2013. Vol. 79, N 2. P. 285–291.

Thronsen J. The planktonic marine flagellates // Identifying marine phytoplankton. New York: Academic Press, 1993. P. 591–729.

Tillmann U., Alpermann T., John U., Cembella A. Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists // Harmful Algae. 2008. N 7. P. 52–64.

Toebe K., Alpermann T., Tillmann U. et al. Molecular discrimination of toxigenic and non-toxic *Alexandrium* species in natural phytoplankton assemblages from the Scottish coast of the North Sea // Eur. J. Phycol. 2013. Vol. 48. P. 12–26.

Touzet N., Keady E., Raine R., Maher M. Evaluation of taxa-specific real-time PCR, whole-cell FISH and morphotaxonomy analyses for the detection

and quantification of the toxic microalgae *Alexandrium minutum* (Dinophyceae), Global Clade ribotype // FEMS Microbiol. Ecol. 2009. Vol. 67, N 2. P. 329–341.

Wall D., Guillard R.R.L., Dale B., Swift E., Watabe N. Calcitic resting cysts in *Peridinium trochoideum* (Stein) Lemmermann, an autotrophic marine dinoflagellate // Phycol. 1970. Vol. 9. P. 161–156.

Wang Z.F., Yu Z.M., Song X.X., Cao X.H., Han X.T. Effects of modified clay on cysts of *Scrippsiella trochoidea* for harmful algal bloom control // Chin. J. Oceanol. Limnol. 2014. Vol. 32, N 6. P. 1373–1382.

Wang Z., Wang C., Wang P., Qian J., Hou J., Ao Y. et al. The performance of chitosan/montmorillonite nanocomposite during the flocculation and floc storage processes of *Microcystis aeruginosa* cells // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2015. Vol. 22. P. 11148–11161.

WHO (World Health Organization). 2003. Guidelines for Safe Recreational Water Environments: Vol. 1: Coastal and Fresh Waters. World Health Organization. (www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1/en/)

Yamaguchi H., Yoshimatsu T., Tanimoto Y. et al. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae) from Japanese coastal waters // Phycol. Res. 2012. Vol. 60, N 4. P. 297–304.

Yek L.H., Hii K.S., Tan T.H. et al. Rapid detection of Toxic Dinoflagellate, *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) using fluorescence in situ hybridization (Fish) // Malays. J. Med. Sci. 2013. Vol. 32, N 3. P. 65–80.

Yu Z., Song X., Cao X., Liu Y. Mitigation of harmful algal blooms using modified clays: Theory, mechanisms, and applications // Harmful Algae. 2017. Vol. 69. P. 48–64.

Zheng X., Zhang B., Zhang J. et al. A marine algicidal actinomycete and its active substance against the harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. Vol 97, N 20. P. 9207–9215.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ НА ПРИМЕРЕ РЫБ

Ю.Ф. Картавцев^{1,2}, С.В. Туранов^{1,3}, А.О. Золотова¹

¹ *Национальный научный центр морской биологии
им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения
Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН),
Владивосток 690041*

² *Дальневосточный федеральный университет,
Владивосток 690091*

³ *Дальневосточный рыбохозяйственный университет,
Владивосток 690087*

*E-mails: yuri.kartavtsev48@hotmail.com; sturcoal@mail.ru;
anna.o.zolotova@gmail.com*

MOLECULAR MARKERS AND THEIR USE IN THE STUDY OF BIODIVERSITY WITH FISHES AS A SAMPLE

Yu.Ph. Kartavtsev^{1,2}, S.V. Turanov^{1,3}, A.O. Zolotova¹

¹*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology,
FEB RAS, Vladivostok 690041; ²Far Eastern Federal University,
Vladivostok 690091;*

³*Far Eastern Fishery University, Vladivostok 690087*

*e-mail: yuri.kartavtsev48@hotmail.com; sturcoal@mail.ru;
anna.o.zolotova@gmail.com*

Охарактеризованы молекулярные маркеры (ММ) и даны оценки состоятельности их использования для идентификации видов при описании биологического разнообразия. Отмечен широкий спектр применения ММ в биологии и биомедицине. Впервые получены оригинальные данные о систематике, распространении и видообразовании нескольких таксонов

рыб дальневосточных морей России совместно с пополнением мировых и собственных баз данных, способствующих более качественной работе систематиков, музейных работников и представителей рыбной промышленности. С помощью ММ доказано наличие фальсификаций рыбной продукции, представленной в торговой сети. Полученные новые данные о

молекулярной эволюции хорошо согласуются с главными парадигмами общей биологии: Синтетической теорией эволюции и Биологической концепцией вида. Доказано, что генетическая интрогрессия имеется, однако её уровень, а также распространённость ретикуляции генных деревьев переоценены. Топология генных деревьев преимущественно монофилетична, что выявлено при анализе обширной международной базы данных BOLD по рыбам.

Molecular markers (MM) and their validity as a tool for the species/ specimens delimitation and for biodiversity investigation are defined. The wide spectrum of MM application in biology and medicine is noted. For the first time an original data on systematics, distribution

and speciation in several fish taxa of Russia Far East seas jointly with own and conventional world data bases repletion are obtained that help for more efficient job of experts in taxonomy, museum's staff and the officers of fishery industry. With the MMs usage the cases of sea food fraud (misslabelling) were found in fish stores. New data that obtained on molecular evolution are well agreed with current main general biology paradigms, the Synthetic Theory of Evolution and Biological Species concept. It is proved that genetic introgression between species exist but her extent as well as presence of gene trees' reticulation are overestimated. The topology of gene trees are generally monophyletic that proved on vast BOLD data base with fish.

1. Глобальные вызовы и описание биологического разнообразия

Излагаемое в представляемом разделе исследование направлено на решение проблем изучения биологического разнообразия (биоразнообразия), сущности биологического вида, видообразования, филогенетики и микроэволюции. Данные проблемы являются ключевыми в общей биологии и общей генетике. Наиболее принята в настоящее время синтетическая теория эволюции (СТЭ), частью которой является биологическая концепция вида (БКВ). Обоснование и систематическое изложение СТЭ представлено в работах Холдейна (Haldane, 1932), Добжанского (Dobzhansky, 1937, 1951, 1970), Хаксли (Huxley, 1954), Майра (Майр, 1968; Mayr, 1982). В России популярным обобщением СТЭ стала книга Тимофеева-Ресовского и соавторов (Тимофеев-Ресовский и др., 1977). Конструктивное развитие положений СТЭ предложено Добжанским (Dobzhansky, 1970), Воронцовым (Воронцов, 1980), Харрисоном (Harrison, 1998) и др. Одно из уязвимых мест СТЭ – отсутствие, как правило, воз-

возможности экспериментальной проверки ключевого в БКВ критерия нескрещиваемости видов в природе. Недавно, с развитием филогенетики, возникли новые противоречия между БКВ, филогенетической концепцией вида, а также реанимированы и старые противоречия с другими концепциями (Avice, Wollenberg, 1997; Templeton, 1981, 1998), которые доходят даже до отвержения значимости для филогенетики текущих микроэволюционных процессов. Не вполне разработана в СТЭ и теория видообразования. Точнее говоря, в количественно-аналитическом смысле теория как таковая вообще отсутствует; имеется только некоторый набор концепций. Важны в этом контексте и работы по проблемам микроэволюции, что определяется зависимостью многих направлений работ и результирующих выводов в области общей генетики, популяционной, эволюционной и экологической генетики от исходных предпосылок в анализируемом полиморфизме макромолекул и маркируемых ими локусов (селективность/нейтральность, темп мутаций, генетически эффективный размер и др.). Иными словами, проводя генетико-эволюционные и другие исследования, эти вопросы нельзя оставлять без внимания. Актуальность разрешения перечисленных проблем для природных видов, несомненно, возрастает с усилением антропогенного пресса на экосистемы и реализацией реабилитационных программ, в том числе для сохранения популяций и видов промышленно и рекреационноценных объектов. Часть из перечисленных проблем касается напрямую вопросов оценки и сохранения биоразнообразия, генетических ресурсов. Для многих групп водных организмов возникают различные таксономические проблемы, но наиболее частой из них является видовая идентификация особей. Особенно много вопросов возникает с идентификацией видов на ранних стадиях онтогенеза (личинки, молодь). На основе первичных последовательностей нуклеотидов (далее – последовательностей) генов цитохромоксидазы *c* субъединицы 1 (цитохромоксидазы 1, *Co-1*) и цитохрома *b* (*Cyt-b*) митохондриальной ДНК (мтДНК) удается однозначно идентифицировать виды, в том числе начиная с самых ранних стадий развития (Hebert et al., 2003a,b). Много последовательностей, несущих филогенетический сигнал, получено для разных групп также и по гену *16S* рРНК. Обзор данных внутривидовой дивергенции по митохондриальным генам 256 видов позвоночных животных, размножающихся, как правило, половым путем, позволил заключить, что 56% из них формируют отчетливые внутривидовые мате-

ринские линии, которые имеют в подавляющем большинстве географическую приуроченность. Иначе говоря, политипичность или подразделенность на группы большинства видов документируется генетическими материалами, независимыми от других биологических данных, и хорошо с ними согласуется (Avice, 2000).

Более конкретная фундаментальная задача работ – исследовать филогенетические отношения и таксономию в четырех отрядах рыб: карпообразные, камбалообразные, окунеобразные и скорпенообразные на основе методов молекулярной и эволюционной генетики. Для сравнения темпов эволюции в различных группах, а также с прикладными целями исследованы также другие таксоны рыб.

Молекулярно-таксономические и эволюционные исследования рыб и других организмов основываются на полученных оценках дивергенции или расстояний по последовательностям нуклеотидов в генах ядерной ДНК (яДНК) и мтДНК на различных уровнях таксономической иерархии и требуют понимания степени сопоставимости данных для разных генов и выбранных уровней иерархии. Поэтому анализ собственных и литературных сведений в плане сопоставимости данных, например по расстояниям или его дериватам, – это одна из существенных конкретных фундаментальных задач исследований. При реконструкции филогенетических связей в современных исследованиях, как правило, учитываются как молекулярно-генетические (аллозимы, иммуногенетические маркеры, последовательности ДНК, последовательности аминокислот и т.п.), так и морфологические данные. Консенсусная филогения разрабатывается на основе анализа комплекса признаков. В отношении многих групп рыб это особенно актуально. К примеру, красноперки рода *Tribolodon* – группа, вызывающая длительную полемику таксономистов. Для некоторых пар видов красноперок твердо диагностическими на сегодня можно считать только генетико-биохимические и молекулярно-генетические признаки. Виды красноперок легко гибридизуют между собой и молодь морфологически плохо различается (Гриценко, 2002). Аналогично, например, существует много таксономических проблем для семейства Pleuronectidae, для родов настоящих и палтусовидных камбал (*Pseudopleuronectes* и *Hippoglossoides*). Для некоторых пар видов этих родов нет ясных диагностических признаков и основную надежду на прояснение таксономических отношений можно возлагать лишь на комплекс подходов, включая

генетико-биохимические и молекулярно-генетические признаки. Виды у камбал в группе молодых особей морфологически отличаются очень плохо (Винников и др., 2006), как и у многих других рыб. В целом авторы представляемого обзора сфокусировали главное внимание на филогенетических исследованиях рыб Восточной Евразии, по которым есть задел: в первую очередь это камбалообразные, окунеобразные, скорпенообразные и карпообразные. Предварительно из перечисленных выше отрядов по нуклеотидным последовательностям проанализированы взаимосвязи среди представителей ряда семейств (сем.) (Pleuronectidae, Stichaeidae, Cobitidae) и обнаружены серьезные противоречия между филогенетическими построениями и существующей традиционной классификацией. Секвенирование митохондриального генома (митогенома) в целом или его отдельных генов, таких как *Co-1* и *Cyt-b*, для большинства природных видов дает два точно предсказуемых результата: (1) однозначная идентификация особей видов и других таксонов до уровня семейства (Kartavtsev, 2009, 2011a,b, 2013a; Картавец, 2013; Картавец, Редин, 2019) и (2) количественная оценка степени родства особей видов и других таксонов, а также выяснение филогенетических связей и дивергенции единиц классификации во временной шкале. Оба результата имеют как общебиологическое, так и прикладное значение. Фундаментальное значение состоит в установлении или уточнении положения вида (таксона) в системе и времени его возникновения, позволяя корректировать наши знания о биоразнообразии и систематике рыб и других таксонов. Кроме того, благодаря возможности различения по мтДНК- и яДНК-маркерам не только особей definitivaльного размера, но находящихся на личиночных стадиях, а также возможности видовой дискриминации яйцеклеток, личинок и содержимого желудков взрослых животных открываются перспективы более точной оценки динамики и продуктивности самих видов и сообществ в целом, уточнения, например, биомассы планктона и его биоразнообразия. Применяемые методы, будучи высокоэффективными для различения образцов тканей промысловых видов рыб, к которым относятся многие виды камбалообразных и других рыб, могут дать приложение полученных результатов в рыбохозяйственную практику и музейное дело. Перечисленные в данном абзаце положения легли, среди прочих, в основу экспресс-диагностики или ДНК-штрихкодирования (DNA barcoding) видов на основе последовательностей нуклеотидов ДНК гена *Co-1*, глобальной про-

граммы iBOL (International Barcoding of Life; www.ibol.org), широко развиваемой в последние годы, в том числе для рыб (Ward et al., 2005, 2008). Об этом пойдет речь подробнее в разделе 2.

2. Молекулярные маркеры и сферы их применения в биологии и медицине

ДНК-штрихкодирование в РФ и в мире в рамках упомянутой глобальной программы iBOL широко развивается. Это направление получило применение в биологии с 2003 г. (Hebert et al., 2003a,b). Однако истоки приложения изменчивости биологических макромолекул, например, в систематику и эволюционную биологию имеют давние корни (Антонов, Белозерский, 1961; Zuckerkandl, Pauling, 1965; Hubby, Throckmorton, 1965; Антонов и др., 1971; Nanney, 1982). В целом биологические молекулярные маркеры нашли многочисленные сферы применения в зависимости от потребностей современного общества. Обозначим, что такое биологический молекулярный маркер. *Биологический молекулярный маркер (ММ) – это любая макромолекула живого организма, способная быть идентификатором определенной функции, результатов биохимического, популяционного или эволюционного процесса.* Изучение и использование молекулярных маркеров уже стало новой ветвью биомедицинской науки, о чем свидетельствует наличие специальных журналов (Biomarkers, Journal of Current Biomarker Findings, Biomarker Insights, DNA barcodes и др.). Молекулярные маркеры применяются в биологии и медицине во многих областях. Можно отметить три наиболее значимые:

1. ДНК-штрихкодирование. Молекулярные маркеры нашли применение в глобальной программе переописания биологического разнообразия на современной молекулярной и биоинформационной основе (iBOL). В качестве стандартного маркера или ДНК-штрихкода для большинства беспозвоночных и позвоночных животных используют последовательность гена *Co-1*, кодирующего субъединицу 1 цитохромоксидазы с мтДНК. Для простоты работы в качестве штрихкода используется первая половина гена длиной порядка 650 пар нуклеотидов (п.н.) (Hebert et al., 2003a,b; Ratnasigham, Hebert, 2007). Для растений больше подходят другие молекулярные маркеры или штрихкоды (Ratnasigham, Hebert, 2007; Шнеер, Родионов, 2018; Жохова и др., 2019). Основа успешной идентификации на этом уровне – низкая внутривидовая изменчивость (слабые различия последовательностей между особями одного вида), но на порядок большая

межвидовая дивергенция образцов (между особями разных видов): в среднем для животных – примерно 0,5–1,0 и 10% дивергенции соответственно (Картавец, Ли, 2006; Картавец, 2013; Картавец, Редин, 2019; Kartavtsev, 2009, 2011a,b, 2013a, 2018; Stoeckle, Thaler, 2018, Fig. 2).

2. Молекулярные маркеры для идентификации стад, линий и пород животных. Для этого уровня *Co-1* и другие молекулярные маркеры мтДНК не вполне подходят, поскольку относительно мало изменчивы внутри вида (хотя имеются исключения). Обычно более консервативные у животных молекулярные маркеры яДНК еще менее применимы на этом уровне. Наибольшую результативность для выявления различий между популяциями, породами, линиями животных и их паспортизации у высших организмов проявляют локусы микросателлитных ДНК и однонуклеотидные замены.

Одно из прикладных приложений молекулярных маркеров – идентификация гибридов и инвазивных видов. В связи с глобализацией и интенсификацией международной торговли продуктами питания огромное значение приобретает идентификация образцов при экспортно-импортных операциях. Фальсификация товарных марок, например филе рыбы, икры и других продуктов, может быть точно установлена по молекулярным маркерам, что помогает государственным и частным предприятиям избежать значительных экономических и репутационных потерь (Nedunooory et al., 2017).

3. Наибольшее значение молекулярные маркеры приобрели в сфере медицины при диагностике заболеваний (в частности, рака молочной железы, предстательной железы, толстой кишки и др.), в криминалистике с целью исключения из подозреваемых тех или иных индивидуумов. В сферу применения молекулярных маркеров входит и мониторинг генетической безопасности для оценки рисков использования рекомбинантных ДНК и генетически модифицированных продуктов/объектов в пищевой и медицинской промышленности (Жохова и др., 2019).

Вышеперечисленные направления работ кроме очевидных прикладного значения в медицине и для описания биоразнообразия имеют важное значение для парадигм общей биологии, эволюционной генетики, а также для научной составляющей программы iVOL, имея определяющее значение при идентификации видов путем ДНК-штрихкодирования. В базе данных iVOL на 28.11.2019 аккумулированы результаты исследования, всего составившие 10343400 образцов живых организмов, а число образцов со штрихкодами – 7704647, число идентифицированных по штрихкодам видов – 305619 (<http://boldsystems.org>; Taxonomic Browser). Все эти

данные сопровождаются унифицированной документацией по стандартам iVOL и доступны любому пользователю через Интернет. Вклад РФ и RUS-BOL (<http://wwwimb.dvo.ru/misc/barcoding/index.htm>) в исследования по ДНК-штрихкодированию имеются в централизованной базе данных BOLD (www.boldsystems.org) и составляют 32177 опубликованных в базе записей, образующих 7097 кластеров штрихкодов, которые представлены 241 организациями (лабораториями). Сделанные в BOLD записи относятся к 16764 видовым именам, представляют в целом 4438 видов. РФ по активности находится в середине списка участников программы, на уровне таких стран, как Бразилия и Франция.

Встречающаяся в подавляющем большинстве таксонов успешная идентификация видов на основе ДНК-штрихкодов составляет сейчас обширную естественно-научную базу и требует объяснения и теоретического обоснования (Kartavtsev, 2013a; 2018; Stoeckle, Thaler, 2018). В одном из подходов для представления биологической основы этого феномена предлагается ориентироваться преимущественно на измерение дивергенции посредством попарных расстояний, меры эквивалентной p -расстоянию или доле различающихся нуклеотидов в паре случайно выбранных последовательностей (Nei, Kumar, 2000; Картавцев, 2013), а также оценивая молекулярные особенности *Co-I* и мтДНК в целом (Stoeckle, Thaler, 2018). В другом подходе, реализуемом в данной работе, предполагается, что подобная особенность существует в основном благодаря преобладанию в природе географического способа видообразования, допускающего накопление организмами стохастических мутаций и уникальных замен нуклеотидов в цепях ДНК и других макромолекул при формировании дочерних популяций (таксонов) в условиях изоляции. При реализации этой модели особи разных видов экспериментально идентифицируемы посредством ДНК-штрихкодов и, кроме того, при соответствующем анализе можно обнаружить корреляцию p -расстояний и рангов таксонов (Kartavtsev, 2011a,b, 2013a, 2018; Картавцев, 2013; Картавцев, Редин, 2019).

Чтобы разобраться в этих вопросах, требуется специальное рассмотрение эмпирических данных, разносторонний их анализ и сопряжение с генетическими основами видообразования, а также с соответствующими положениями БКВ и более широко с неodarвинизмом или СТЭ. Актуальность такой работы также определяется необходимостью рассмотреть критику парадигм БКВ/СТЭ, базирующуюся на представлениях об обширной интрогрессии (Arnold, 1997, 2006; Arnold, Emms, 1998; Arnold,

Fogarty, 2009) и ретикулярной эволюции (Arnold, Fogarty, 2009; Боркин, Литвинчук, 2013). Эти вопросы уже частично поднимались (Картавец, 2005, 2009, 2013; Kartavtsev, 2011a,b, 2013a,b).

В данной работе представлено совместное рассмотрение интрогрессии и ретикуляции, а также проведен анализ генетических расстояний для молекулярного маркера *16S* рРНК и для полных митогеномов по выборке последовательностей из GenBank (www.ncbi.gov). Эти маркеры ранее не были использованы в сравнительно-эволюционном аспекте (детализация этих материалов дана в разделе 5). Изменчивость генетических расстояний в иерархии таксонов по гену *16S* рРНК вообще не представлена в литературе, а по митогеномам ранее рассмотрена только для трех конкретных таксонов (Kartavtsev et al., 2016; Turanov et al., 2017; Redin, Kartavtsev, 2017). Один из ключевых вопросов данного краткого обзора как раз состоит в поиске ответа, позволяют ли имеющиеся более обширные фактические данные сделать обобщения о широком присутствии генетической интрогрессии и ретикуляции в исследуемых генных деревьях. Или же, наоборот, подтвердить согласованность молекулярно-генетических данных с БКВ/СТЭ. Безусловно, сама СТЭ не догма и требует дальнейшего развития. В действительности, для биологии СТЭ – это общая эволюционная концепция и поэтому может именоваться теорией. Но с формально-научных позиций вряд ли она соответствует критериям теории. Теория должна содержать аналитическое описание в математических терминах или/и представлять строгую модель, скажем, компьютерную и иметь прогностические компоненты. Понимание этого недостатка в соответствующей литературе имеется, как и периодически появляются фрагменты теоретических работ различной степени подробности (Nei, 1987; Bush, 1975; Templeton, 1981, 1998; Kondrashov et al., 1998; Zhuravlev, Avetisov 2006; Картавец, 2009; Kartavtsev, 2009, 2011a,b, 2013a, 2015).

Данные о возможном влиянии интрогрессии генов на эволюцию видов, эволюционную судьбу таксонов, включая ретикуляции филогенетических деревьев, а также согласованность современных молекулярно-генетических данных в целом с главной современной эволюционной парадигмой, неodarвинизмом, представлены во многих публикациях (Barton, Hewitt, 1985; Campton, 1987; Avise, 2000; Gerber, 2001; Arnold, 1997, 2006; Arnold, Fogarty, 2009; Kartavtsev, 2013a, 2018; Stoeckle, Thaler, 2018; Картавец, Редин, 2019). Учитывая проблематику материала данной главы,

важно уточнить некоторую филогенетическую терминологию в самом начале. Термин генное дерево был введен довольно давно (Tateno et al., 1982; Nei, 1987; Картавец, 2009). *Генное дерево – это филогенетическое дерево, построенное по данным для одного гена.* Это понятие противопоставляется понятию «видовое дерево» (Nei, 1987; Картавец, 2009, с. 189), которое включает филогенетический сигнал по нескольким генам, а также может инкорпорировать и другие признаки. Филогенетическое дерево, включая генное дерево, может иметь различную топологию, в том числе иметь единые корни для ветвей/узлов/кластеров (монофилия) или иные ветвления (пара- или полифилия). Безусловно, имеются различные дискуссионные вопросы относительно БКВ/СТЭ. В представленном экскурсе в разделе 5 рассматриваются в основном четыре вопроса: 1. Какие методы обнаружения гибридов и генетической интрогрессии или потока генов являются наиболее подходящими? 2. О чем свидетельствуют факты, полученные на основе мтДНК и яДНК маркеров? 3. Имеются ли в литературе данные о соответствии молекулярной изменчивости в филогенетических линиях или таксонах с БКВ/СТЭ? 4. Насколько часто встречаются ретикуляции и политомии генных деревьев, а также какой главный информационный сигнал выявляет их топология? Преимущественно в настоящей главе проанализированы данные для таксонов животных, но многие идеи относятся и к другим группам организмов.

3. Методические особенности ДНК-штрихкодирования как подхода описания биологического разнообразия:

формирование базы данных ДНК-штрихкодов и другие активности
ДНК-штрихкодирование видов, размещение материалов в базах BOLD и ННЦМБ, поддерживаемой Лабораторией молекулярной систематики

База данных BOLD

В согласии с принятой методикой идентификации видов по ДНК, ДНК-штрихкодирование (Hebert et al., 2003a,b), проведено эмпирическое исследование нескольких мер генетических расстояний и изменчивости для представителей различных отрядов рыб и других гидробионтов и теоретическое обоснование, изложенное ранее с новыми обоснованиями и интерпретацией (Kartavtsev, 2009, 2011a,b, 2013a).

Работа с базой данных BOLD включала заполнение наборов информационных окон по заданному алгоритму. Таким образом, за текущий и предыдущие годы выполнено: (1) сопровождение всех типовых (паратиповых)

образцов, или коллекционных экземпляров видов, цветными цифровыми фотографиями; (2) ваучерное представление типовых экземпляров рыб (подготовка технической документации и ее компьютерное обеспечение в соответствии с принятыми в системе международными стандартами); (3) ведение специальных криоколлекций спиртовых образцов тканей; (4) хранение информации о молекулярной (нуклеотидной) последовательности образца, включающее графический файл-хроматограмму флюоресцентного сигнала секвенатора (GenBank, BOLD) и текстовый файл интерпретированной консенсусной последовательности двукратного прочтения антипараллельных цепей ДНК (направлений 5' – 3' и 3' – 5'); (5) формирование виртуального ДНК-штрихкода образца; (6) введение сопутствующей информации: географические координаты образца, имя коллектора и др. и (7) интегрирование данных с другими мировыми базами данных, GenBank, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и FishBase (<http://fishbase.com/search.php>).

Организованные по этой схеме данные включают представителей четырех отрядов рыб: камбалообразные, окунеобразные, скорпенообразные, карпообразные и представителей морских беспозвоночных животных. Всего в BOLD размещено к 2015 г. 538 записей об образцах рыб и беспозвоночных.

База данных ННЦМБ-ДВФУ

Кроме работы в BOLD, с помощью программных средств для персональных компьютеров (ПК): 1) доработана и пополнена собственная проблемно-ориентированная база данных (БД) по рыбам и другим организмам для использования её в ННЦМБ, Дальневосточном федеральном университете (ДВФУ) и в дальнейшем другими биологическими институтами и музеями РФ; 2) разработаны биоинформационные алгоритмы для безошибочной идентификации видов в генетических терминах на основе последовательностей нуклеотидов генов *Co-1* и *Cyt-b*. Для идентификации особей (образцов) видов на биоинформационной основе доработана алгоритмическая схема способов видообразования (Картавцев, 2009; Kartavtsev, 2011a,b, 2015).

БД представляет собой информацию, размещенную в ПК и состоящую из четырех основных компонентов. 1. Таксономическая информация о ваучерном образце или физическом представителе вида, помещенным в зоологическую коллекцию ННЦМБ (или другого учреждения) и имеющего соответствующий музейный идентификационный номер. 2. Идентификационный лабораторный номер образца ткани, хранимого в этиловом спирте в морозильной камере. 3. Информация о молекулярной (нуклео-

тидной) последовательности образца и текстовый файл интерпретированной консенсусной последовательности двукратного прочтения антипараллельных цепей ДНК. Информация размещается в трех окнах для генов *Co-1*, *Cyt-b* и *16S* рРНК. 4. Другая сопутствующая информация: географические координаты образца, цветные цифровые фото ваучерных экземпляров и др. К настоящему времени в БД внесены данные по камбалообразным, окунеобразным, скорпенообразным рыбам и беспозвоночным.

Работа с БД сопровождается разработкой отдельной программы по переустройству музейных коллекций, музея ННЦМБ ДВО РАН и в дальнейшем – других музеев на современной ваучерной и биоинформационной основе. Для этого выполнено: 1) сопровождение всех типовых (паратиповых) зоологических образцов цветными цифровыми фотографиями; фотографии доступны интерактивно по мере необходимости, с программируемой иерархией деталей (или специальных цифровых изображений; схемы, диагностические признаки и т.п.); 2) ваучерное представление типовых экземпляров рыб (дизайн и размещение технической документации в MS Access и Excel, а также ее компьютерное обеспечение в соответствии с мировыми стандартами); 3) ведение специальных криоколлекций спиртовых образцов тканей, с систематизацией и размещением информации в базе данных; 4) ведется подготовка к переносу БД в интернет и, наконец: 5) подготовка к инкорпорированию данных созданной базы в мировые базы данных, включая BOLD, GenBank и FishBase. В РФ аналогичных баз данных в настоящее время не существует.

4. Биоразнообразие и молекулярная филогенетика рыб

дальневосточных морей России. Оценки на основе подходов

ДНК-штрихкодирования и молекулярной филогенетики

Молекулярная филогения карпообразных рыб (Teleostei, Cypriniformes), основанная на последовательностях генов мтДНК цитохромоксидазы 1 (Co-1) и цитохрома b (Cyt-b) и полных митогеномах

Основное внимание в представляемом подразделе было уделено молекулярной систематике рода *Oreoleuciscus* (алтайские османы), который принадлежит к карповым рыбам подсемейства Leuciscinae семейства карповых (Cyprinidae), одного из самых разнообразных семейств рыб (Eschmeyer, 2015). Тем не менее обнаружить надежный филогенетический маркер даже для видов рыб этой группы не простая задача, из-за небольшой генетической дивергенции между видами рода.

Для остальных *Leuciscinae* s.l. проблем также достаточно много. Так, подсемейство выделено в ранг семейства *Leuciscidae* в недавних работах Чена и Мэйдена (Chen, Mayden, 2009), Буфалино и Мэйдена (Bufalino, Mayden, 2010a,b). Однако авторы пишут о необходимости комплексных исследований мтДНК видов данного таксона. В частности, в некоторых группах рыб (Meyer, 1993; Zardoya, Meyer, 1996), в том числе карповых (Zardoya, Doadrio, 1998, 1999; Durand et al., 2002, 2003; Картавец и др., 2002; Saitoh et al., 2006; Sakai et al., 2006; Sasaki et al., 2007; Imoto et al., 2013), для разделения видов часто используют сравнение последовательностей нуклеотидов гена *Cyt-b*. Полезным инструментом для идентификации видов рыб, как отмечено ранее, является также ген *Co-1* (Hebert et al., 2003a; Ward et al., 2005), который хорошо работает для родов подсемейства *Leuciscinae* (Mayden et al., 2009; Kartavtsev, 2011a,b; Батищева и др., 2011). Полный митохондриальный геном (митогеном) также использован для сопоставления таксонов подсемейства *Leuciscinae* (Saitoh et al., 2006; Imoto et al., 2013). Тем не менее не только особенности молекулярной систематики и филогенетики рыб привлекают внимание исследователей. Направления исследования таксона активно развивается для изучения преобладающих моделей видообразования в природе (Kartavtsev, 2011a,b; 2013a), наличия генетической интрогрессии между видами и ретикуляции генных деревьев (Arnold, Emms, 1998; Arnold, Fogarty, 2009). Эти три проблемы могут быть решены с помощью сравнительного анализа данных о последовательностях, что рассматривается как вторая задача исследования.

Ареал рода *Oreoleuciscus* ограничен территорией горного Алтая, северо-западной Монголией и сопредельных районов РФ (Слынько, Дгебуадзе, 2009; Манчин, Дгебуадзе, 2010; Батищева и др., 2011). Впервые описанные Варпаховским (1889), рыбы этого рода характеризуются исключительно высоким морфологическим разнообразием, что отразилось, в частности, и на числе описанных в пределах рода таксонов. Первоначально в составе рода были описаны 8 видов и 3 подвида (Варпаховский, 1889). В дальнейшем предпринимались неоднократные попытки осуществить ревизию рода и определить таксономический статус морфотипов алтайских османов. Берг (1912, 1949) свел состав рода к 3 видам – *Oreoleuciscus humilis* (Warpachowski, 1889), *O. pewzowi* (Herzenstein, 1883) и *O. potanini* (Kessler, 1879). Эта точка зрения была поддержана в работе Дашдоржа с соавторами (Dashdorzh et al., 1969). Предпринимались описания новых

таксонов, в том числе видового статуса, с выделением *Oreoleuciscus potanini* (Kessler, 1879), *O. humilis* (Warpachowski, 1889) и *O. angusticephalus* (Bogutskaya, 2001). Кроме этих трех видов Коттелат (Kottelat, 2006) считает валидным *O. dsapchynensis* (Warpachowski, 1889).

В то же время в целом ряде работ обосновывалась необходимость сведения всех видов к одному – *O. potanini* (см. Кафанова, 1961; Световидова, 1965; Дгебуадзе, Рябов, 1978; Dgebuadze, 1995), в пределах которого некоторые исследователи выделяли пять дискретных морфологических типов, не придавая им таксономического статуса (Баасанжав и др., 1983, 1985; Борисовец и др., 1985). Такое разнообразие точек зрения на таксономическую структуру рода *Oreoleuciscus* во многом обусловлено не столько различиями в научных подходах и трактовках авторов, сколько относительно слабой изученностью популяционной структуры рассматриваемой группы.

Основываясь на анализе морфологических признаков, Голубцов и коллеги (Golubtsov et al., 1999) подтвердили мнение о том, что род *Oreoleuciscus* представлен в пределах России двумя видами: *O. potanini* и *O. humilis*. Сосуществование карликовой речной и большой озерной форм *O. humilis* описано Дгебуадзе (Dgebuadze, 1995) для Долины Озер в Монголии. Сосуществование двух форм, включающих карликовую, было описано также для бассейна Увс-Нуур Егоровым и Жамсараном (Егоров, Жамсаран, 1961), но эти авторы идентифицировали все образцы как *O. potanini*. Основываясь на публикациях Дгебуадзе (Dgebuadze, 1995), Богуцкой (Богуцкая, 1990), Васильевой (Васильева, 1985), и используя собственные данные, Голубцов с соавторами (Golubtsov et al., 1999) делают вывод о том, что *O. potanini* и *O. humilis* в общем аллопатричны. Однако зона симпатрии у *O. potanini* и *O. humilis* может существовать, учитывая, что часть синтипов *O. humilis* и его синонима *O. phoxinoides*, хранящиеся в коллекции ЗИН РАН Богуцкой (Bogutskaya, 2001), были пойманы из р. Чуя у Кош-Агача (Варпаховский, 1889).

Относительная молодость алтайских османов и достаточно высокая пластичность морфологических признаков долгое время серьезно осложняли понимание филогенетических взаимосвязей между видами и положение самого таксона в семействе Cyprinidae и подсемействе Leuciscinae. При общем согласии большинства исследователей о принадлежности алтайских османов к подсемейству Leuciscinae, тем не менее, велись дискус-

сии о степени их родства с основными родовыми группами этого подсемейства (Варпаховский, 1889; Никольский, 1950; Dashdorzh et al., 1969; Vănărescu, 1972; Howes, 1984).

Описание биологического разнообразия является одной из приоритетных задач общей биологии и осуществляется с использованием различных подходов: сравнительно-морфологического (Borisanova et al., 2015), биохимического (Ryazanova et al., 2015), специализированного комплексного подхода, сочетающего молекулярные ДНК-маркеры с традиционными биологическими и музейными методами (Hebert et al., 2003a,b) и использующего специальные базы данных (Ratnasingham et al., 2007). Вполне естественно в связи с этим применение для описания биоразнообразия и филогенетики молекулярно-генетических подходов с использованием нуклеотидных последовательностей отдельных генов мтДНК, полных митогеномов (Imoto et al., 2013; Arnold, Emms, 1998; Imoto et al., 2009; Слынько, Боровикова, 2012), совместно с генами яДНК. Выполненное ранее исследование с использованием последовательностей *Co-1* мтДНК (Слынько, Дгебуадзе, 2009) позволило обосновать с генетических позиций представление о наличии двух видов алтайского османа в бассейне реки Обь. Данные Слынько и Боровиковой (2012), поддержанные выборками из ареала территории Монголии по гену *Cyt-b*, выявили три группы алтайских османов, с приданием этими авторами статуса близнецовых видов: *Oreoleuciscus potanini* (Kessler, 1879) – водоемы Долины Озер, бассейнов рек Ховд и Дзабхан; *Oreoleuciscus humilis* (Warpachowski, 1889) – водоемы Долины Озер и выделенный авторами *Oreoleuciscus manchini* (Слынько, Дгебуадзе, 2009), который требует обоснования в специальной работе, – водоемы бассейнов рек Селенга, Орхон, Тэссийн Гол и озера (оз.) Увс-Нуур.

В данном подразделе стояло две задачи, учитывая охват сравнительными данными практически всего ареала алтайских османов: (1) прояснить филогенетические взаимосвязи современных видов рода *Oreoleuciscus*, основываясь на последовательностях митохондриального гена *Cyt-b*, представленных в исследовании; (2) провести сравнительный анализ, включая литературные (Слынько, Боровикова, 2012) и опубликованные собственные данные по гену *Co-1* (Батищева и др., 2011), литературные данные по генам *Cyt-b* и *Co-1*, а также по митогеномам в целом, как для видов рода *Oreoleuciscus*, так и для ближайших родственников подсемейства *Leuciscinae*. Необходим также дополнительный сравнитель-

ный анализ данных в более широком сравнительно-эволюционном аспекте, что было отмечено во введении.

Материалы и методы

Сбор материала проводился в июле 2008 г. на Алтае (оз. Колдинголь и оз. Узункель, вблизи г. Улаган, см. рис. 1А), где были отловлены 22 экземпляра (экз.) *O. potanini*. Сборы представителей *O. humilis* (2 экз.) были сделаны в 2006 г. в двух локальностях Тувинской Автономной Республики, у границы с Монголией А.В. Насека (ЗИН РАН) (Рис. 1Б). Отлов рыб проводили жаберными сетями или удочкой на глубине 0.5–1 м. Видовая принадлежность определена по опубликованному ключу (Bogutskaya, 2001). Молекулярно-генетический анализ выполнен на части особей, представляющих сборы экспедиции 2008 г. Список особей, использованных при анализе, дан в таблице 1 в работе Картавцева с соавторами (Kartavtsev et al., 2017). Материал представлен 87 последовательностями гена *Cyt-b*: 42 последовательности получены в лаборатории, еще 45 – извлечены из генного банка (GenBank). Вновь полученные последовательности по гену *Cyt-b* были депонированы в генном банке под номерами KP942598–KP942617, KR819892–KR819909, KP942594–KP942617 (Kartavtsev et al., 2017) и далее использовались в анализе совместно с другими последовательностями.

Полный митогеном, представленный 97 последовательностями из генного банка, также включен в анализ. Информация о последовательностях митогенома приведена на соответствующих филогенетических деревьях, с указанием их номеров доступа и наименования вида для каждого представленного образца. Сравнительный анализ дивергенции и изменчивости митогенома был ограничен белковыми генами, включая все 13 имеющихся генов. Основной первичный материал представлен попарными генетическими расстояниями (*p*-расстояния; Nei, Kumar, 2000) по всем последовательностям и таблицами нуклеотидного состава (%) суммарно и по каждому из трех положений кодона (Kartavtsev et al., 2017, Tables 1S–4S, Supplement 3; данные по генетическим расстояниям также представлены в этих таблицах: Tables 1S, 2S).

От каждой особи брали пробы – кусочки мышечной ткани, которые фиксировали в спирте. Из этих проб выделяли геномную ДНК с использованием хлороформ-фенольного метода (Maniatis et al., 1982; Sambrook, 1989;

Гафуров, 1999) с небольшими изменениями. Участок мтДНК, представляющий ген *Cyt-b*, был амплифицирован посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). Детали выполнения ПЦР и другие методические детали секвенирования изложены ранее (Kartavtsev et al., 2017).

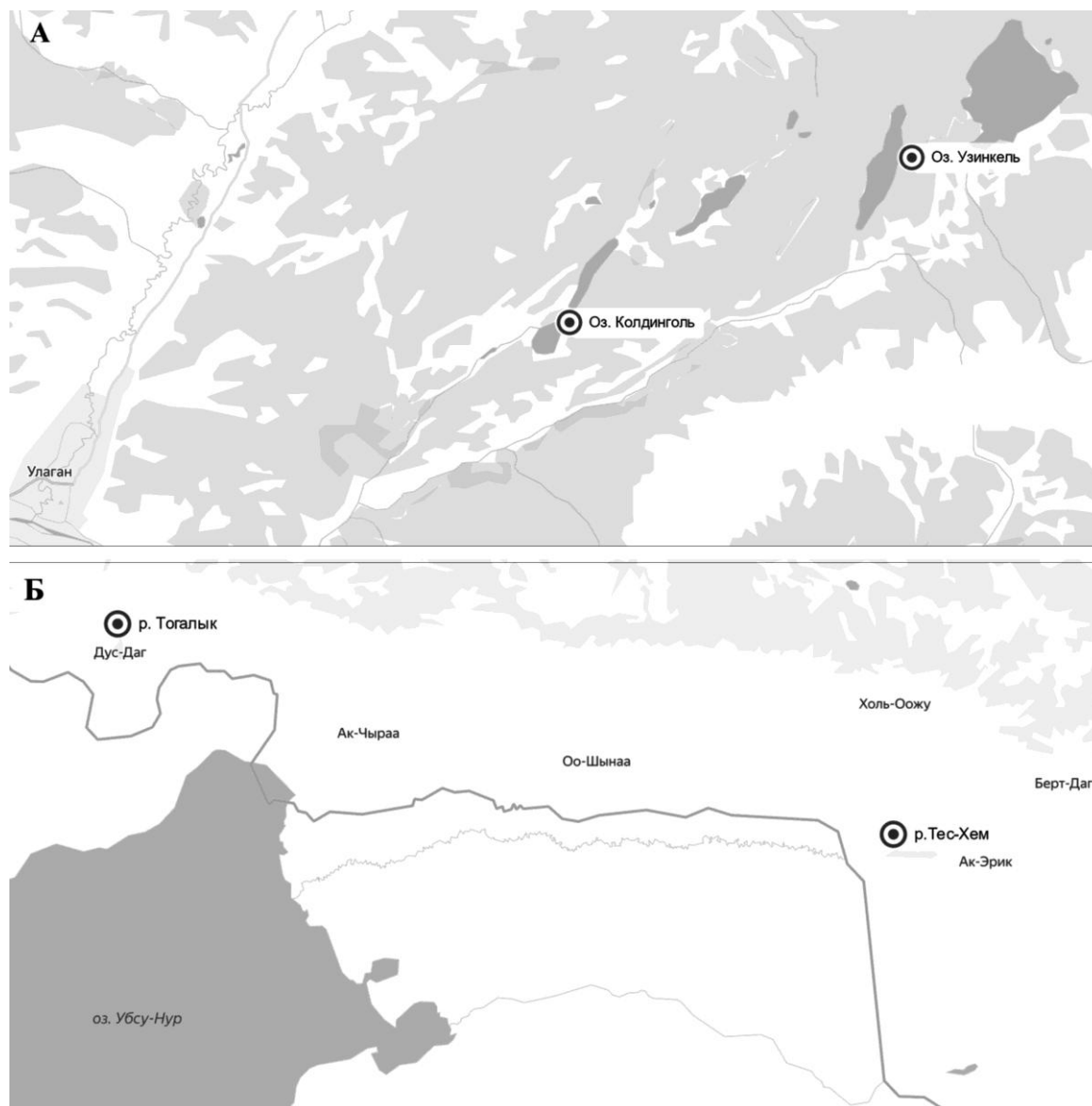


Рис. 1. Карта отлова рыб в России: (А) Алтайский край, озера Колдинголь и Узинкель, расположенные вблизи поселка Улаган; (Б) Республика Тыва, бассейн о. Увс-Нуур (реки Тес-Хем и Тогалык).

Места отлова показаны черными кружками с точкой.

Последовательности ДНК были выровнены с помощью программы Clustal W, интегрированной в пакет MEGA-5, MEGA-6 (Tamura et al., 2013). На основе выровненных последовательностей строили филогенетические деревья. Для этого использовали следующие подходы: максимальной парсимонии (MP), байесовский (BA), максимального правдоподобия

(ML) и ближайшего соседства (NJ) (Felsenstein, 1981; Nei, Kumar, 2000; Hall, 2001). На основе выровненных последовательностей подбирали оптимальную модель нуклеотидных замен. Модель подбирали с помощью программы Modeltest 3.7 (Posada, Crandall, 1998), jModeltest или MEGA-6. Чтобы решить задачу выбора наиболее подходящей модели замен для исследуемого набора последовательностей, использовали несколько подходов. В их числе применяли: соотношение максимального правдоподобия (Fratini et al., 1997; Sullivan et al., 1997; Posada, Crandall, 1998), значение логарифма максимального правдоподобия (lnL, Huelsenbeck, Crandall, 1997), информационный критерий Акайке (AIC, Akaike, 1973), скорректированный информационный критерий Акайке (Hurvich, Tsai, 1989), байесовский информационный критерий (Schwarz, 1978) и подход на основе теории совершенного принятия решения (DT, performance-based decision theory) (Minin et al., 2003; Abdo et al., 2004). Конкретно в данной работе, при оценке моделей, базировались на значениях AIC и lnL, используя MEGA-6.

Генетическая изменчивость оценена по набору из 69 последовательностей гена *Cyt-b*, который включал как наши собственные последовательности, так и извлеченные из GenBank на дату первого этапа анализа (10 апреля, 2012). Для филогенетических целей использовали одинаковый набор последовательностей гена *Cyt-b* (рис. 2). Дополнительно, для оценки совместного эффекта двух генов в дифференциации видов алтайских османов *O. potanini* и *O. humilis* в комбинации с красноперками (*Tribolodon*), сформировали наборы по 25 последовательностей для генов *Cyt-b* и *Co-1*, взятых из предыдущей работы (Батищева и др., 2011). Образцы османов и красноперок, использованные для этих целей, показаны на вершинах ветвей тандельграммы.

На основе выровненного набора последовательностей строили филогенетические деревья. Для описанного набора последовательностей как лучшая была выбрана модель TrN93+G+I (Tamura–Nei), с параметрами для гена *Cyt-b*: AIC=13348 и lnL=-5892.7, G=1.2344, R=5.1399, I=0.5257. Для байесовского анализа использовали наиболее близкую модель GTR (General Time Reversible), которая доступна в программном пакете (ПП) MrBayes (Huelsenbeck, Ronquist, 2001; Ronquist, Huelsenbeck, 2003).

Для расчета деревьев использовали ПП MrBayes и MEGA: MrBayes 3.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001; Ronquist, Huelsenbeck, 2003; BA-дерево) и MEGA-6 (Tamura et al., 2013; ML-, MP-, NJ-дерево). MP-дерево ($k = 1000$

реплик бутстрепа) строили в ПП МЕГА-6, с методом поиска стартовых деревьев по принципу обмена ближайшими соседями, CNI (close-neighbor-interchange) и уровнем поиска 1. Использована опция случайного добавления стартовых деревьев (10 реплик) при CNI поиске. При построении NJ-дерева в ПП МЕГА-6 использовали модель TrN+I+G ($k = 1000$ реплик). Для построения ВА-дерева использовали модель GTR+G+I с параметрами: AIC=12052; $-\ln L = -5882.7$; $R = 4.61$; A:T:C:G = 0,2430, 0,2993, 0,2902, 0,250; $G = 0,2251$ и с $n = 10^6$ модельных генераций. Расчетные опции: MCMCP ngen = 1000000, printfreq = 1000, samplefreq = 1000, nchains = 4 и SUMP burnin = 100; остальные параметры были заданы как опции по умолчанию ПП MrBayes 3.2. Эти же параметры использованы при построении ML-дерева в ПП МЕГА-6 и числом реплик бутстрепа, $k = 1000$. Деревья, построенные с помощью ПП MrBayes 3.2, визуализировали и при необходимости редактировали, используя программу FigTree (Ronquist et al., 2012). Общий статистический анализ выполнен с использованием программы STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2005).

Все аналитические вычислительные процедуры, описанные выше, применялись и для анализа последовательностей митогенома. Исходно 100 полных последовательностей митогенома были извлечены из генного банка, с использованием в качестве мишени особи алтайского османа. После выравнивания и удаления небелковых фрагментов оставлено для анализа 97 последовательностей, включающих 13 белок-кодирующих генов. Номера доступа последовательностей NCBI GenBank приведены на ветвях филогенетического дерева, приводимого в подразделе Обсуждение. Набор последовательностей после выравнивания имел длину 11408 п.н. и включал следующие 13 генов: 1. *ND1*, 2. *ND2*, 3. *COI (Co-1)*, 4. *COII*, 5. *ATP8*, 6. *ATP6*, 7. *COIII*, 8. *ND3*, 9. *ND4L*, 10. *ND4*, 11. *ND5*, 12. *ND6* и 13. *CYTB (Cyt-b)*. Наилучшая модель замен для этого набора определена как GTR+G+I, с параметрами: AIC=440511 и $\ln L = -220052.8$, $G = 1.1144$, $I = 0.5053$. Для аминокислотных последовательностей 13 генов митогенома наиболее подходящей оказалась модель JTT+G+I (Jones–Taylor–Thornton) с параметрами: AIC=122110 и $\ln L = -60842.9$, $G = 0.6233$. Аналогично, с последовательностью нуклеотидов митогенома, при генерировании деревьев в ВА и ML, в анализе применяли модель GTR+G+I (AIC=440511; $\ln L = -220052.8$; $R = 7.66$; A:T:C:G = 0,2924, 0,2698, 0,2843, 0,1535; $G = 1,1144$). Для сокраще-

ния времени вычисления использовали суперкомпьютер рабочей платформы CIPRES (<https://www.phylo.org>) с параметрами, описанными выше.

С иллюстративными целями при конструировании деревьев по гену *Cyt-b* как основные использованы ВА-деревья; поддержки ветвей для трех других подходов показаны рядом с ветвями, следующими по порядку за ВА (ВА/ML/MP/NJ).

Результаты

После выравнивания длина секвенированных последовательностей *Cyt-b* для *Oreoleuciscus* и других Leuciscinae составила 1039 п.н. Для построения деревьев использовали четыре методики, описанные выше: ВА, ML, MP и NJ (рис. 2). Полученное консенсусное генное дерево состоит из ветвей особей (последовательностей) подсемейства Leuciscinae с внешней группой, представленной Squaliobarbinae. Ветвь с родами *Oreoleuciscus*, *Phoxinus* (*Rhynchocypris*) *Pseudaspius* и *Tribolodon* разделяется на две основные линии, называемые здесь для удобства Phoxininae А и Phoxininae В (= триба Pseudaspinini; Богуцкая, 1990). На данном дереве представители Phoxininae А (двух номинальных родов *Pseudaspius* и *Tribolodon*) формируют единую, только частично разрешенную топологически, парафилетическую ветвь. Две обособленных ветви, с хорошей поддержкой для каждой, формируют представители родов *Oreoleuciscus* и *Tribolodon*. Внешняя ветвь Phoxininae А, объединяющая *Phoxinus eos*, точнее *Chrosomus eos* (Cope, 1861), а также *Leuciscus waleckii* (Dybowski, 1869), занимает базальное положение по отношению к этой ветви. Далее эта ветвь представлена хорошо поддержанной всеми методами (100%) группой *Ph. phoxinus* (L., 1758) – *Ph. ujmonensis* (Kaschenko, 1899).

Оцененные на основе гена *Cyt-b* взаимосвязи видов родов *Oreoleuciscus* и *Tribolodon* хорошо согласуются с сигналом, полученным для гена *Co-1* (рис. 3), хотя одна из последовательностей *T. brandti* ошибочно классифицируется с представителями *T. hakonensis*, что можно отнести на ошибку видового диагноза по морфологии. Таким образом, на самом низком иерархическом уровне на деревьях двух генов (*Cyt-b*, *Co-1*) обнаружена отчетливая генетическая дивергенция двух видов алтайских османов, *O. potanini* – *O. humilis* (рис. 2,3), а также по гену *Cyt-b* выявлена четкая филогенетическая обособленность двух видов гольянов, *Ph. phoxinus* – *Ph. ujmonensis* (рис. 2).

Для сравнения сигнала топологий двух генных деревьев (*Cyt-b* и *Co-1*) по 25 последовательностям каждого гена была построена диаграмма, так называемая тандельграмма, с использованием ПП Dendroscope (рис. 3). Исходно, на основе NJ подхода с 50% порогом коллапсирования (принятый порог) были реконструированы отдельные консенсусные деревья для каждого из двух генов. Как следует из данных рисунка, кроме одной ошибочной (или, возможно, неотличимой по мтДНК гибридной особи), все ветви двух генов хорошо соотносятся друг с другом (файл доступен по запросу для возможной проверки). По пяти значениям, приведенным ниже, было показано, насколько хорошо эти два дерева соотносятся: (1) кластерное расстояние “Hardwired”: 3.0; (2) расстояние “Softwired”: 3.5; (3) дистанции на деревьях “Displayed”: 1.0; (4) расстояние “Nested labels”: 8.5 и (5) расстояние “Path multiplicity”: 6.5.

При сравнении двух одинаковых деревьев 5 показателей в качестве результата показали значение, равное нулю. Техника визуализации в Dendroscope позволила сравнивать генные деревья, которые не полностью совпадают между собой, то есть представлены разными образцами-последовательностями. Таким образом, это помогает установить, как соотносятся деревья по генам *Cyt-b* и *Co-1*, с наборами последовательностей 69 и 65, соответственно для двух генов. Пять значений, именованных выше, были следующими: 72,0; 72,5; 1,0; 73,5; 18,0; то есть эти цифры продемонстрировали, что деревья на тандельграмме (Рис. 3) гораздо лучше согласуются.

Можно отметить также, что описанные выше филогенетические взаимосвязи хорошо поддерживаются данными, полученными по митохондриям в целом (Рис. 4). На этом уровне, с высокой вероятностью (100%), также поддерживаются ветви европейских и дальневосточных представителей Phoxininae. Другие данные, представленные на рис. 4, будут рассмотрены в более широком контексте в разделе Обсуждение.

Различия значений p-расстояний и скорость эволюции

Последовательности *Cyt-b* были исследованы в первую очередь, чтобы понять филогенетические отношения карповых рыб на примере алтайских османов. Тем не менее до проведения этого анализа, были получены, необходимые для предварительной оценки, значения меры расстояний или соответствующие генетические расстояния для таксономических категорий. P-расстояния (Nei, Kumar, 2000) были получены для всех после-

довательностей гена *Cyt-b*, приведенных в табл. 1. Значения *p*-расстояния всех пар сравнения получены для совокупности особей исследованных видов рыб, указанных в списке в Приложении к статье (Kartavtsev et al., 2017, Table 1S). Для этого анализа, по 69 последовательностям гена *Cyt-b* в трех выделенных группах (ниже – 1–3) была произведена оценка средних расстояний для нескольких видов и родов, отобранных для базы данных. Сформированы три сравниваемых группы для уровней: (1) внутривидовой, среди особей одного вида; (2) внутривидовой, среди видов одного рода; (3) внутри семейства, среди родов одного подсемейства (в табл. 2 представлены средние арифметические значения со стандартными ошибками, SE). Размеры выборки (*n*) для *Cyt-b* этих трех групп были следующими: (1) *n* = 11, (2) *n* = 10, (3) *n* = 14 (табл. 1).

Таблица 1

Средние *p*-расстояния для трех сравниваемых групп, исследованных по 69 последовательностям гена *Cyt-b*

Наименование группы	Значение среднего <i>p</i> -расстояния, %	Стандартная ошибка, SE	Число попарных сравнений
1. <i>Внутри вида</i>	1,16	0,96	11
2. <i>Внутри рода</i>	8,21	1,01	10
3. <i>Внутри семейства</i>	16,41	0,85	14

Примечание. Каждое среднее значение получено на основании данных исходной матрицы сравнения парных *p*-расстояний последовательностей (по: Kartavtsev et al., 2017, Table 1S).

Исследование *p*-расстояний (%) для *Cyt-b* позволили нам сделать вывод о низком уровне дивергенции, наблюдаемой между последовательностями одного вида, в то время как самым высоким этот показатель был для родов подсемейства: (1) $1,16 \pm 0,96$, (2) $8,21 \pm 1,01$ и (3) $16,41 \pm 0,85$ (среднее \pm SE здесь и далее). Значения вариационных рядов, для попарных *p*-расстояний по *Cyt-b*, отличались от нормального распределения (например, для внутривидовых значений: асимметрия = 0,6690, SE = 0,1648, эксцесс = -0,1619, SE = 0,3281; *n* = 218); несмотря на одномодальность распределений, уровень их асимметрии был значимым статистически. Имея это в виду, было проведено сопоставление средних величин *p*-расстояния трех сравниваемых групп с помощью параметрического пакета ANOVA (рис. 5). Для выполнения этого анализа вначале были взяты попарные зна-

чения для всех выбранных последовательностей, принадлежащих к Leuciscinae из треугольной матрицы p -расстояний, а затем они объединены в три соответствующие группы. На следующем этапе были получены средние значения для каждой категории. Проведен однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA (модель со случайными эффектами) p -расстояний для трех приведенных выше групп. ANOVA использовали для оценки изменчивости p -расстояний внутри- и между тремя группами. Средние величины p -расстояний трех сравниваемых групп отличались статистически значительно (рис. 5, А; $F = 71,64$, d.f. = 2; 32, $P < 0,00001$). Получены принципиально те же результаты и при помощи непараметрической статистики. Учитывая важность результатов, полученных по расстояниям, для подтверждения различий в средних значениях p -расстояний в трех сопоставляемых группах, дополнительно применили непараметрический тест, ANOVA по Крускалу–Уоллису (Kruskal–Wallis) и медианный тест. Первый тест для p -расстояний по *Cyt-b* обнаружил: $H = 46,26$, d.f. = 3, $N = 35$, $P < 0,0001$, а медианный тест (Median test) дал: $X^2 = 21,67$, d.f. = 2, $P < 0,0001$. Очевидно, что два разных статистических подхода продемонстрировали значимые статистические различия средних p -расстояний между внутривидовой, внутривидовой и внутрисемейной категориями для представителей подсемейства Leuciscinae. Расстояния отличались как по *Cyt-b*, так и по всем 13 белковым генам митогенома (рис. 5, Б).

Для оценки изменчивости величин нуклеотидных расстояний внутри выборок Алтайских османов отдельно проанализировали только особей рода *Oreoleuciscus*. Для этого их разделили на 2 группы, согласно топологии построенных деревьев. Максимальное p -расстояние было обнаружено между первой и второй группами алтайских османов, то есть между *O. potanini* и *O. humilis*, составило $1,74 \pm 0,01\%$. Внутри группы 1 (*O. humilis*) и группы 2 (*O. potanini*) расстояния составили соответственно $0,096 \pm 0,044\%$ и $0,126 \pm 0,007\%$. Различия p -расстояний внутри и между этими группами османов статистически значимы: $F = 7508,2$, d.f. = 2; 348, $P < 0,001$.

В целом, как описано ранее, значения p -расстояний были рассчитаны для трех категорий (1 – внутривидовой, 2 – внутривидовой и 3 – внутри семейства). Таким же образом, как и для гена *Cyt-b*, сделан расчет и по митогеному. Для него также были получены значительные различия между тремя сравниваемыми группами: $F = 41,19$, d.f. = 2; 6, $P < 0,00001$ (рис 5, В, табл. 2; исходные данные расстояний по отобраным митогено-

мам взяты из таблицы 2S, Kartavtsev et al., 2017). Величины средних p -расстояний для трех категорий были следующими (%): (1) $1,04 \pm 0,78$, (2) $8,30 \pm 0,92$ и (3) $10,74 \pm 0,79$ (табл. 2). Для сравниваемых данных митогенома, как и выше, для *Cyt-b*, было выявлено отклонение от нормальности. Соответственно, выполнены расчеты с использованием непараметрических статистик. Как и ранее, проведено 2 теста – Крускала–Уоллиса: $H = 13,21$, d.f. = 2, $N = 19$, $P < 0,001$ и медианный тест: $X^2 = 10,06$, d.f. = 2, $P = 0,0065$, подтверждающие значимость различий средних. Очевидно, что эти результаты показывают возрастание значений средних p -расстояний в трех сравниваемых группах. Иначе говоря, степень генетической дивергенции возрастает с увеличением уровня иерархии сравниваемых групп, как для отдельных генов, так и в среднем для всех 13 белковых генов митогенома (рис 5, А, В).

Таблица 2

Средние значения p -расстояния для трех сравниваемых групп, исследованных по 97 последовательностям 13 белковых генов мтДНК

Наименование группы	Значение среднего p -расстояния, %	Стандартная ошибка, SE	Число попарных сравнений
1. Внутри вида	1,04	0,78	7
2. Внутри рода	8,30	0,92	5
3. Внутри семейства	10,74	0,79	7

Примечание. Каждое среднее значение получено на основании данных исходной матрицы сравнения парных p -расстояний последовательностей (по: Kartavtsev et al., 2017, Table 2S).

Нуклеотидный состав

Доля пиримидинов (Т, С) по отношению к пуринам (А, G) в гене *Cyt-b* отклоняется от соотношения 50:50 (Kartavtsev et al., 2017, Table 3S; рис. 6). Суммарная пропорция (Т + С):(А + G) равна 54,3:45,7% при учете всех трех позиций кодона для всего подсемейства Leuciscinae (Kartavtsev et al., 2017, Table 3S). Также обнаружены небольшие различия в составе нуклеотидов гена *Cyt-b* между представителями Phoxiniinae Дальнего Востока (группа 1, Gr1; рис. 6, А) и тех Phoxiniinae, которые представлены в Европе; разница была наименьшая в пропорции Т, а по остальным трём нуклеотидам доли заметно отличались (группа 2, Gr2; рис. 6, А). Эффект

взаимодействия оценен в многомерном подходе, MANOVA: $F = 21,906$, $d.f. = 3; 252$, $P < 0,00001$. В случае митогенома наблюдалось не только резкое отклонение от соотношения 50:50 пиримидинов к пуринам в гене ND6, но различия в содержании нуклеотидов между остальными 12 белок-кодирующими генами; данное явление наиболее контрастно наблюдалось для Т и А (рис. 6, Б; см также Kartavtsev et al., 2017, Table 4S). Согласно полученным данным статистический эффект высоко значим: $F = 1524,2$, $d.f. = 3; 5036$, $P < 0,0001$.

Было обнаружено отклонение от нормального распределения состава нуклеотидов как для набора последовательностей гена *Cyt-b*, так и митогеномов; для *Cyt-b* (асимметрия = $-0,5385$, $SE = 0,1466$, эксцесс = $-1,0681$, $SE = 0,2923$). Для митогеномов по всем 4 нуклеотидам: Т, С, А, G (минимальная и максимальная асимметрия равны $0,1914$ – $1,1849$, при $SE = 0,0398$, а эксцесс составил $-0,6546$ – $2,7877$, при $SE = 0,0796$). Таким образом, чтобы подтвердить основные результаты вышеупомянутого параметрического MANOVA анализа дополнительно была применена непараметрическая статистика Kruskal–Wallis. Значение гетерогенности частот между четырьмя типами нуклеотидов были выявлены также с применением этой статистики. Непараметрическая статистика обнаружила следующие результаты, для *Cyt-b*: $H = 226,17$, $d.f. = 3$, $N = 276$, $P < 0,001$; для митогенома: $H = 2846,86$, $d.f. = 3$, $N = 5044$, $P < 0,001$. Этот тест сравнения состава пуриновых и пиримидиновых оснований подтверждает наличие существенных различий частоты встречаемости нуклеотидов между ND6 и 12 другими белковыми генами (см. рис. 6, Б).

Обсуждение

Филогения и таксономия

В соответствии с задачами работы отметим прежде всего очевидную обособленность пары алтайских османов, *O. potanini* – *O. humilis* по последовательностям нуклеотидов генов *Cyt-b* и *Co-1* (см. рис. 2, 3; Слынько, Боровикова, 2012), что облегчает дискуссию о их ранге (Кафанова, 1961; Световидова, 1965; Борисовец и др., 1985; Васильева, 1985; Богуцкая, 1990; Слынько, Дгебуадзе, 2009). Кроме того, по обоим генам *Cyt-b* и *Co-1* идентификация особей видов (образцов) является весьма успешной. Это значит, что ДНК-штрихкодирование является успешным вопреки очень малым генетическим расстояниям между

видами алтайских османов (см. ниже). Ранее генетические методы выявили две группы османов на территории Монголии (Слынько, Дгебуадзе, 2009), таксономический статус которых авторами не указан. Вероятно, что основные генетические различия, описанные цитированными авторами (Слынько, Дгебуадзе, 2009), действительно относятся к видам *O. potanini* и *O. humilis*. Это хорошо согласуется с информацией по отдельным генам (Слынько, Боровикова, 2012; настоящая работа), полученной ранее для двух частей ареала (Алтай, район пос. Улаган и вблизи монгольской границы). Также это поддерживается и по данным для митогенома, но лишь отчасти ввиду того, что по нему из пары видов был представлен только *O. potanini* (рис. 4; см. также Imoto et al., 2013).

Попытки уточнить структуру рода в составе трех видов предпринимались неоднократно, что отмечено во введении к данному подразделу. Информация по двум генам и выборки из всех частей ареала из Алтая и Монголии по гену *Cyt-b* (Слынько, Боровикова, 2012) подтверждают наличие трех генетико-географических групп Алтайских османов. В контрасте с предыдущими заключениями (Vogutskaya, 2001; Слынько, Боровикова, 2012) оправдано предположение о валидности видов *O. potanini*, *O. humilis* и присутствие третьего таксона видового ранга. Состоятельность этого вида и его наименования предстоит установить в специальном исследовании. Таким образом, филогенетический анализ, выполненный на основе гена *Cyt-b*, а также с использованием информации по гену *Co-1*, подтвердил ранние представления о существовании трех аллопатрических видов алтайских османов в пределах рода *Oreoleuciscus*. Предельно низкий уровень *p*-расстояний по гену *Cyt-b* ($1,74 \pm 0,01\%$), который сравним со средними внутривидовыми расстояниями $1,16 \pm 0,96$ (см. Результаты), в согласии с аналогичными данными по гену *Co-1* (Батищева и др., 2011; Слынько, Боровикова, 2012), дает основание рассматривать их как близкие сестринские виды. Однако для уточнения статуса и/или нового вида, предварительно поименованного *O. manchini* (Слынько, Боровикова, 2012), требуется дальнейший анализ, включающий дополнительные митохондриальные и ядерные гены.

Богуцкая (1990), Богуцкая и Насека (2004) поместили рода *Tribolodon*, *Pseudaspius* и *Oreoleuciscus* в трибу *Pseudaspinini*. Вместе с группой

Phoxinus (включающей *Rhyncocypris* и *Chrosomus*) вся группа соответствует недавно возрожденному (Saitoh et al., 2006) подсемейству Phoxininae Bleeker, 1863–1864. Эти данные согласуются с работой Имото и соавторов (Imoto et al., 2009, 2013), базирующейся на полном митогеноме, и с нашей реконструкцией (рис. 4, отмечено скобкой справа сверху). Хоус (Howes, 1991), наиболее подробно описавший анатомические и остеологические характеристики видов Cyprinidae, заключил, что род *Oreoleuciscus* связан с евразийскими родами карповых *Pseudaspius* и *Tribolodon*, которые включены в трибу Aspinini в пределах подсемейства Leuciscinae. Однако Трэверс (Travers, 1989) настаивал, что *Oreoleuciscus* морфологически ближе к роду *Phoxinus*. Цитированное исследование Имото и соавторов (Imoto et al., 2009, 2013) и наши данные (рис. 2–4) уверенно доказывают (100% поддержка ветви), что род *Oreoleuciscus* располагается в одной монофилетической ветви с дальневосточными и центрально-азиатскими видами *Phoxinus* s.l. (включая *Rhyncocypris*) (рис. 4; Phoxininae; Far East+); тем не менее *Oreoleuciscus* также формирует индивидуальную ветвь с высокой поддержкой (100%). Эта информация подтверждается на уровне отдельных генных деревьев *Cyt-b* (рис. 2; см. также Слынько, Боровикова, 2012), *Co-1* (Слынько, Боровикова, 2012), а также филогенией, полученной по митогеному (рис. 4 и Imoto et al., 2013).

Как следует из топологии отдельных генных деревьев *Cyt-b*, *Co-1* (рис. 2,3) (Слынько, Боровикова, 2012), полного митогенома (Рис. 4) (Imoto et al., 2013), так же как соответствующих значений генетических расстояний, между родами *Pseudaspius* и *Tribolodon* по генам мтДНК имеется значительное сходство. Однако делать заключение об их полной идентичности преждевременно. Так, *Pseudaspius* на деревьях, построенных по ядерным белковым маркерам, сохраняет внешнее положение по отношению к представителям рода *Tribolodon* (Картавец и др., 2002; Durand et al., 2002, 2003). Это обстоятельство, а также неполное топологическое разрешение некоторых индивидуальных генных деревьев (рис. 2,3) и расхождения в типе ветвления по генам мтДНК и яДНК предполагает необходимость продолжения работы по уточнению филогении членов рода *Tribolodon*, в первую очередь подключая данные о дивергенции по ядерным генам.

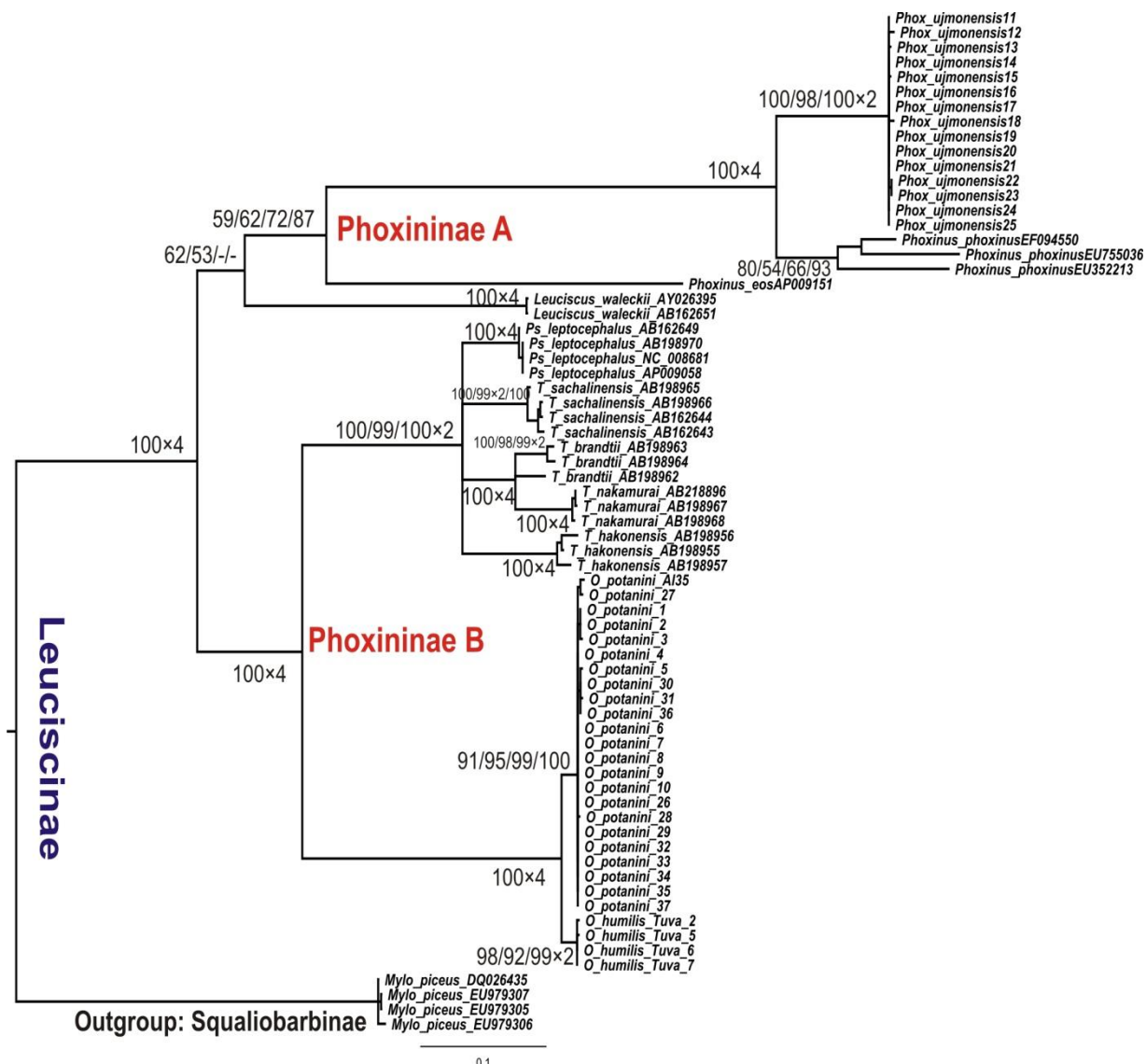


Рис. 2. Консенсусное байсовское дерево (ВА) ельцовых рыб (Leuciscinae) с 50%-ным порогом коллапсирования узлов, построенное по последовательностям гена *Cyt-b* для 10^6 модельных генераций. Реалистичность ВА-дерева обозначена постериорными вероятностями (%) рядом с узлами. Консенсусное дерево включало $k = 5201$ сгенерированных деревьев в 50% доверительном наборе. Через косую линию показаны также поддержки для других использованных методов конструирования деревьев, ML, MP и NJ. Порядок поддержек ветвей: ВА/ML/MP/NJ. Для ML, MP, и NJ, бутстреп-поддержки получены при генерировании топологий деревьев при $k = 1000$ их реплик.

Дерево, основанное на последовательностях 13 белковых генов митогенома, также демонстрирует высокую поддержку двух основных ветвей, Lineage 1 (Phoxininae+Leuciscinae) и Lineage 2; последняя включает все основные группы, обычно рассматриваемые как подсемейства (Tincinae, Rasborinae, Cultrinae, Xenocypridinae, Gobioninae, Leuciscinae, Nuphthalmichthyinae) (рис. 4). Весь набор данных, включенных в анализ, принад-

лежит *Leuciscinae* s.l., одной из двух основных групп, вместе с *Cyprininae* s.l., признаваемых в семействе *Cyprinidae* традиционной концепцией (Chen et al., 1984). Топология дерева подтверждает данные предыдущих исследований (например, Saitoh et al., 2006; Chen, Mayden, 2009), показавших филогенетическую близость *Tincinae*, *Squaliobarbinae* и *Gobioninae* к *Leuciscinae*, нежели к *Cyprininae*.

Выполненный анализ подтвердил монофилию группы ельцов (*sensu stricto*) в пределах топологии *Leuciscinae sensu lato*, поддерживая таксономическую состоятельность подсемейства *Phoxininae* с родами *Tribolodon*, *Oreoleuciscus*, *Pseudaspius* и *Phoxinus* (*Rhynchocypris*) Дальнего Востока (Богущая, 1990; Картавцев и др., 2002), отделенных от подсемейства *Phoxininae* в семействе *Leuciscidae* (Chen, Mayden, 2009). Это заключение поддерживается также работой Имото с соавторами (Imoto et al., 2013) и другими исследованиями (Семина и др., 2007; Sasaki et al., 2007; Kartavtsev, Hanzawa, 2007). В пределах *Phoxininae*, триба *Pseudaspinini* поддержана хорошо (рис. 2,4) и включает по меньшей мере два рода *Pseudaspius* и *Tribolodon*; однако топологическая нестабильность *Oreoleuciscus* на двух деревьях (сравним рис. 2,4) может означать не монофилию *Phoxininae*.

Сравнение p-расстояний и скорость эволюции

Значения *p*-расстояний, приведенные в Результатах, были усреднены для трех различных уровней эволюционной истории. Они обнаружили ясную тенденцию увеличения нуклеотидного разнообразия (расстояний) в трех группах сравнения: (1) внутри вида, (2) внутри рода и (3) внутри подсемейства (рис. 5). Значения *p*-расстояний в сравниваемых группах рыб составили следующие средние величины (%): (1) $1,16 \pm 0,96$ ($n=11$), (2) $8,21 \pm 1,01$ ($n=10$) и (3) $16,41 \pm 0,85$ ($n=14$); для 13 белковых генов митогенома соответствующие значения оказались равны: (1) $1,04 \pm 0,78$ ($n=7$), (2) $8,30 \pm 0,92$ ($n=5$) и (3) $10,74 \pm 0,79$ ($n=7$). Согласно текущему пониманию эволюции принимается, что таксоны более высокого ранга являются более древними по сравнению с таксонами более низкой иерархии (Simpson, 1961; Nei, 1987). Поэтому, принимая во внимание статистически существенные различия генетических расстояний, обнаруженных для внутривидового уровня и межвидового уровня для отдельных родов, можно считать справедливой лишь одну модель видообразования. А именно: увеличение *p*-расстояний на трех уровнях иерархии, обнаруженное для отдельных генов

и всех белковых генов митогенома, свидетельствует, что видообразование в семействе Cyprinidae следует географической модели. Данная модель предполагает аккумуляцию многочисленных мутаций, ведущих к заменам нуклеотидов в ходе длительного периода времени, прошедшего после изоляции генофондов предковых форм (локальных популяций или подвидов); далее процесс продолжается на уровне видов, родов и т.д. Географическая, или аллопатрическая, модель прерывания потока генов вызывает возникновение вида и последующую независимую эволюцию геномов (филетическую эволюцию) и создание обособленных (независимых) филетических линий (Dobzhansky, 1951; Templeton, 1981; Mayr, 1982; King, 1993; Harrison, 1998). Недавно географическая модель видообразования также была подтверждена для многих других групп животных и более широкого списка категорий сравнения, включая подвиды, полувиды, близнецовые виды, морфологически различимые виды, роды и т.д. (Johns, Avise, 1998; Avise, 2000; Kartavtsev et al., 2007a,b, 2008, 2009b; Kartavtsev, 2011a,b). Альтернативной гипотезой является отсутствие связи между генетическим расстоянием и таксономическим рангом или единообразное распределение. Такое ожидание может быть состоятельным, если нет какой-либо преобладающей в природе модели видообразования. В альтернативных вариантах виды возникают без существенных изменений в структурных генах, при распространенности интрогрессии генов (или горизонтального переноса) между видами и отсутствии влияния предыдущей демографической (и филетической) истории на диверсификацию потомков. Однако популяционно-генетическая теория предсказывает противоположное, мутационно-балансовое равновесие, позволяющее осуществляться долговременному молекулярному полиморфизму (что определяет наличие нуклеотидных замен и их накопление в филетических линиях) в больших популяциях и быстрое вымирание в малых (Kimura, 1969; Кимура, 1985). Более того, в соответствии с вышеизложенными соображениями, данные из обширных литературных источников, обобщающие более 20000 популяций и видов животных, показывают противоположное, а именно – стабильное, прямопропорциональное увеличение генетического разнообразия с рангом таксонов (равно – временем линий). Это наблюдается как для отдельных генов, *Co-1* и *Cyt-b* (Kartavtsev, 2009, 2011a,b, 2013a), так и для митогенома (см. рис. 5, Б). Не обнаруживается инфляции (уменьшение наклона линии регрессии), учитывая ожидаемые эффекты гомоплазии (Kartavtsev, 2009, 2011a,b, 2013a) (см. также рис. 5). Безусловно, такое за-

ключение о преобладании единственной модели видообразования, полученное с использованием только шкалы генетических расстояний, не является полностью исчерпывающим, учитывая сложность и многозначность вида как биологической сущности. Необходимо найти другое обобщение для установления способа видообразования, базируясь на более широком наборе дескрипторов (Durand et al., 2003; Kartavtsev et al., 2009b; Kartavtsev, 2011a,b, 2013a), и протестированном на представителях ельцовых рыб Leuciscinae, представленных в данном разделе.

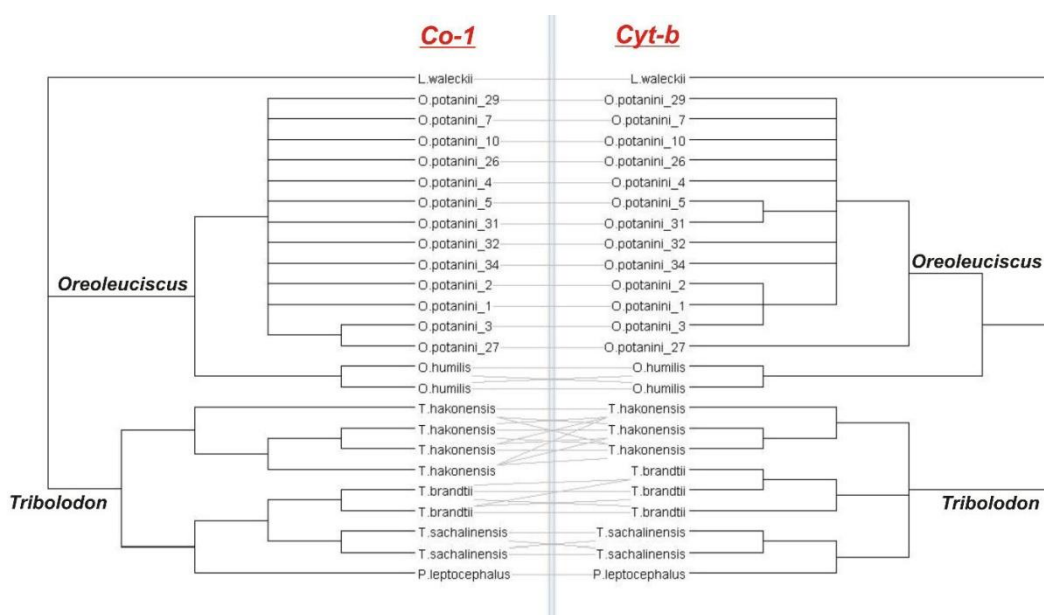


Рис. 3. Тандельграмма деревьев генов *Co-1* и *Cyt-b*, построенных по 25 последовательностям Leuciscinae из данной работы и GenBank. Консенсусные деревья построены на основе ВА-алгоритма. Показаны реконструированные генные деревья *Co-1* и *Cyt-b*. Тонкие линии на концах ветвей обозначают степень совпадения топологий двух деревьев и рассчитаны с использованием эвристического подхода, реализованного в программе Dendroscope.

В наборе дескрипторов, который определен ранее (см. Картавец, 2005 и другие цитированные работы этого автора), возрастание генетических расстояний во времени или с рангом таксонов ожидается для нескольких моделей видообразования. Однако, основываясь на зоогеографических данных (Майр, 1968; Chen et al., 1984;), другие модели, кроме географической модели, в природе редки или же виды, возникающие посредством альтернативных способов, должны быть немногочисленными для поддержания мутационно-балансового равновесия. Тем не менее вопрос, какая модель видообразования преобладает в природе, должен быть решен средствами эволюционной генетики. Можно заключить, что определение способа видообразования,

например, через прямые экспериментальные работы, как предложено (Kartavtsev et al., 2009b; Kartavtsev, 2011a,b; 2013a), или иным путем становится одним и важнейших вызовов общей биологии.

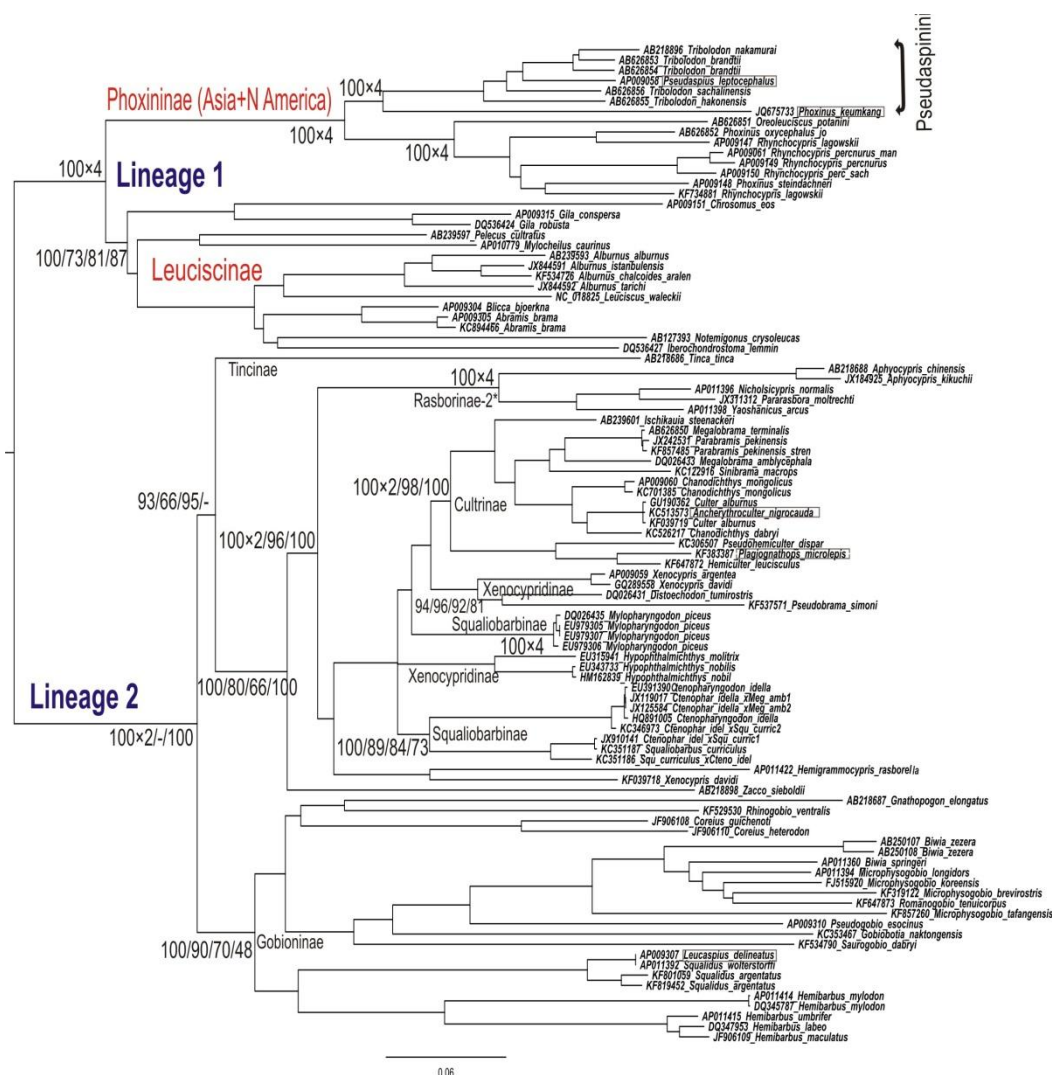


Рис. 4. Консенсусное байесовское дерево (ВА) ельцовых рыб (Leuciscinae) с 50%-ным порогом коллапсирования узлов, построенное по нуклеотидным последовательностям 13 генов митогенома для 10^6 модельных генераций. Состоятельность ВА-дерева определяется постериорными вероятностями (%), показанными рядом с узлами. Консенсусное дерево включало $k = 634$ сгенерированных деревьев в 50% доверительном наборе общего числа, равного 5838. Показаны также поддержки для других методов конструирования деревьев, ML, MP и NJ. Порядок поддержек ветвей: ВА/ML/MP/NJ. Для ML, MP и NJ, бутстреп-поддержки получены при генерировании топологий деревьев при $k=1000$ их реплик.

Средние p -расстояния по гену *Cyt-b* (рис. 5, А) показывают, что их величины внутри вида и внутри семейства сходны по величине в сравнении с обнаруженными величинами ранее для других групп рыб в этих ка-

тегориях (Kartavtsev et al., 2009b; Kartavtsev, 2011a,b, 2013a). *P*-расстояния для других таксонов позвоночных животных для соответствующих уровней сравнения составляли: (1) $1,16 \pm 0,96\%$ и $1,38 \pm 0,30\%$ (Kartavtsev, 2011a, b, 2013a) и (3) $16,42 \pm 0,85\%$ и $17,86 \pm 1,36\%$ (Kartavtsev, 2011a,b, 2013a). Похожие результаты были получены для дивергенции последовательностей по гену *Co-1* в четырех группах сравнения (Kartavtsev et al., 2009b; Kartavtsev, 2011a,b, 2013a; Слынько, Боровикова, 2012). Однако дивергенция внутри рода по гену *Cyt-b* среди представителей Leuciscinae оказалась сравнительно низкой: $8,21 \pm 1,01\%$ (см. выше) и $11,06 \pm 0,53\%$ (Kartavtsev, 2011a,b; 2013a). Таким образом, внутривидовой уровень показывает несколько сниженную диверсификацию Leuciscinae по гену *Cyt-b*, хотя различия и не являются статистически значимыми. Ясно, что *p*-расстояния для этого уровня следует проанализировать дополнительно ввиду относительно небольших размеров выборок для родового уровня в данном исследовании (см. Результаты). Данные, полученные в представленном нами исследовании, поддерживают монофилию большинства родов в пределах Leuciscinae. Однако филогения, порядок и время возникновения родов в подсемействе все же требуют дальнейшего анализа на микроэволюционной шкале (ниже рода), тогда как общая временная шкала для Leuciscinae установлена недавно достаточно надежно (Imoto et al., 2013).

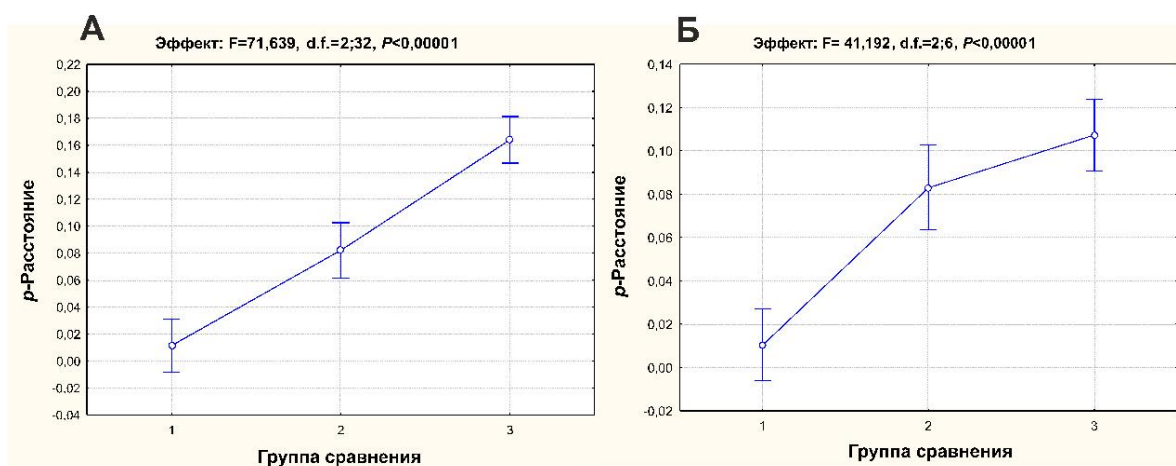


Рис. 5. Результирующий график однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), показывающий вариацию средних значений *p*-расстояний по гену *Cyt-b* (А) и по 13 белок-кодирующим генам митогенома (Б) в трех сравниваемых группах ельцов (Leuciscinae) и близких видов. На А и Б графиках показаны средние значения *p*-расстояний: 1. Внутри видов; 2. Внутри родов; 3. Внутри семейства (А) или подсемейства (Б). Статистическая значимость изменчивости показана сверху. Линии в точках средних обозначают доверительные интервалы (95%).

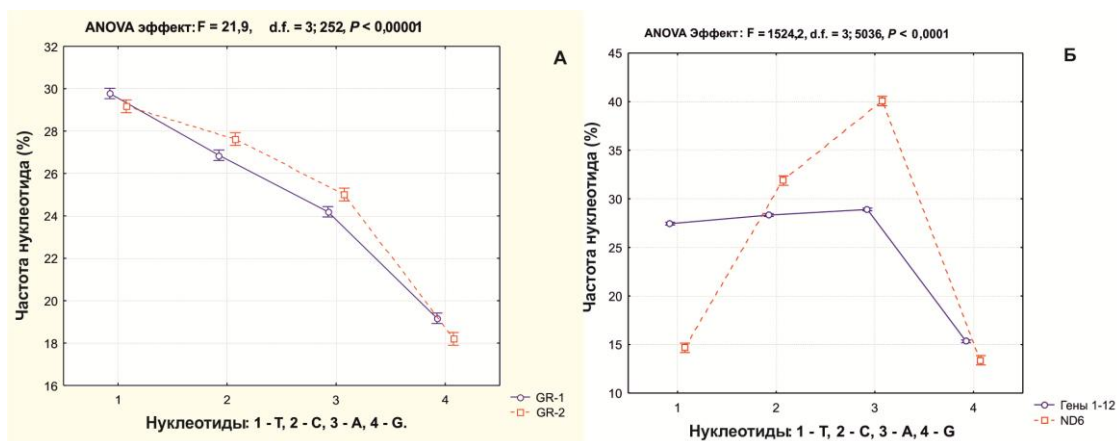


Рис. 6. Результирующий график однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и средние значения частот нуклеотидов для гена *Cyt-b* (А) и по 13 белок-кодирующих генов митогенома (Б) для ельцов *Leuciscinae* и близких видов рыб. Графики А и Б показывают эффекты взаимодействия факторов для сравниваемых таксонов (для *Cyt-b*, А) или митогенома (13 генов, Б) и изменчивости средних значений 4 типов нуклеотидов: (1) Т; (2) С; (3) А; (4) Г. Статистическая значимость эффектов показана над графиками. Линии в точках средних показывают доверительные интервалы (95%).

Показаны различия нуклеотидного состава для таксономических групп и для генов мтДНК в отличие от ND6.

Нуклеотидный состав

Смещение в соотношении пиримидинов и пуринов (Т+С):(А+Г) известно из литературных источников для разных белок-кодирующих генов, например *Cyt-b* (Kartavtsev et al., 2008, 2009b). Однако во многих работах это смещение было декларировано без статистического обоснования, как в первой из цитированных выше работ. Представленный нами анализ (рис. 6, текст выше и Tables 3S–4S, Kartavtsev et al., 2017) подтверждает эти данные и для митогеномов почти 100 видов *Leuciscinae* на точной статистической основе. Полученные данные отражают ясную генетическую детерминацию гидрофобности белков, что является их естественным свойством (Nailor, 1996). Различия в нуклеотидном составе 12 белок-кодирующих генов, которые транскрибируются с лидирующей цепи ДНК (так называемой, тяжелой, Н), и последовательности гена ND6 с противоположной цепи (L), что обнаружено в настоящей работе (рис. 6) и ранее (Kartavtsev et al., 2007a), согласуются с представлением о дифференциальной мутационной нагрузке на Н и L цепи и смещением замен на Н цепи вследствие спонтанного деаминирования нуклеотидов А и С в ходе репликации с превращением их, соответственно, в урацил (U) и гипоксантин (hX). Это автоматически ведёт к преобразованию комплементарных нук-

леотидов G в A и T в C на L цепи (Reyes et al., 1998), где располагается ND6. В некоторых работах ND6 исключали из анализа, считая неподходящим маркером для филогенетических реконструкций, но, как документировано ранее для камбалообразных (Kartavtsev et al., 2016) и в этой работе для карпообразных рыб (см. рис. 4) он вполне хорошо подходит для этих целей наравне с другими маркерами.

Молекулярная идентификация видов красноперок (Cyprinidae, Leuciscinae, Tribolodon), их гибридов и оценка потока генов внутри и между видами

В этом подразделе представлены результаты комплексного анализа трёх видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon*. Материал исследования основывается на маркерах мтДНК (*Co-1*, *Cyt-b*) и яДНК (*Rho*, *ITS-1,2*). Комплексный анализ выполнен посредством специализированных пакетов программ RDP4, ABGD, DNA-SP. Впервые оценен поток генов внутри и между исследованными видами рода *Tribolodon*. Установлены диагностические признаки для идентификации видов дальневосточных красноперок и их гибридов. Выявлены существенные различия между тремя видами рода *Tribolodon* по последовательностям участка, транскрибируемого спейсера рРНК *ITS-1,2*. Показано, что данный маркер, впервые секвенированный для трёх видов рода *Tribolodon*, позволяет идентифицировать дальневосточных красноперок до вида. Полученные данные могут быть использованы в разработке стратегий промыслового освоения исследованных видов дальневосточных красноперок без причинения ущерба их генетическому разнообразию. В ходе проведения исследования методом ДНК-штрихкодирования были определены и депонированы в международные базы данных BOLD и GenBank 220 новых нуклеотидных последовательностей мтДНК (*Cyt-b* и *Co-1*) и яДНК (*ITS-1,2* и *Rho*) представителей рода *Tribolodon*. Проанализированы и депонированы в международную базу данных GenBank 27 последовательностей гена *Cyt-b* представителей рода *Oreoleusiscus* и 15 последовательностей *Phoxinus ujmonensis*. В базу данных BOLD депонирована коллекция из 160 ваучерных экземпляров дальневосточных красноперок рода *Tribolodon*.

Материалы и методы

Коллекцию дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* сформировали в соответствии со стандартами международной программы iBOL. Эк-

земляры рыб были помещены в музей ННЦМБ ДВО РАН, с присвоением им идентификационных номеров. Первичное определение осуществлялось по внешним морфологическим признакам (Линдберг, Легеза, 1965; Гриценко, 1974; Гавренков, Свиридов, 2001; Свиридов, 2002; Nakabo, 2002). Таксономическая работа с материалом осуществлялась по общепринятым методикам для Cyprinidae (Правдин, 1966; Armbruster, 2012; Богуцкая и др., 2013).

В качестве молекулярно-генетического метода был выбран анализ нуклеотидных последовательностей. ДНК выделялась согласно двум протоколам: по методике Hot Shot (Truett et al., 2000) и с использованием фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989), включая небольшие изменения (Заславская и др., 2009). Объем ткани для экстракции составлял 10–20 мг. Реакции амплификации и секвенирования проводились на приборах Bio-Rad «Eppendorf Gradient» и GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Визуализация продуктов циклосеквенирования выполнена в восьмиканальном капиллярном генетическом анализаторе модели ABI-3500 (Foster City, CA, USA) ТИНРО-Центра, а также в ДВФУ и ННЦМБ ДВО РАН посредством анализаторов модели ABI-3130 (Foster City, CA, USA). Вторичное определение проводилось после сопоставления полученных нуклеотидных последовательностей маркерных генов (маркеров) с базой данных GenBank. Помимо этого, для диагностирования видов использовали метод сравнительной топологии деревьев и программное обеспечение Automatic Barcoding Gap Discovery, ABGD (Puillandre et al., 2012). Реконструкция топологий генных деревьев проводилась методами Neighbor Joining (NJ, Saitou, Nei, 1987), Maximum Likelihood (ML, Felsensten, 1981) и Maximum Parsimony (MP, Kumar et al., 1993) в ПП MEGA-6 (Tamura et al., 2013) и байесовского подхода на основе ПП MrBayes 3.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Использовались оптимальные эволюционные модели, выбранные с помощью программы jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). Оптимальность оценивалась на основе информационного критерия AIC (Akaike, 1973) и AICc (Hurvich, Tsai, 1989). Тандельграммы реконструировались в ПП Dendroscope (Huson, Scornavacca, 2012). Для выявления гибридных особей использовали ПП RDP4 (Martin et al., 2015) и его программные модули: RDP (Martin, Rybicki, 2000; Arenas, Posada, 2010), Geneconv (Sawyer, 1989; Padidam et al., 1999), Bootscan (Salminen et al., 1995; Martin et al., 2005), MAXCHI (Smith, 1992; Posada, Crandall, 2001),

CHIMAERA (Posada, Crandall, 2001), Şişcan (Gibbs et al., 2000) и LARD (Holmes et al., 1999). Оценки генетической дифференциации, потока генов и ДНК-полиморфизма проводили на основе ПП DNA SP (Librado, Rozas, 2009).

Полученные в работе последовательности генов помещены в базы данных GenBank и BOLD. Анализ внутривидовой и межвидовой дивергенции и морфологических признаков проводился с использованием ПП Statistica 6 (StaSoft Inc, 2005).

Результаты

Молекулярно-генетическая изменчивость

Анализ потока генов проводили между представителями одного вида из разных мест обитания (для *Tribolodon hakonensis* и *T. brandtii*) и между разными видами дальневосточных красноперок по маркерам мтДНК (*Cyt-b* и *Co-1*) и яДНК (*ITS-1,2* и *Rho*) (рис. 7). При попарных сравнениях *p*-расстояний (рис. 7, *p*-Distance) для особей из групп сравнения (Comparison Group): локальных популяций, географически разобщенных популяций и разных видов выявлено, что различия средних величин *p*-расстояний оказались статистически значимыми для всех маркеров, кроме последовательностей *ITS-1,2*. Для этого молекулярного маркера отличия между первой и второй группами (внутривидовой уровень) были незначительными, и только различия по третьей группе (межвидовой уровень) были существенными (рис. 7).

Визуальным методом в программе BioEdit обнаружены вставки и замены в последовательностях нуклеотидов участка *ITS-1,2*, по которым точно идентифицировались особи дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* до вида (табл. 3).

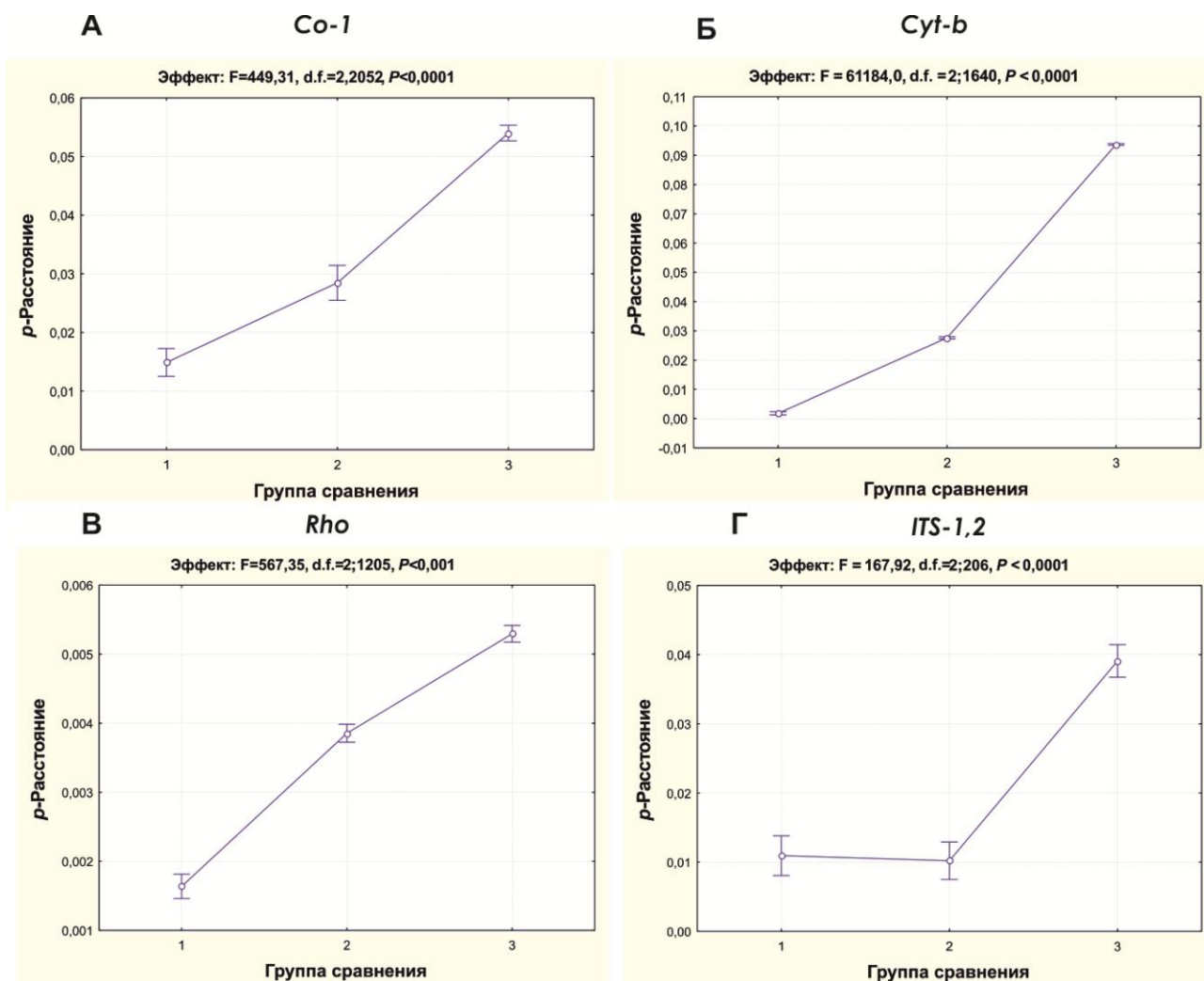


Рис. 7. Распределение средних значений p -расстояний в трех группах сравнения для четырех проанализированных маркеров генов трех видов рода *Tribolodon*. Обозначения: 1) особи *T. hakonensis* из одной выборки, 2) особи *T. hakonensis* из разных районов обитания, 3) особи разных видов (*T. hakonensis*, *T. brandtii* и *T. sachalinensis*). Данные об изменчивости p -расстояний для всех четырех маркеров: А. *Co-1*: F=449,31, d.f.=2 и 2056, $P < 0,0001$; Б. *Cyt-b*: F=61184,0, d.f.=2 и 1640, $P < 0,0001$; В. *Rho*: F=567,35, d.f.=2 и 1205, $P < 0,0001$; Г. *ITS-1,2*: F=167,92, d.f.=2 и 206, $P < 0,0001$.

**Вставки и замены в последовательностях нуклеотидов *ITS-1,2*
для трех изученных видов рода *Tribolodon***

Последовательность для вида/ номер нуклеотида (ов)	42-61	290	321-329	362	411-424	457	514	516	530	553	571-591
<i>T. hakonensis</i>	CATT TTTT TT- ATTC CCA- A	C	CCC CGG GGG	T	CCC ---- -- GGG	C	G	T	C	G	TCG GGA GG- GAG CGG GAG TCG
<i>T. brandtii</i>	AATT TTTT TTTC CCCC CAC A	T	GCC --- GGG	T	C--- ----- --G	T	A	C	T	C	GGA CGG AAG GAG GGG GGG TTC
<i>T. sachalinensis</i>	CATT TTTT TTT- TCCC CA-A	A	CC-- -- GGG	C	CCC TTC CCG GGG GG	C	G	T	C	G	TCG GGA GT- GAG CGG GAG TCG

Примечание. Нуклеотиды, выделенные серым и красным цветом, показывают отличие от исходных последовательностей *T. hakonensis*.

Результаты поиска разрыва значений генетических расстояний по ПП ABGD

Для разделения изученных особей на группы (предполагаемые таксоны – виды, подвиды, криптические виды и т. д.) проанализированы генетические расстояния для каждого маркера с использованием трёх мер (моделей) замен нуклеотидов: JC, K80 и *p*-расстояния (простая мера различия: нескорректированные расстояния). При проведении анализа последовательностей четырех маркеров на основе ПП ABGD

(<http://www.abgd.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>) в зависимости от маркера выделено различное число операционно-таксономических группировок. Для *Co-1* на основе всех трех моделей выделено четыре группировки: 1) *T. hakonensis* (юг Приморского края); 2) *T. hakonensis* (о. Сахалин); 3) *T. brandtii* (из всех точек сбора) и две гибридные особи; 4) *T. sachalinensis*. Для *Cyt-b* на основе K80 и *p*-расстояния выделено пять группировок: 1) *T. hakonensis* (юг Приморского края); 2) *T. hakonensis* (о. Сахалин); 3) *T. brandtii* (юг Приморского края) и две гибридные особи; 4) *T. brandtii* (о. Сахалин); 5) *T. sachalinensis*. Для *Cyt-b* с использованием модели JC число групп соответствовало числу номинальных видов: 1) *T. hakonensis* (из всех точек сбора); 2) *T. brandtii* (из всех точек сбора) и две гибридные особи; 3) *T. sachalinensis*. Для *ITS-1,2* всеми тремя моделями выделены две группы: 1) *T. hakonensis* (все особи вне зависимости от точек сбора), *T. sachalinensis* и гибридный экземпляр ТВV03NTHV03_03; 2) *T. brandtii* (все особи вне зависимости от точек сбора) и гибридный экземпляр ТВK012NTHK0_12. Изменчивость *Rho* составила 8 сайтов, информативных для парсимонии, и была настолько низкой, что все последовательности попали в одну группу. Данные АВGD-анализа о числе операционно-таксономических группировок в целом совпадали с выделенными кластерами (ветвями) на филогенетических реконструкциях, полученными тремя подходами (NJ, ML и MP) для каждого маркера кроме *Rho*.

Результаты анализа дифференциации и потока генов на основе III DNA-SP

Значения генетической дифференциации были рассчитаны отдельно для каждой из четырех выделенных для анализа группировок по 13 последовательностям четырех объединенных маркеров общей длиной 2903 п.н.: 1) *T. hakonensis* (зал. Анива, о. Сахалин); 2) *T. hakonensis* (б. Киевка, Приморский край); 3) гибридные особи *T. hakonensis* × *T. brandtii* (б. Киевка и зал. Восток, Приморский край); 4) *T. brandtii* (зал. Восток, Приморский край). Поток генов или доля мигрантов (N_m) рассчитывались для выделенных группировок. Показано, что поток генов обнаруживается только между представителями одного вида, но не между представителями разных видов рода. Даже разные регионы имеют достаточно ограниченный поток генов. Показано, что для дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* поток генов между близко расположенными популяциями одного и того же вида является существенным и статистически значимым ($N_m = 1,20-9,33$,

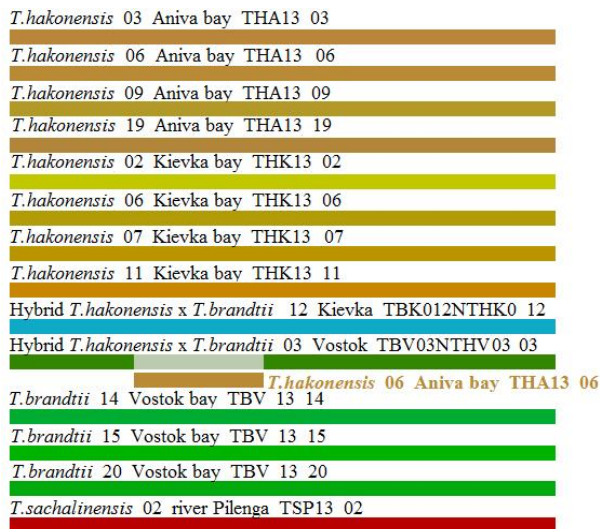
$P < 0,05$), а для географически удаленных популяций одного и того же вида – несущественным и незначимым ($Nm = 0,03–0,21$, $P > 0,05$).

Результаты рекомбинантного анализа (RDP)

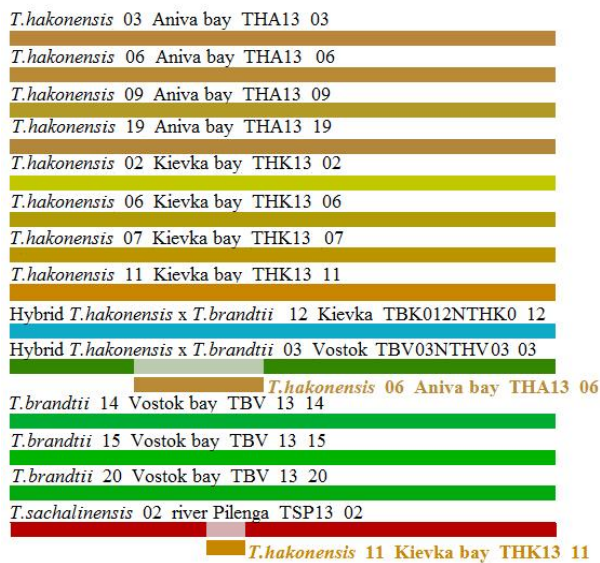
Для поиска рекомбинаций в последовательностях изученных видов дальневосточных красноперок было разработано 98 вариантов настроек анализа. Для анализируемого рекомбинантного участка реконструировали NJ-дерева, на которых для рекомбинантной последовательности обозначались предполагаемые предковые последовательности. Итоги рекомбинантного анализа последовательностей четырех объединенных фрагментов генов *Rho*, *ITS-1,2*, *Co-1* и *Cyt-b* красноперок проиллюстрированы графически (рис. 8). Было получено пять рекомбинантных последовательностей. Тем не менее только одна рекомбинация была выявлена на всех графиках, построенных разными методами (рис. 8).

Данная рекомбинация № 1 (локализация 718–1270 п.н.) присутствовала у *T. hakonensis* экземпляра № 3 из зал. Восток. $P = 2,526 \cdot 10^{-12}$ (RDP); $P = 2,307 \cdot 10^{-9}$ (Genconv); $P = 1,618 \cdot 10^{-7}$ и $P = 4,438 \cdot 10^{-8}$ (MaxChi; последнее значение – с учетом инделов при построении графиков); $P = 3,068 \cdot 10^{-7}$ (Chi-maera). Особь ТВК012НТНК0_12 была отмечена RDP как отдельный вид, и при визуальном анализе последовательности нуклеотидов *ITS-1,2* у этой особи (табл. 3) были выявлены признаки, характерные как для *T. hakonensis*, так и для *T. brandtii*. На этом основании данная особь была отнесена к потенциально-гибридным особям. Итоги рекомбинантного анализа последовательностей четырех объединенных фрагментов генов *Rho*, *ITS-1,2*, *Co-1* и *Cyt-b* красноперок проиллюстрированы графически (рис. 8).

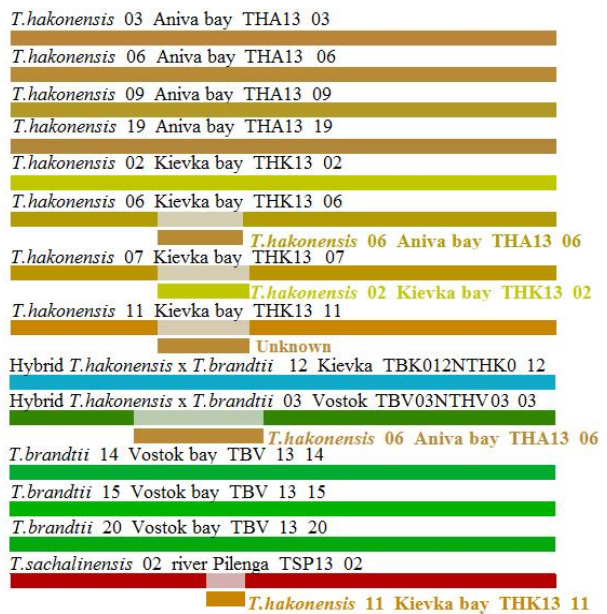
Дерево, реконструированное на основе объединенных последовательностей яДНК, *Rho* + *ITS-1,2* состоит из двух кластеров: 1) *T. hakonensis* и потенциальный гибрид *T. hakonensis* × *T. brandtii* ТВV03НТНВ03_03; 2) *T. brandtii* и потенциальный гибрид *T. hakonensis* × *T. brandtii* ТВК012НТНК0_12, а также – обособленной ветви *T. sachalinensis* (рис. 9). Максимальные внутривидовые *p*-расстояния *T. hakonensis* (из Приморского края и о. Сахалин) для маркера *ITS-1,2* составили 1,5%, в то время как максимальное *p*-расстояние между видами *T. hakonensis* и *T. brandtii* для *ITS-1,2* равно 5,3%.



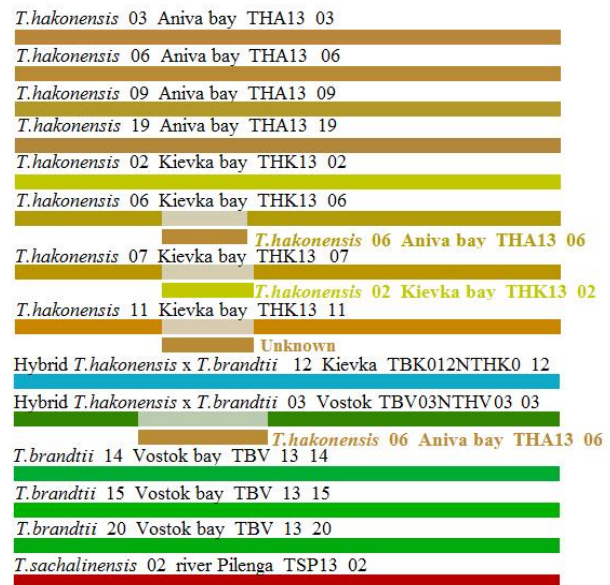
A



B



Б



Г

Рис. 8. Рекомбинантные последовательности четырех объединенных фрагментов красноперок (*Rho*, *ITS-1,2*, *Co-1* и *Cyt-b*). Показаны рекомбинантные особи, обнаруженные при индивидуальных настройках расчетов для исследуемой выборки 14 нуклеотидных последовательностей: А. Варианты 1–40; Б. Варианты 41–48; В. Варианты 49–64; Г. Варианты 65–72.

Результаты анализа генных деревьев

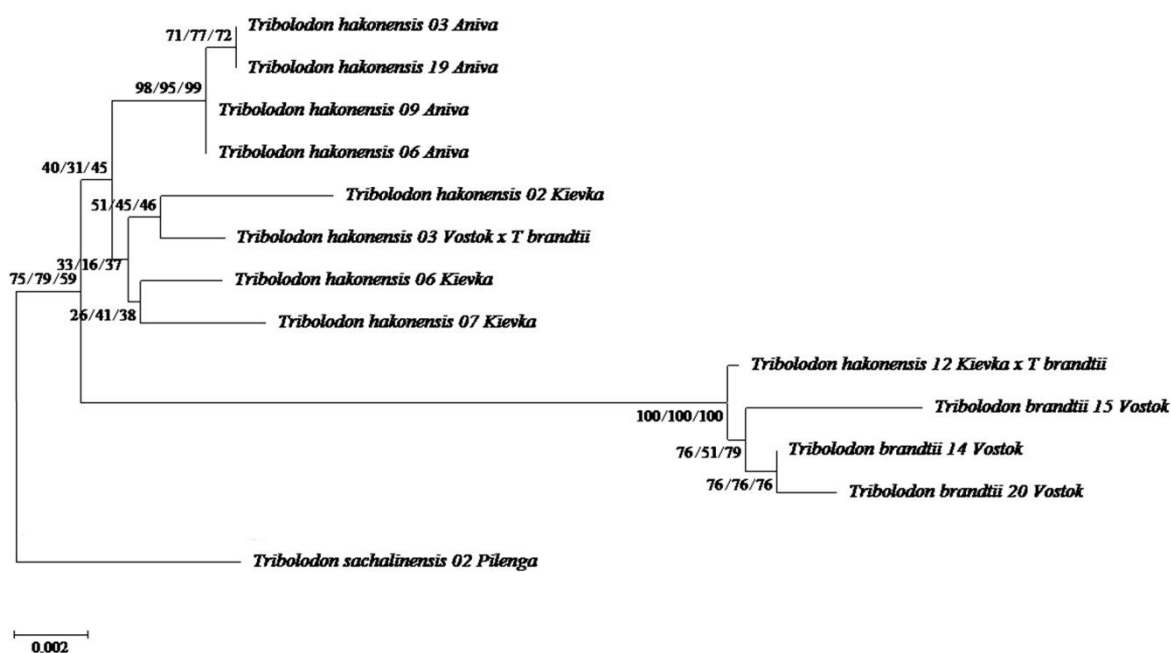


Рис. 9. Генное дерево (ML), основанное на 13 нуклеотидных последовательностях двух маркеров яДНК, *Rho* и *ITS-1,2* рода *Tribolodon*. Показаны бутстреп-поддержки для всех трех подходов конструирования дерева – ML, MP и NJ. Рядом с ветвями показан порядок поддержек (%): ML/MP/NJ.

При реконструкции генных деревьев по отдельности для маркеров *Co-1* и *Cyt-b* выявлялись отдельные ветви для особей с о. Сахалин и юга Приморского края, а результаты кластеризации совпадали со значениями средней дивергенции (p -расстояния) для данных маркеров (рис. 10). На филограммах, основанных на объединенных последовательностях *Co-1* и *Cyt-b*, и построенных посредством четырех подходов, выявляются три кластера с высокой поддержкой топологии: 1) *T. hakonensis* (зал. Анива); 2) *T. hakonensis* (б. Киевка и зал. Восток); 3) *T. brandtii* и предполагаемые гибридные особи *T. hakonensis* × *T. brandtii* ТВК012НТНКО_12 и *T. hakonensis* × *T. brandtii* ТВВ03НТНВ03_03, выявленные в ходе ABGD анализа. Вид *T. sachalinensis* использован в качестве внешней группы (рис. 10). Максимальные внутривидовые p -расстояния *T. hakonensis* (Приморский край и о. Сахалин) составили 3,1% для *Co-1* и 3,3% для *Cyt-b*; *T. brandtii* (Приморский край и о. Сахалин) – 3,5% для *Co-1* и 2,3% для *Cyt-b*. Между видами *T. hakonensis* и *T. brandtii* максимальные p -расстояния были 7,2% для *Co-1* и 9,6% для *Cyt-b*. Как видно по дендрограмме, кластеризация особей трех изученных представителей дальневосточных красноперок имеет естественный характер и хорошо согласуется с имеющимися представлениями о систематике рода *Tribolodon*, а также с наличием региональных группировок Приморья и Сахалина.

Результаты анализа, выполненного с использованием ПП *Dendroscope*

Тандельграмма, иллюстрирующая степень сходства топологий консенсусных NJ-деревьев, построенных по 14 последовательностям *Co-1* и *Cyt-b*, выявила сходство топологий двух ветвей для этого рода (см. рис. 3).

Обсуждение

Анализ дивергенции нуклеотидных последовательностей

Выявленные картины генетической дифференциации дальневосточных красноперок оказались сложными, и разные авторы по-разному интерпретировали наблюдаемое разнообразие выявляемой изменчивости и дифференциации видов рода *Tribolodon*.

Для трех исследованных маркеров (*Co-1*, *Cyt-b* и *ITS-1,2*) обнаружены статистически значимые различия генетической дивергенции между представителями рода *Tribolodon* на внутривидовом, межвидовом и межпопуляционном уровнях (рис. 7). По четвертому маркеру (*Rho*) обнаружены лишь незначительные различия, что обусловлено малым филогенетическим сигналом (выявлено всего восемь информативных для парсимонии сайтов). Несмотря на то что многие авторы используют нуклеотидную последовательность гена *Rho* для анализа филогенетических отношений в классе Actinopterygii (Chen et al., 2003; Dettai, Lecointre, 2005), в частности в семействе Cyprinidae (Chen et al., 2008; Behrens-Chapuis et al., 2015), для видов рода *Tribolodon* этот маркер оказался сравнительно малоинформативным.

Между географически близко расположенными популяциями *T. hakonensis* поток генов обычно весьма значительный. Например, между популяциями этого вида из б. Киевка и зал. Восток значения потока генов Nm высоки и достоверны (1,20–9,33, $P < 0.05$).

О наличии неоднородности генофонда *T. hakonensis* свидетельствуют различия между выборками из южных и северных районов видового ареала (наши данные, см. рис. 10; Брыков и др., 2011, 2013; Маляр, 2017). Выявлено, что две географические группировки *T. hakonensis* (из Приморского края и о. Сахалин) отличаются по средним значениям p -расстояний: для мтДНК маркеров *Co-1* p -расстояния $\leq 2,6\%$ и *Cyt-b* p -расстояния $\leq 3,2\%$, а для яДНК маркеров *ITS-1,2* p -расстояния $\leq 2,3\%$ и *Rho* p -расстояния $\leq 0,8\%$. Как следствие, поток генов между северной и южной формами *T. hakonensis* оказался низким, составил $Nm = 0,03–0,21$ и был статистиче-

ски незначим ($P>0.05$). Это свидетельствует о весьма слабом обмене особями между региональными группировками или южной и северной формами *T. hakonensis*, по меньшей мере в период данного исследования.

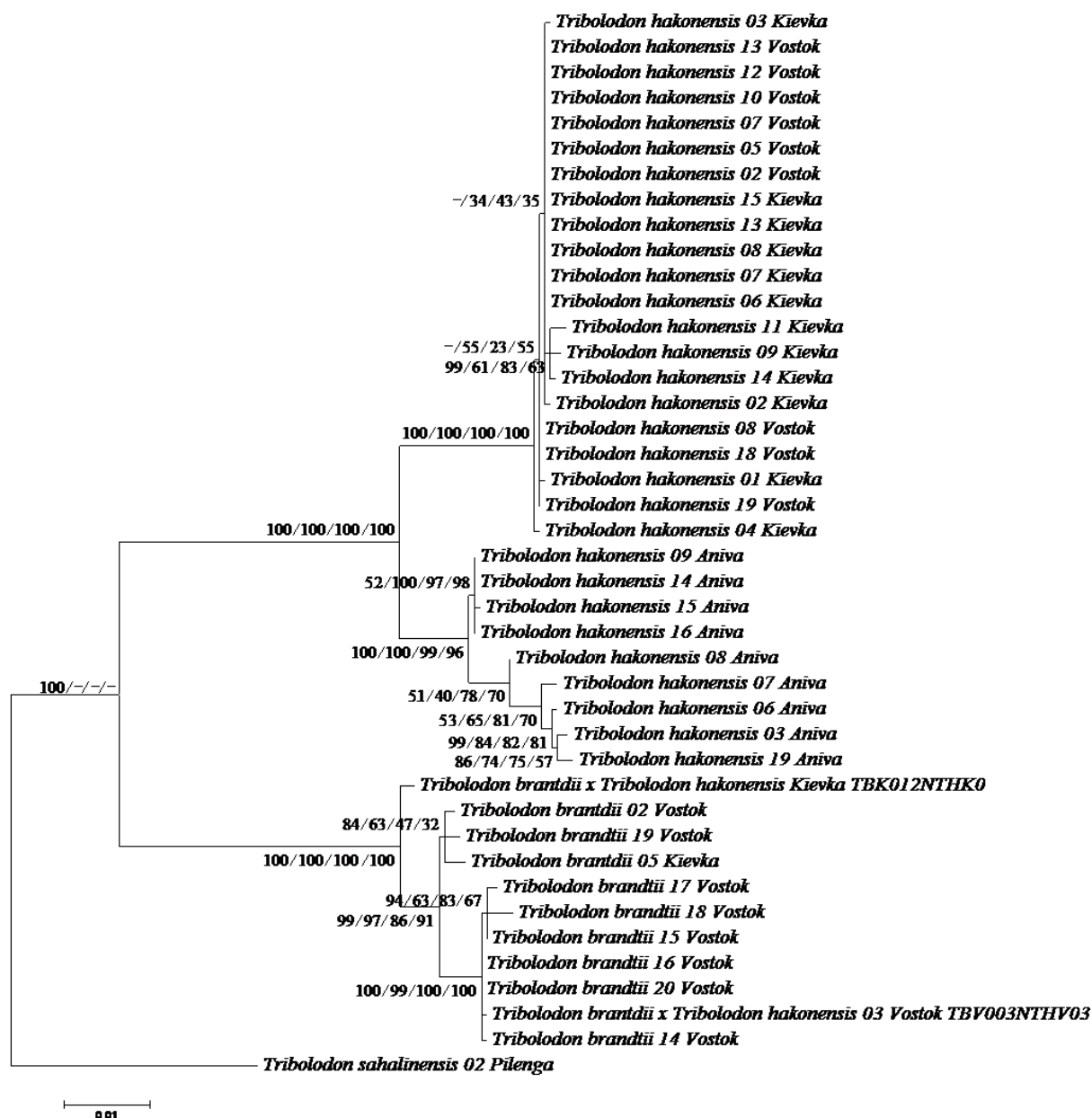


Рис. 10. Байесовское генное дерево (BA) представителей рода *Tribolodon*, основанное на 42 объединенных нуклеотидных последовательностях маркеров *Co-1* и *Cyt-b*. Показаны также поддержки для трех других подходов конструирования дерева; порядок поддержек (%): BA/ML/MP/NJ.

Сложность однозначной трактовки результатов молекулярно-генетического анализа для разных систематических категорий (видов, подвидов и популяций) рода *Tribolodon* связана с диапазоном значений p -расстояний. Например, для маркера *Cyt-b* мтДНК значения p -расстояний

составили: $8,7\pm 1-10,2\pm 1,09\%$ – для разных видов; $4,0\pm 0,6-4,5\pm 0,6\%$ – для подвидов *T. brandtii brandtii* и *T. brandtii maruta* (Sakai, Amano, 2014); $2,7\pm 0,2 - 3,2\pm 0,5\%$ для популяций *T. hakonensis* с острова Сахалин и юга Приморского края и $2,2\pm 0,4-2,4\pm 0,4\%$ – для популяций *T. brandtii* с о. Сахалин и юга Приморского края. Межвидовые значения *p*-расстояний приблизительно два раза превышают *p*-расстояния между подвидами и разными популяциями, а *p*-расстояния между конспецифичными популяциями *T. hakonensis* и *T. brandtii* (о. Сахалин и юг Приморского края) приближаются к таковым между подвидами.

На филогенетической реконструкции, построенной по двум объединенным маркерам мтДНК (*Co-1* и *Cyt-b*), *T. hakonensis* из популяций с о. Сахалин и юга Приморского края образуют разные ветви (рис. 10). На филограмме, реконструированной на основе двух маркеров яДНК (*ITS-1,2* и *Rho*), поддержки бутстрепа для ветвей, принадлежащих популяциям разных мест обитания *T. hakonensis*, не велики (рис. 9). Такое расхождение в филограммах может быть связано с меньшей изменчивостью и более поздним наступлением реципрокной монофилии для ветвей дерева маркеров яДНК по сравнению маркерами мтДНК (Nei, 1987).

Наблюдаемую дивергенцию между популяциями *T. hakonensis* с о. Сахалин и юга Приморского края исследователи объясняют по-разному. Одна из трактовок представлена гипотезой гомоплоидной гибридизации как источнике возникновения южной формы *T. hakonensis* (Семина и др., 2006, 2007; Брыков и др., 2011; Polyakova et al., 2015). Другая трактовка предполагает, что различия обусловлены относительно большой географической изоляцией, которая привела к накоплению нуклеотидных различий между локальными популяциями с севера и юга ареала вида (Золотова, Картавцев, 2017; Zolotova, Kartavtsev, 2017a,b, 2018).

Следует учитывать, что для некоторых родов ветви Phoxiniinae значения *p*-расстояний могут быть небольшими даже между разными видами одного рода. Для близких к роду *Tribolodon* видов *O. humilis* и *O. potanini* межвидовые значения *p*-расстояний для маркера *Cyt-b* мтДНК составили $1,74\pm 0,01\%$, (см. предыдущий подраздел, а также Kartavtsev et al., 2017). В связи с этим исследование генетического разнообразия рода *Tribolodon* нужно продолжать, применяя комплексный подход, включающий сравнительно-морфологический и молекулярно-генетический анализ.

Дальневосточные красноперки рода *Tribolodon* обладают особенностями биологии, обеспечивающими возможность межвидовой гибридизации. Например, внешнее оплодотворение, сходный ареал, близкие экологические ниши у популяций разных видов и частично перекрывающиеся сроки нереста могут способствовать межвидовой гибридизации. Очевидно, периодически отсутствуют препятствия для скрещивания особей разных видов этого рода, что может приводить к образованию гибридов. Однако для того чтобы такие особи сформировали гибридный вид, требуется повышенная приспособленность гибридов. Однако гибриды, полученные для *T. brandtii* и *T. hakonensis* с юга Приморского края, не жизнеспособны (Омельченко и др., 1986; Иванков и др., 1987) и, следовательно, не могут формировать устойчивые самостоятельные популяции. В случае справедливости гипотезы о гомоплоидной гибридизации, наоборот, наблюдалась бы хорошая жизнеспособность потомства *T. brandtii* и *T. hakonensis* с юга Приморского края.

Полученные в представленном разделе результаты молекулярно-генетического (Zolotova, Kartavtsev, 2017a,b, 2018) и сравнительно-морфологического анализа (Иванков и др., 2016; Ivankov et al., 2017) подтверждают существование трех видов рода *Tribolodon* на территории Приморья и о. Сахалин: *T. hakonensis*, *T. brandtii*, *T. sachalinensis*. Похожие результаты получены ранее и другими авторами, использовавшими для разграничения видов красноперок только морфологические признаки (Гриценко, 1974, 2002; Гавренков, Иванков, 1979; Незнанова, 2012; Neznanova, 2015).

Сравнение морфологических и молекулярных данных для гибридных особей

Несмотря на различия в числе митохондрий в сперматозоидах (Незнанова, 2012; Neznanova, 2015), разные пики сроков нереста (Гриценко, 1974, 2002; Гавренков, Иванков, 1979) и стабильные по числу хромосом кариотипы красноперок *T. hakonensis*, *T. brandtii* и *T. sachalinensis* (Рязанова, Полякова, 2012), у этих рыб доказана способность к гибридизации и возникновению гибридных особей (Sakai, Hamada, 1985; Sakai, 1995; Sakai et. al., 2002). Сравнительно-морфологический анализ совместно с анализом последовательностей молекулярно-генетических маркеров подтвердил существование гибридов между разными видами рода *Tribolodon*. У одного из гибридов, очевидно, возвратного скрещивания (*T. hakonensis*×*T. brandtii*, F_1)×*T. brandtii*

№ 12 из б. Киевка значения признаков (число чешуй, индексы линейных промеров, число позвонков, число пор в сейсмодатчиковых каналах головы) являются промежуточными между таковыми *T. hakonensis* и *T. brandtii* (неопубликованные данные). Промежуточные состояния признаков у гибридных особей – это распространенное явление, описанное в литературе для красноперок (Иванков и др., 1984; Sakai, Hamada, 1985). В сейсмодатчиковой системе гибрида № 12 было обнаружено соединение между надглазничным (CSO) и подглазничным (CIO) каналами, находящееся только с левой стороны тела. Такая асимметрия ранее отмечалась у гибридов возвратного скрещивания с *T. brandtii* в Японии (Sakai, Hamada, 1985; Sakai, 1995). Молекулярные данные (RDP) совпадают с данными сравнительной морфологии о гибридном происхождении данной особи ТВК012НТНК0_12 (Zolotova et al., 2019).

Филогенетическое положение рода Tribolodon в подсемействе Leuciscinae

Молекулярно-генетический анализ по полному митогеному и маркерам *Cyt-b* мтДНК (см. предыдущий подраздел) подтвердил монофилию *Leuciscinae sensu stricto* в пределах топологии *Leuciscinae sensu lato* (Kartavtsev et al., 2017). Также показана филогенетическая обособленность ветви *Phoxininae*, включающей роды *Tribolodon*, *Oreoleuciscus*, *Pseudaspius* и *Phoxinus (Rhynchocypris)* (Богущая, 1990; Картавцев и др., 2002; Kartavtsev et al., 2017), которая наряду с *Leuciscinae*, входит в семейство *Leuciscidae* (Chen, Mayden, 2009). В пределах *Phoxininae* триба *Pseudaspinini* имеет высокую бутстреп-поддержку, но она по данным маркеров мтДНК является парафилетичной и включает по меньшей мере два рода – *Pseudaspius* и *Tribolodon*. В дальнейшем, используя комплекс мтДНК и яДНК маркеров, предстоит разрешить данный вопрос.

Молекулярно-филогенетические реконструкции и таксономическое исследование бельдюговидных рыб (Cottoidei: Zoarcales)

на основе митохондриальных генов *Co-1* и *Cyt-b*

Существенный прогресс в изучении систематики и эволюции высших таксонов лучеперых рыб (*Actinopterygii*) обозначился с развитием филогенетики (Delsuc et al., 2005; Li et al., 2007). Появление последовательно полных геномов рыб способствовало обнаружению массы консервативных генов-ортологов. Внедрение их в качестве молекулярных маркеров в процесс реконструкции древа жизни рыб, а также обогащение так-

сономической выборки позволили повысить информативность филогенетических построений, а также послужили альтернативой схемам на основе полных митогеномов, применявшихся для этих целей прежде (Inoue et al., 2001; Miya et al., 2001, 2003). Однако применение отдельных генов митогенома, таких как *Co-1* и *Cyt-b*, также продолжает вносить существенный вклад в понимание молекулярной изменчивости и генетической дивергенции таксонов, в том числе имеющих важное значение для глобальной программы переописания биоразнообразия живого мира iBOL.

Серия недавних работ (Near et al., 2012, 2013; Broughton et al., 2013; Betancur-R et al., 2013) с привлечением внушительного по объему материала обозначила продвижение в изучении систематики и эволюции основных линий лучеперых рыб. Это было реализовано в виде ресурса с обновляющейся схемой классификации костных рыб (Betancur-R et al., 2014). Так, был разрешен вопрос монофилетичности (при корректировке таксономического состава) наиболее многочисленного отряда костных рыб – Perciformes. Вместе с тем информативная матрица из 21 гена общей длиной более 20000 п.н. обеспечила основание для расширения подотряда Cottoidei с включением в его состав бывших подотрядов в составе Perciformes: Anoplopomatales, Gasterosteales, Cottales и Zoarcales (классификация с переработкой на основе Li et al., 2009). Из сопоставления предшествующих реконструкций (Miya et al., 2003; Li et al., 2009; Near et al., 2012, 2013) следует, что данная схема устойчива, и с привлечением новых данных изменение основных её узлов крайне маловероятно. Однако структура отношений внутри определившихся инфраотрядов на данный момент фактически недоступна для включения в древо жизни по причине обедненной таксономической выборки. Среди таких относительно недостижимых для древа жизни групп остаётся инфраотряд Zoarcales (ранее – подотряд Zoarcoidei).

Понимание филогенетических отношений и таксономии бельдюговидных рыб в последние несколько лет существенно углубилось ввиду появления ряда работ от нескольких независимых коллективов (Радченко и др., 2009; Radchenko et al., 2009; Kartavtsev et al., 2009a; Radchenko et al., 2010a,b, 2012a,b, 2014a,b; Черешнев и др., 2012; Chereshev et al., 2013; Turanov et al., 2012, 2014; Kwun, Kim, 2013; Kim et al., 2014). Подотряд насчитывает порядка 400 видов морских рыб, обитающих в умеренных и арктических водах Северного и Южного полушарий (Anderson, 2003;

Nelson, 2006; Eshmeier, 2019), но при этом большинство таксонов сосредоточено в Северном полушарии.

Интерес к систематике и поиску истока современного биологического разнообразия подотряда может быть обусловлен следующим: (i) синапоморфии на уровне морфологии всего таксона ограничиваются наличием единичной пары ноздрей; однако однозначных диагностических признаков пока не имеется (“...there is no known diagnostic character or simple combination of characters that distinguishes this group from the other blennylike perciforms...”; Nelson, 2006); (ii) монофилетическое происхождение подотряда сомнению не подвергается, однако состав и взаимоотношения его семейств являются нестабильными, как выясняется в ходе привлечения к анализу ранее недоступных редких таксонов (Zemnukhov, 2012; Radchenko et al., 2012a,b; Kwun, Kim, 2013), общим происхождением в этой группе объединены, с одной стороны, эволюционно продвинутые и наиболее широко распространенные представители семейства бельдюговые (Zoarcidae), обладающие высокой фенотипической (и в ряде случаев генетической) пластичностью, но в то же время сохраняющие примитивные черты кариотипа (Ghigliotti et al., 2012) и, с другой стороны, высокоспециализированные, узкоареальные группы с примитивными чертами морфологии, но имеющие незначительные (мтДНК) либо совершенно не выявляемые (ядДНК) межвидовые отличия на уровне ДНК, как, например, у *Stichaeus grigorjewi* и *S. nozawae* (см. Kartavtsev et al., 2009a; Turanov et al., 2017).

Таксоном с наиболее спорным положением внутри подотряда по праву можно считать семейство Stichaeidae. Предложение о необходимости рассматривать подсемейства стихеевых рыб в ранге самостоятельных семейств (Nazarkin, 1998) было поддержано молекулярно-генетическими данными ввиду наличия значимых отличий между ними на уровне ДНК, сопоставимых с таковыми между разными семействами подотряда (Радченко и др., 2009; Radchenko et al., 2010a, 2012a,b). Кроме того, некоторые подсемейства стихеевых (Neozoarcinae, Azygopterinae) генетически оказались значительно ближе к бельдюговым рыбам – сем. Zoarcidae (Радченко и др., 2009; Radchenko et al., 2010a; Kwun, Kim, 2013).

Привлечение большого числа филогенетически информативных признаков, безусловно, имеет преимущества, однако в ситуации с филогенией бельдюговидных рыб немаловажной является также задача обеспечения максимально возможной таксономической выборки или, по крайней мере,

оригинальных данных. В настоящей работе при использовании оригинальной выборки с привлечением матрицы последовательностей нуклеотидов (далее – последовательностей) митохондриальных генов *Co-1* и *Cyt-b*, а также при опоре на предшествующие работы выполнен анализ филогенетических построений, а также систематики подотряда Zoarcoidei.

Материалы и методы

Сбор материала и получение последовательностей

В анализе были использованы фрагменты 5'-участков митохондриальных генов *Co-1* (1340 п.н.) и *Cyt-b* (941 п.н.) бельдюговидных рыб, отловленных в водах дальневосточных морей (Японское, Охотское, Берингово; рис. 11) в период с 2008 по 2012 гг. Всего к анализу было привлечено 163 последовательности от 45 видов 8 семейств и 2 инфраотрядов. Материал, вошедший в основу данного исследования, представлен ранее в англоязычной версии (Turanov et al., 2017). В качестве внешней группы привлечена комбинированная последовательность генов *Co-1* и *Cyt-b* вида *Hypoptychus dybowskii*, одного из близких инфраотрядов – Cottoidei: Gasterosteales (по: Betancur-R et al., 2014). У каждого экземпляра был взят образец мышечной ткани с фиксацией в 95% этиловом спирте. Выделение ДНК из мышечной ткани производили по стандартной методике (Sambrook et al., 1989) с исключением фенола на стадии депротенинизации и добавлением РНКазы. Экспериментальная часть работы, заключающаяся в получении нуклеотидных последовательностей генов *Co-1* и *Cyt-b*, была проведена на базе Лаборатории геномики морских организмов (KIOST, Republic of Korea). Реакционная смесь для ПЦР объёмом 20 μ l включала 10 μ l 2X TOPsimple™ DyeMIX-Tenuto (Daejeon, KOREA), 8 μ l деионизированной воды, а также по 1 μ l 10 μ mol раствора прямого и обратного праймеров (табл. 4).

Алгоритм ПЦР включал предварительный нагрев при 95 °C в течении 2 мин, с последующими 5 циклами с денатурацией при 94 °C в течении 30 с, отжиг при 55 °C 40 с и элонгацию при 72 °C в течение 1 мин с понижением температуры в каждом цикле на 1 °C. Затем следовали 35 циклов ПЦР со следующим алгоритмом: денатурация при 95 °C – 30 с, отжиг при 50 °C – 40 с и элонгация при 72 °C – 1 мин. Для проверки результатов амплификации был выполнен электрофорез ампликонов в 1% агарозном геле. Ампликоны подходящего качества были посланы для секвенирования в компании Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Republic of Korea) и SolGent

(SolGent Co., Ltd., Daejeon, Republic of Korea). Создание консенсусных последовательностей проводили с использованием ПП ChromasPro 1.34 (ChromasPro; <http://www.technelysium.com.au/chromas.html/>). Выравнивание и корректировка рамки считывания полученных последовательностей проведены в программе MEGA-6 (Tamura et al., 2013) с применением алгоритма Muscle и его опций по умолчанию (Edgar, 2004); в качестве референсных последовательностей использовали фрагменты митохондриального генома *Petroschmidtia toyamensis* (Miya et al., 2003).

Таблица 4

Праймеры, использованные для получения последовательностей мтДНК бельдюговидных рыб

Название праймера	Последовательность праймера в направлении 5'→3'	Источник
Ген <i>Co-1</i> (≈1500 п.н.)		
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Ward et al., 2005
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	Ward et al., 2005
H7480-Ser	ATG TGG YTG GCT TGA AA	Miya, Nishida, 1999
Ген <i>Cyt-b</i> (≈1100 п.н.)		
B5	CAATGGCAAGCCTACGAAAA	Радченко и др., 2009; Radchenko et al., 2009
B6	AGCTACTAGTGCATGACCATC	Радченко и др., 2009; Radchenko et al., 2009

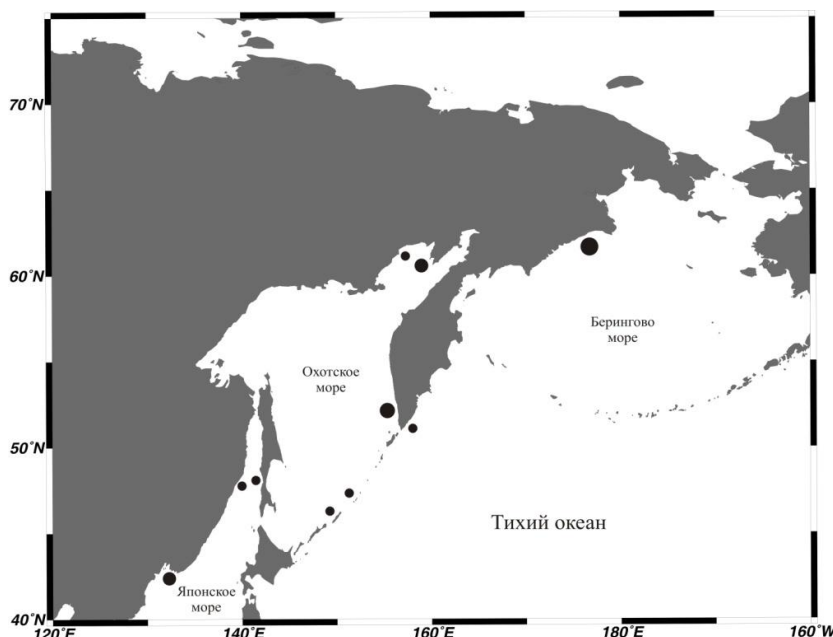


Рис. 11. Карта района дальневосточных морей с указанием (точками) мест сбора материала. Объём точки указывает на относительный вклад станции в общую численность выборки (схематично).

Формирование матрицы последовательностей и филогенетический анализ

На основе последовательностей 2 генов была собрана суперматрица длиной 2281 п.н. Недостающие данные были закодированы как «missing data». Одновременный расчет партиций и оптимальных моделей нуклеотидных замещений был выполнен в программе PartitionFinder (Lanfear et al., 2012, 2014). Наиболее подходящей моделью для первой и второй позиций кодонов в матрице являлась GTR+G+I, для третьей – GTR+G (параметры оптимальной схемы: BIC=59638.7126375, lnL= -27271.54066). Байесовский анализ (BI) был проведен в MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012) на платформе CIPRES Science Gateway V. 3.1 (Miller et al., 2010). Поиск топологии деревьев и маргинальных значений апостериорной вероятности был проведен путем запуска 4 цепей Маркова в 2500000 поколений. Частота выборок алгоритмом Метрополис из распределения вероятности параметров моделей и деревьев – 1 на 100 поколений. Апостериорная вероятность узлов ветвления рассчитана на основе 37491 деревьев после отбрасывания топологий, пришедшихся на стадию отжига (первые 25%). Поиск максимально правдоподобных деревьев (ML) был выполнен в RAxML 8.0 (Stamatakis, 2014). С помощью MEGA-6 проводили реконструкцию максимально правдоподобной (ML) и наиболее экономной (MP) топологий генных деревьев. Устойчивость топологий оценивалась по 50% консенсусу деревьев после генерации 1000 псевдовыборок бутстрепа как в ML, так и в MP.

Независимый анализ сходства топологий генных деревьев проведен по совокупности из 170 последовательностей одинаковой длины для каждого из двух генов, *Co-1* и *Cyt-b*. Для этих целей отдельно для обоих генов в BI-алгоритме были получены консенсусные деревья, и на их основе проведено сопоставление степени конгруэнтности топологий двух генных деревьев, представленных в виде тандельграмм, с использованием Dendroscope 3 (Scornavaca et al., 2011; Huson, Scornavacca, 2012). Также были сформированы и сопоставлены другие топологии двух генных деревьев; топологии и сравнения получены как для древовидных, так и сетевых реконструкций и различных подходов: multiple k-based, networks, cluster-based, LSA и др. Наиболее оптимальной моделью для совокупной матрицы из 170 последовательностей двух генов также оказалась GTR+G+I (BIC=71483, AIC=76594, lnL=-33440, I=0,5576, G=1,1143).

Результаты и обсуждение

При описании результатов за основу взята топология, полученная в байесовском анализе (рис. 12). Узлы, получившие поддержку менее чем в 50% бутстреп-реплик, а также апостериорная вероятность которых менее 50%, были коллапсированы. Прерывистой линией обозначены элементы топологии, либо не являющиеся значимыми, либо находящиеся вне консенсуса структуры деревьев VI, ML и MP. Видовые кластеры для удобства коллапсированы, поскольку поддержка для них во всех случаях составила не менее 99%.

Наибольшую определенность на высшем уровне иерархии представляет базальное положение внешней группы (*Hypoptychus dybowskii*) и последовательностей семейства Bathymasteridae. Порядок ветвления, согласно которому все бельдюговидные разделяются на 2 макрогруппы, существует только в VI-топологии и нивелируется политомией в других (ML и MP). Базальная позиция *Azygopterus corallinus* по отношению к Zoarcidae с последующим ответвлением *Neozoarces pulcher* также вне консенсуса. Более определённым по отношению к этому семейству является внешнее положение сем. Anarhichadidae. В составе последнего можно выделить четкое последовательное разделение подсемейств Zoarcinae, Gymnelinae и Lycodinae. Следует отметить низкую поддержку узла рода *Lycodes* и базальное положение в нем *Lycodes dyapterus*, в то время как остальные изученные представители рода образуют весьма компактную группу как внутри рода, так и внутри подсемейства.

Ещё одно объединение не имеет общего консенсуса (оценено только по данным VI и ML) и формирует общий кластер, включающий представителей семейства Pholidae и подсемейства Opisthocentrinae (сем. Stichaeidae). Кластер с хорошей поддержкой, но без четкого отношения к другим бельдюговидным, образует подсемейство Lumpreninae в составе формального семейства стихеевые. Остальные представители этого семейства (подсемейства Alectriinae, Stichaeinae и Chirolophinae) формируют совокупный неразрешенный кластер с парафилией в подсемействе Stichaeinae.

Информационной ёмкости оригинальной матрицы (2281 п.н.) недостаточно для разрешения филогении всего подотряда: отношения на уровне выше подсемейства скрыты в политомии. Это не удивительно, принимая во внимание тот факт, что однозначных результатов не удалось достичь даже при использовании более длинных или более разнообразных последователь-

ностей. Например, были использованы 2046 п.н., 3 митохондриальных гена (Радченко и др., 2009) 2530 п.н., 2 митохондриальных, 2 ядерных гена (Kwun, Kim, 2013); 3432 п.н., 3 митохондриальных, 2 ядерных гена (Radchenko et al., 2014a); 2110 п.н., 2 митохондриальных гена, 1 ядерный ген (Kim et al., 2014); 3406 п.н., 3 митохондриальных, 2 ядерных гена (Radchenko et al., 2014b). Учитывая данные обстоятельства, дополнительно реализована иная стратегия конструирования и сопоставления генных деревьев *Co-1* и *Cyt-b*, итоги которой частично представлены в виде сдвоенных дендрограмм или тандельграммы (Рис. 13).

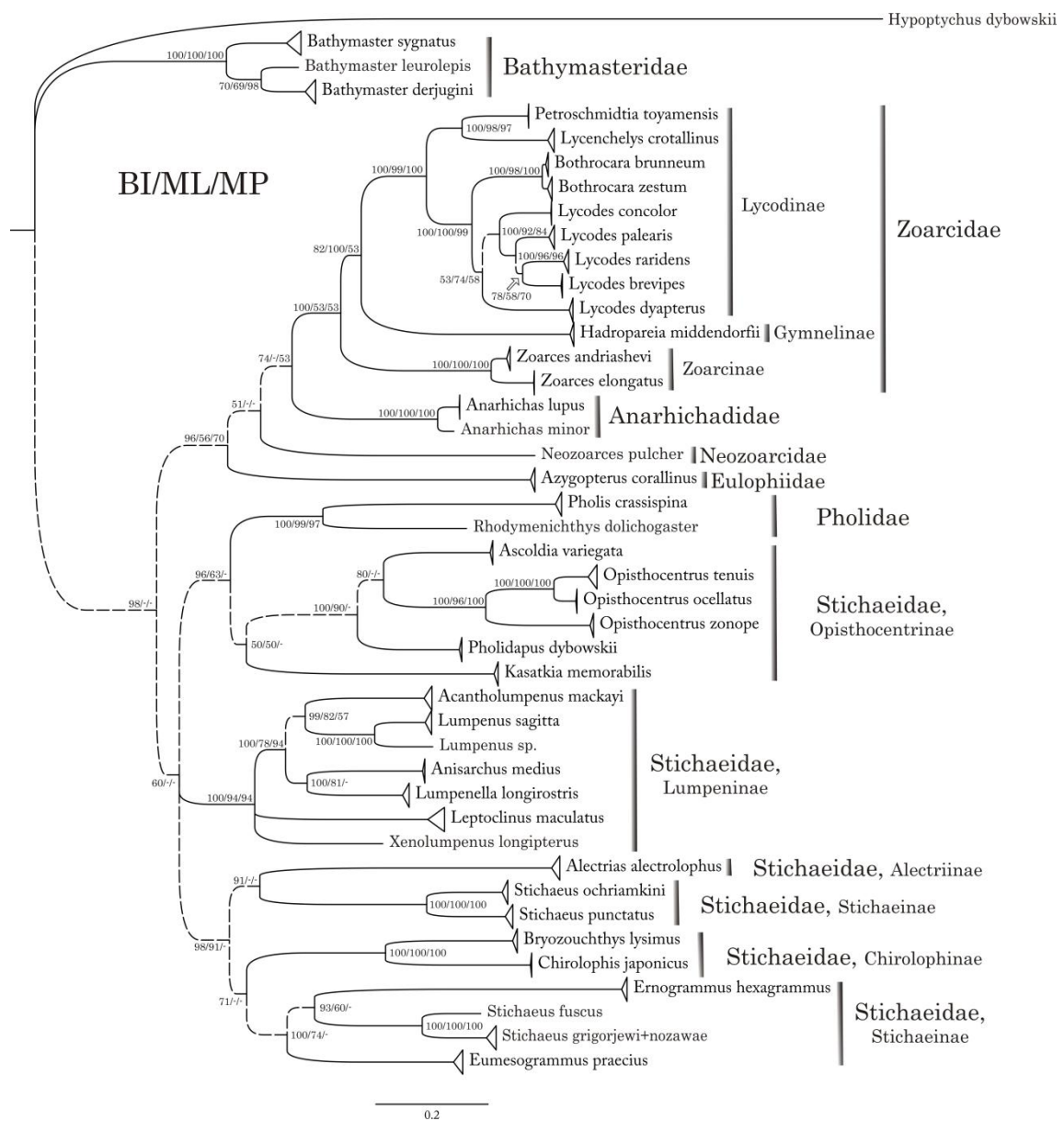


Рис. 12. Молекулярно-филогенетические отношения бельдюговидных рыб (Cottoidei: Zoarcales) на основе последовательностей 2 генов, *Co-1* и *Cyt-b*.

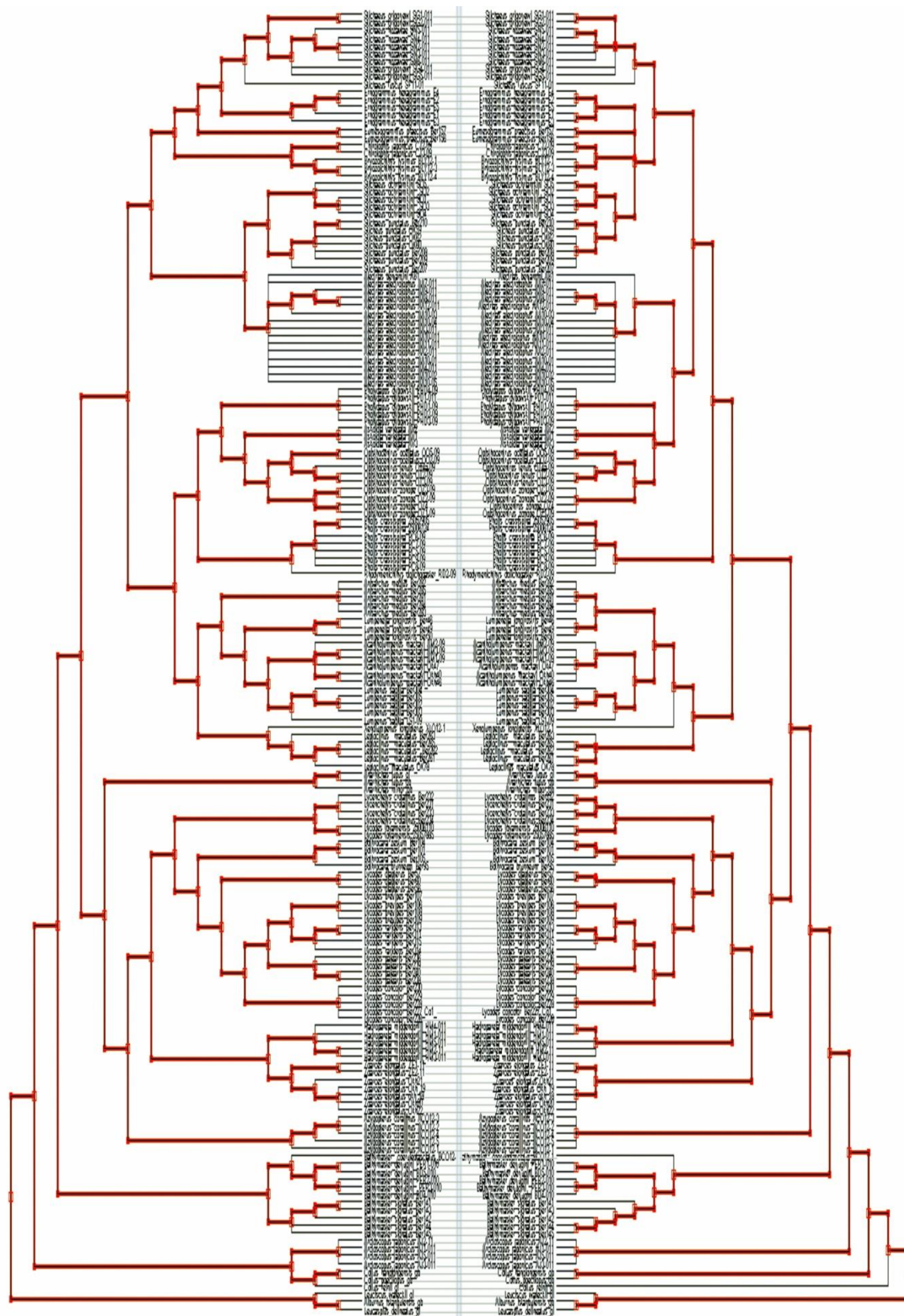


Рис. 13. Тандельграмма консенсусных деревьев генов Co-1 (слева) и Cyt-b (справа) бельдюговидных рыб (Cottoidei: Zoarcales), построенная на основе 170 последовательностей нуклеотидов каждого из генов. Жирными линиями выделены ветви нетерминальных таксонов.

Топологии деревьев двух генов показывают удовлетворительное соответствие. Таким образом, конгруэнтность полученных в работе топологий деревьев, построенных по двум генам, позволяет рассчитывать на дальнейший содержательный таксономический и филогенетический анализ.

Учитывая это, ниже приводится обсуждение наиболее интересных вопросов филогенетических реконструкций в систематике бельдюговидных с учетом как выше представленных собственных, так и литературных данных.

Bathymasteridae. Как известно, батимастеровые несут наиболее примитивные черты в подотряде Zoarcoidei: крупная ктеноидная чешуя и хорошо развитые брюшные плавники со специфическим строением мускулатуры (Stevenson, Matarese, 2005; Mecklenburg, 2003; Imamura, Yabe, 2002). Ранее на основе кладистического анализа морфологических признаков (Anderson, 1994; Imamura, Yabe, 2002), а также посредством молекулярно-филогенетических реконструкций (Радченко и др., 2009) было однозначно показано базальное положение семейства в подотряде. Таксономическая выборка при исследовании филогенетических отношений представителей Bathymasteridae обычно не выходит за рамки рода *Bathymaster* (Радченко и др., 2009; Radchenko et al., 2014 a,b; Kwun, Kim, 2013), с небольшим исключением (Turanov et al., 2012), хотя этот недостаток неразрывно связан с качеством рассмотрения филогении всего подотряда и в целом таксонов достаточно высокого ранга (Hillis, 1998). В свете наших данных базальное положение батимастеровых рыб неоспоримо, что хорошо согласуется с цитированными выше источниками. Однако отношения внутри семейства ещё предстоит рассмотреть с большей детализацией.

Zoarcidae. Топология ветви подсемейства Lycodinae, в которой роды *Lycenchelys* и *Petroschmidtia* выступают примитивными, а *Bothrocara* + *Lycodes* – продвинутыми узлами, в целом соответствует схеме, представленной ранее (Radchenko et al., 2012a), однако в выборке цитируемой работы отсутствовал род *Petroschmidtia*, а сестринское положение родов *Bothrocara* и *Lycodes* не обсуждалось. В то же время, согласно мнению Андерсона (Anderson, 1994), род *Lycodes* является наиболее примитивным в подсемействе. Кроме того, последний автор не считал самостоятельным род *Petroschmidtia*, рассматривая его представителей в качестве синонима *Lycodes*. Формирование общей ветви *Lycenchelys* и *Petroschmidtia* в нашем представлении отвергает это. Самостоятельность рода была также подтверждена при использовании молекулярно-генетических и морфологиче-

ских данных (Radchenko et al., 2009; Saveliev, 2012). Анализ родственных отношений внутри рода *Lycodes* проводился с использованием комплексных подходов (Møller, Gravlund, 2003; Radchenko et al., 2009), но сравнение ранее полученных результатов с представленными оригинальными данными несколько затруднены в связи с мозаичностью выборки представителей и признаков. В отличие от нашей схемы, в работе Меллера и Гравлунда (Møller, Gravlund, 2003) предковое положение на филогенетическом древе занимает *L. concolor*. Обнаруженное же авторами базальное положение подсемейства Gymnelinae по отношению к подсемействам Lycodinae и Zoarcinae противоречит другим предложенным схемам (Anderson, 1994; Radchenko et al., 2009, 2012b), в которых Gymnelinae более близки Zoarcinae. Консенсус в отношениях на уровне подсемейств Zoarcidae вносит положение Lycodinae, которое всегда выступает в качестве наиболее продвинутого таксона. Мозаичность таксономической представительности и выборки маркеров в доступных на сегодня работах не позволяет дать объективное заключение в отношении Gymnelinae и, ввиду наличия противоречивых схем, ставит под сомнение его монофилетичность в современном составе.

Neozoarcidae, Eulophiidae and Anarhichadidae. Являясь таксономически бедными группами и представленными филогенетически длинными ветвями, эти семейства в молекулярно-филогенетических реконструкциях некоторое время занимали одинаково неопределённое положение в отношении сем. Zoarcidae.

Таксоны Neozoarcidae и Eulophiidae, ранее входившие в состав сем. Stichaeidae, были повышены в статусе до самостоятельных семейств, что в свете хорошей воспроизводимости молекулярно-филогенетических схем оправдывалось главным образом через наличие у этих таксонов конвергентно возникших признаков, общих со стихеевыми (Radchenko et al., 2010a, 2012a,b, 2014a). Ненадёжность оригинальной топологии в разрешении узлов высокой иерархии, в представленных авторами филогениях, не позволяет объективно судить об истинном характере взаимоотношений Neozoarcidae, Eulophiidae и Anarhichadidae. Однако в этом вопросе можно с успехом сослаться на данные Радченко с коллегами (Radchenko et al., 2014a,b), где однозначно показано, что Eulophiidae – это сестринское к бельдюговым семейство, а Neozoarcidae и Anarhichadidae – базальны по отношению к нему.

Вопрос о систематическом положении *Neozoarces* ранее поднимался неоднократно. Макушок относил его вместе с родом *Zoarchias* к семейству бельдюговые (Макушок, 1961) в составе подсемейства Neozoarcinae. Андерсон переместил этот род в семейство стихеевые (Anderson, 1994) на основании наличия у тех колючих шипов в передней части спинного и начале анального плавников. Позднее с использованием молекулярно-генетических методов было продемонстрировано, что *Neozoarces* не только не входит в состав семейства стихеевые (Радченко и др., 2009), но и занимает обособленное положение по отношению к бельдюговым (Radchenko et al., 2010a; Kwun, Kim, 2013), претендуя, таким образом, на статус самостоятельного семейства. Новые данные (Radchenko et al., 2014a, b) также указали на его близость к Zoarcidae. Описанное в ходе комплексного исследования Stichaeoidei, подсемейство Azygopterinae (Макушок, 1958) считалось до недавнего времени младшим синонимом подсемейства Neozoarcinae. Дело в том, что Андерсон, вынося из состава семейства Zoarcidae группу Neozoarcinae, включил в неё также Azygopterinae и Eulophiinae. Земнухов (Zemnukhov, 2012) восстановил Azygopterinae в ранге самостоятельного подсемейства в семействе Stichaeidae, включив в него также обнаруженный недавно в российских водах род *Leptostichaeus* (Zemnukhov, Saveliev, 2011). Позже были выявлены значительные генетические отличия этого таксона от стихеевых рыб, а также большая близость его к группе семейств Zoarcidae, Neozoarcidae и Anarhichadidae (Radchenko et al., 2012b). Кван и Ким (Kwun, Kim, 2013), рассмотрев филогению подотряда, указали, во-первых, на однозначную самостоятельность семейства Neozoarcidae, а во-вторых, на необходимость выделения Eulophiidae с родом *Eulophias* в его составе. Следуя схеме обоснования по новым данным (Radchenko et al., 2014b), *Azygopterus* весьма близок к *Eulophias* и *Leptostichaeus*, что позволяет объединить все 3 рода в составе самостоятельного семейства Eulophiidae подотряда Zoarcoidei. Наши данные ввиду отсутствия в выборке родов *Eulophias* и *Leptostichaeus*, хотя и менее информативны, не отрицают этих заключений.

Stichaeidae. В отличие от обсуждаемых выше семейств данный таксон в молекулярно-филогенетических реконструкциях не формирует монофилетической группы (однако, см. Kartavtsev et al., 2009a), являясь наиболее неоднородным в подотряде как с позиции молекулярной филогенетики (Радченко и др., 2009; Turanov et al., 2012), так и на основе классических пред-

ставлений (Макушок, 1958). Его систематическое положение и таксономический состав – наиболее сложный вопрос в отношении подотряда.

Объединение *Opisthocentrinae* и *Pholidae* не согласуется с классическими представлениями о системе этих таксонов (Макушок, 1958; Yatsu, 1981; Mecklenburg, 2003; Nelson, 2006). Но воспроизводимость данной топологии молекулярной филогении (Kwun, Kim, 2013; Kim et al., 2014; Radchenko et al., 2014b) позволяет расширить границы понимания полифилетической природы стихеевых. Парафилетические отношения *Stichaeinae* и *Alectriinae*, а также объединение обоих с *Chirolophinae* и *Xiphisterinae* являются частью обычной схемы в молекулярно-филогенетических построениях внутри *Zoarcoidei* (Radchenko et al., 2009, 2014a,b; Kim, Kwun, 2013; Kim et al., 2014) и в итоге должны стать поводом для объективных таксономических перестроек.

Подсемейство *Lumpeninae* – естественная группа, обособление которой воспроизводится с высокой надежностью. Однако известны разногласия, проявляющиеся в разном положении (базальном либо более продвинутом) рода *Lumpenus*. Так, по данным морфологии (Макушок, 1958) и двух молекулярно-филогенетических (Radchenko et al., 2009; Kwun, Kim, 2013) реконструкций, род *Lumpenus* считается базальным, в то время как наши данные и схема коллег (Kim et al., 2014) указывают, что он таковым не является. Мы склоняемся к интерпретации собственных данных как объективных ввиду наличия в представленном нами материале и в работе Кима с коллегами (Kim et al., 2014) более репрезентативной таксономической выборки.

Анализ собственных и литературных данных показывает, что наиболее уязвимым местом современных молекулярно-филогенетических реконструкций бельдюговидных рыб является возможность разрешения отношений на уровне номинальных семейств. Причина здесь скрывается как в недостатке информационной ёмкости последовательностей, так и в мозаичности и представительности таксономической выборки. В течение некоторого времени при опоре на данные палеонтологии и молекулярной филогенетики (Nazarkin, 1998; Радченко и др., 2009; Radchenko et al., 2010a,b) прогрессивным считалось мнение о том, что подсемейства в составе стихеевых заслуживают статуса самостоятельных семейств. Однако, недавнее появление более информативных матриц (Radchenko et al., 2014a,b; Kim et al., 2014) позволило добиться разрешения, которое не допускает настолько однозначных выводов. Так, с надёжной поддержкой

объединяются подсемейства *Stichaeinae*, *Chirolophinae*, *Alectriinae* и *Xiphisterinae*, представляя собой в таком составе отдельную естественную таксономическую единицу.

Дальнейшая разработка таксономических вопросов в подотряде немислима без объединения усилия разных научных коллективов с целью повышения репрезентативности выборки и увеличения филогенетической информативности матриц с применением методов мультилокусной филогеномики.

5. Молекулярная эволюция и современное состояние эволюционно-биологической парадигмы. Анализ данных дивергенции нуклеотидных последовательностей генов *Co-1* и *Cyt-b* мтДНК на различных таксономических уровнях

На основе базы данных по *p*-расстояниям и аналогичным мерам сопоставлена генетическая дивергенция популяций внутри вида (1) и в таксонах различного ранга, таких как подвиды, полувиды и близнецовые виды (2), виды внутри рода (3), виды различных родов в пределах семейств (4) и виды различных семейств внутри отряда (5) (рис. 14). Данные о величине *p*-расстояний для 20731 вида животных обнаружили различные и увеличивающиеся уровни генетической дивергенции последовательностей двух генов *Cyt-b* и *Co-1* в пяти сопоставленных группах. Средние, не взвешенные значения *p*-расстояний для 5 сопоставленных групп составили (%): *Cyt-b* (1) $1,38 \pm 0,30$, (2) $5,10 \pm 0,91$, (3) $10,31 \pm 0,93$, (4) $17,86 \pm 1,36$, (5) $26,36 \pm 3,88$ и *Co-1* (1) $0,89 \pm 0,16$, (2) $3,78 \pm 1,18$, (3) $11,06 \pm 0,53$, (4) $16,60 \pm 0,69$, (5) $20,57 \pm 0,40$. Были обнаружены также различия в уровне дивергенции между самими генами на пяти иерархических уровнях. Это согласуется с многочисленными данными, показывающими различные, не единообразные скорости эволюции этих и других генов и их регионов. Результаты анализа дивергенции нуклеотидов внутри видов и в таксонах животных различного ранга, во-первых, хорошо согласуются с предыдущими данными и выявляют стабильность общей закономерности, и, во-вторых, показывают, что видообразование в основном происходит в соответствии с географической моделью (тип D1) и что в животном мире преобладает филетическая эволюция. Последние утверждения в полной мере подтверждают базовые принципы биологической концепции вида (БКВ) и в целом неodarвинистскую трактовку видообразования и эволюции. Преобладание видообразования по типу D1 и БКВ не означает, что другие

способы отсутствуют, а другие концепции не правомерны. Имеется как минимум 7 различных способов видообразования. Идеи, каким образом можно распознавать различные способы видообразования, изложены ранее (Картавец, 2005, 2009; Kartavtsev, 2011a,b, 2015).

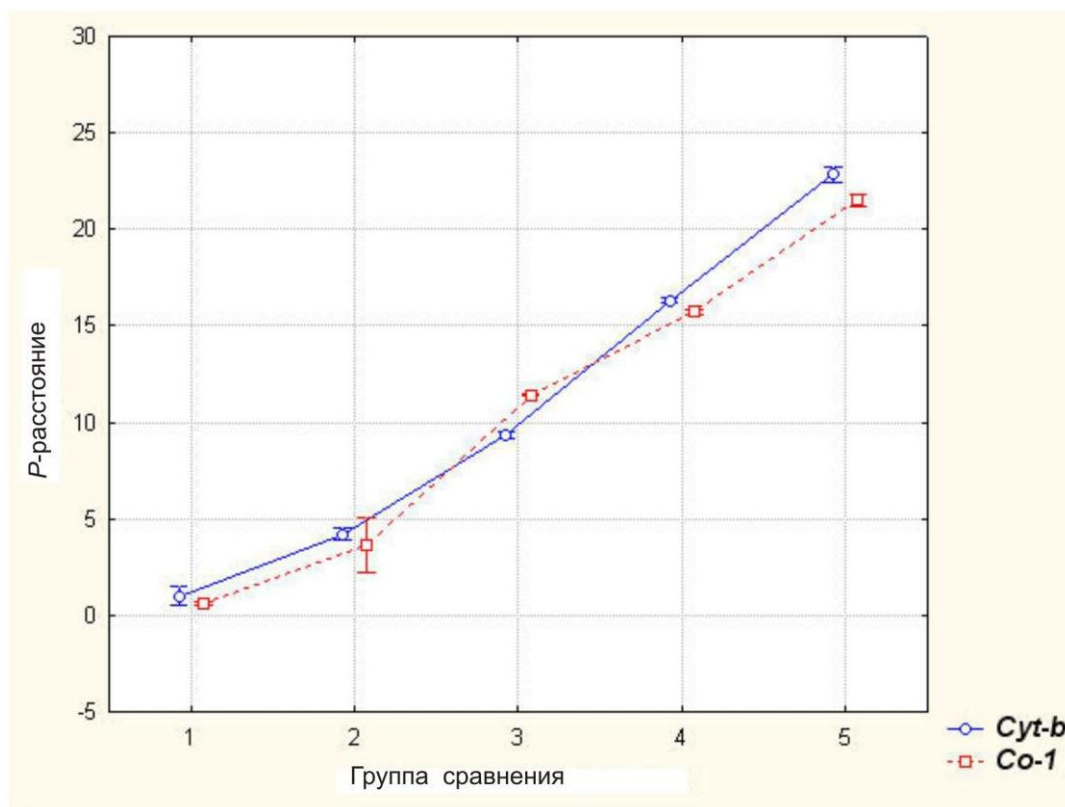


Рис. 14. График распределения средних p -расстояний (%) в пяти группах по генам *Cyt-b* и *Co-1* для разных сравниваемых категорий (типов таксонов) животных: сопоставлен 20731 вид (по Kartavtsev, 2011 a,b). 1 – внутривидовые, между особями одного и того же вида; 2 – между подвидами, полувидами и близнецовыми видами, между особями видов в стадии формирования, 3 – внутриродовые, между морфологически отличающимися видами одного рода; 4 – внутрисемейные, между родами одного семейства, 5 – внутриотрядные, между семействами одного отряда.

Эти данные, а также сведения, представленные в специальном обзоре (Kartavtsev, 2009), позволяют сделать вывод, что среди животных видообразование происходит преимущественно по географической модели. Это сочетается с аккумулярованием многочисленных мелких генных мутаций (замен нуклеотидов) в течение начальной и последующей фаз изоляции генофондов. Такого рода данные находят подтверждение для других групп животных и большего разнообразия сравниваемых категорий (Картавец, 2009, 2011a,b, 2013a,b, 2018; Birky, 2013; Hedges et al., 2015).

На основе теории множеств предложено развитие подхода (Картавец, 2009, 2011a,b), позволяющего классифицировать различные способы видообразования в генетических терминах, используя экспериментально определяемые дескрипторы. Эти и другие идеи, вместе с обзором литературы о молекулярно-генетической дивергенции по генам *Cyt-b* и *Co-I*, рассмотрены в обзорных статьях (Kartavtsev, 2009, 2011a,b) и широко представлены на различных конференциях и симпозиумах.

На основе новых обширных материалов доказано, что ДНК-штрихкодирование и по гену *Co-I*, и по гену *Cyt-b* является высокоэффективным в силу низкой внутривидовой и высокой межвидовой изменчивости этих маркеров.

Индекс ДНК-штрихкодирования, таксономический ранг и способы видообразования: примеры по рыбам

Решая поставленные в пяти разделах данной главы задачи, нельзя не уточнить сущность вида, о котором идет речь. В одном из первых определений в рамках БКВ принято считать: «**Вид** – это репродуктивное сообщество популяций (репродуктивно изолированных от других совокупностей), занимающее специфическую нишу в природе» (Mayr, 1982). Такое концептуальное понятие вида в рамках БКВ принято в работе как основа излагаемых фактов и идей, хотя оно ограничено главным образом только бисексуальными организмами и имеет несколько уточнений (Майр, 1968; Тимофеев-Ресовский и др., 1977; Templeton, 1998; Картавец, 2005). В целом можно перечислить по меньшей мере семь различных определений понятия «вид» (Simpson, 1961; Paterson, 1978, 1985; Wiley, 1981; Mayr, 1982; Crawcraft, 1983; Van Vallen, 1976; Templeton, 1998). Второе пояснение, ключевое для СТЭ, было сформулировано Бушем (Bush, 1975), который расширил известную идею Добжанского (Dobzhansky, 1955). В представленной статье Буш (Bush, 1975) обосновал ключевую роль процесса прекращения (разрыва) потока генов, который разъединяет исходный вид на две или более репродуктивно изолированные единицы, что ведет в дальнейшем к видообразованию. Можно даже заявить: если будут представлены неоспоримые доказательства, что возникновение вида и его эволюция возможны без прекращения потока генов между предковыми формами, а может происходить при существовании широкого генетического обмена, тогда, конечно, придется отвергнуть БКВ/СТЭ концепции. Анало-

гично, если существует и преобладает в природе модель видообразования, по которой новый вид может быть сформирован без долговременного разобщения генофондов родительской и дочерней форм, без возникновения репродуктивных изолирующих барьеров, тогда парадигмы БКВ/СТЭ должны быть заменены. Принимая концепции БКВ/СТЭ, также следует признать прямую связь между генетическим расстоянием (D) и временем (T), как это ясно сформулировано для белковых локусов (Nei, 1987), а позже расширено для любых молекулярных маркеров (Drummond, Bouckaert, 2015).

Эмпирические сведения о топологии генных деревьев, уровни генетической дивергенции между таксонами

Имеются различные типы генных деревьев, но большинство из них выглядят как монофилетичные или иногда парафилетичные (полифилетичные) дендрограммы. Прямые оценки конгруэнтности различных генных деревьев или ожидаемой топологии, скажем, видового дерева не часты, а когда выполняются, показывают варьирующие результаты, в диапазоне от хороших до отличных (Birky, 2013; Hedges et al., 2015; Turanov et al., 2017; Kartavtsev et al., 2017; см. также раздел 4). Неудовлетворительную «сходимость» топологии деревьев разных генов тоже можно наблюдать, но чаще это обусловлено информационными и технико-лабораторными возможностями реконструкции. Например, недостаточной информационной емкостью используемых последовательностей (малой длиной) при большом числе анализируемых операционных таксономических единиц (ОТЕ), неудачным подбором молекулярных маркеров для выявления филогенетического сигнала при реконструкции дерева и другими погрешностями работы. В связи со случайной сортировкой филетических линий по отдельным генам более подходящим подходом может быть использование митогеномов. Уточним попутно, что *операционной (операбельной) таксономической единицей исторически наименовали некоторые группы, предназначенные для анализа в нумерической систематике ("the thing(s) being studied"; Sneath, Sokal, 1973), представляющие в реальности отдельные организмы популяции, определенные таксономические группы, такие как виды и роды, которые обладают набором сходных признаков* (Бейли, 1970, с. 156). Обычно смысловое понимание ОТЕ задается для конкретного исследования.

Успешность конструирования филогенетических деревьев на основе полного митогенома продемонстрирована для 100 таксонов рыб (Miya et al.,

2003), а также для многих других групп и вариантов анализа, включая 13 белковых генов митогенома камбал (*Pleuronectiformes*; Kartavtsev et al., 2016) или карповых рыб (*Cypriniformes*, *Cyprinidae*) (Imoto et al., 2013; Kartavtsev et al., 2017) и для многих других таксонов рыб, чьи представительные выборки яДНК маркеров также были включены в анализ (Berendzen, Dimmick, 2002; Pardo et al., 2003, 2005; Saitoh et al., 2006; Mayden et al., 2009; Betancur-R, Orti, 2014; и многие другие). Сложный подход, с цифровым моделированием и использованием временных деревьев для большого числа подобранных генов-кандидатов (*candidate genes*) яДНК эукариот, из 2274 исследований, представляющих 50632 видов (образцов последовательностей) глобального древа жизни, обнаружил, что генетическая дивергенция увеличивается с увеличением ранга таксона (Hedges et al., 2015). Главные выводы из представленных материалов и преобладающего топологического сигнала генных деревьев таковы: (1) в большинстве деревьев имеются очевидные ветви(вь) внешней группы, (2) внутри таксонов ранга отряда основные ветви (узлы, кластеры) представлены семействами/подсемействами, (3) ниже в иерархии имеются отчетливые ветви, представляющие различные рода семейств, (4) имеются наборы наиболее близких ветвей, состоящие из единичных особей, которые классифицируются как образцы одного и того же вида. Некоторая доля деревьев содержит неясные внутривидовые и внутрисемейные кластеры, представляющие в большинстве случаев парафилии или полифилии внутри таксона, которые требуют объяснения (обычно, последние данные ведут к ревизии таксона в систематике).

Непростой вопрос, как быть со всем массивом этой информации? На текущий момент, к примеру, нет общего подхода для оценки числа ошибочных отнесений к одному кластеру или ошибок идентификации соседей по ОТЕ в генных деревьях, выбранных из исследований и представленных в источниках литературы. Соответственно, нет очевидных путей оценки степени ретикуляции или политомии внутри деревьев. Попытки найти общее решение для количественной оценки биоразнообразия предпринимались на основе нескольких методов в рамках инструментария ДНК-штрихкодирования (Bringloe et al., 2016; Kartavtsev, 2018; Stoeckle, Thaler, 2018), хотя каждая из цитированных работ сфокусирована на различных целях. Авторам известно четыре общих подхода для решения этой задачи: (1) на основе использования Пуассоновского древоподобного процесса (*Poisson Tree Processes*, РТР; Zhang et al., 2013), (2) по-

средством метода, схожего с РТР или коалесцентного подхода по генерализованной смешанной теории Юла (Generalized Mixed Yule Coalescent, ГМУС) (Fujisawa, Barraclough, 2013), (3) на основе сравнения бифуркаций в видовых деревьях, реконструируемых по последовательностям (Joly, 2012), и, наконец, (4) посредством ГМУС-подобной идеологии, K/θ -подхода (Birky 2013).

Например, имеются осложнения в интерпретации данных, генных деревьев *Co-1* и *Cyt-b* камбал, которые содержат внутривидовые парафилетические кластеры для родов *Hippoglossoides* и *Pseudopleuronectes* (Kartavtsev et al., 2016, Figs. 1,2), хотя для этих двух родов данный факт просто отражает неправильную морфологическую идентификацию некоторых образцов. Другими словами, приведенный пример иллюстрирует синонимию имен для одних и тех же видов, что уже обсуждалось (Kartavtsev et al., 2007c, 2016). Это один из вопросов, которые ДНК-штрихкоды помогают успешно разрешать. Возможны и другие проблемы ДНК-штрихкодирования, описанные для ряда таксонов, с акцентом на дождевых червях, среди которых по ДНК-штрихкодам выявлено криптическое биоразнообразие, но без четкого таксономического сигнала (Шеховцов и др., 2019). Этими и другими авторами также ставится вопрос в более широком контексте с диагностикой живых форм в слабо проработанных систематиках таксонах (Шеховцов и др., 2019; Stoeckle, Thaler, 2018). Чаще, однако, проблема идентификаций решается при более внимательном подборе молекулярных маркеров, созданием референсной библиотеки штрихкодов для конкретного таксона или рассматриваемой задачи и уточнения понимания вида в таксоне. Обнаруженные по молекулярным маркерам ошибочные классификации в пределах ОТЕ обострили проблему, которая была известна в систематике для специалистов, а именно – существование многочисленной синонимии имен (Bringloe et al., 2016; Wayne et al., 2017; Kartavtsev, 2018), и которая обычно провоцирует многочисленные таксономические ревизии. Другая очевидная проблема возникает из-за невозможности иногда различить таксономическую ошибку идентификации образца и реальную ложную кластеризацию, выполненную по молекулярным маркерам в генном или видовом дереве и вызванную генетической ретикуляцией. Особенно трудно эту задачу решить для таксонов, далеких от непосредственной компетенции авторов. Имеются и другие осложнения, например, несогласованность темпов эволюции и, как следст-

вие, несовпадение деревьев, полученных по маркерам мтДНК и яДНК (Wiens et al., 2010), наличие различий в темпах замен для разных генов, сортировка филогенетических линий, связанная с генетически эффективным размером популяций-основателей, и некоторые другие (Nei, 1987; Avise, 2000; Drummond, Bouckaert, 2015).

В данной работе предложен подход к обозначенной проблеме на основе молекулярных маркеров и базы данных BOLD (Kartavtsev, 2018). Предлагается найти решения и ответы на два вопроса: имеется ли согласованность 1) между молекулярными классификациями по данным ДНК-штрихкодирования, выраженным в значениях метрики BIN, и 2) образцами, классифицированными экспертами в систематике и также размещенными в BOLD (Kartavtsev, 2018)? Как отмечено ранее, Barcode Index Number (BIN), это присвоение каждому образцу уникального идентификатора (или специального индекса), позволяющего отнести вновь тестируемый образец к тому или иному таксону из базы BOLD. Значения BIN сейчас определены главным образом на основе последовательностей *Co-1*. То есть спецификация или кодирование OTE через BIN в BOLD выполнена в основном по *Co-1*. Но база пополняется быстро и другими маркерами. Значения BIN являются независимыми от предыдущих таксономических идентификаций образцов; то есть имеются два ряда независимых переменных, пригодных для сравнения. Иными словами, используя BIN, имеется возможность оценить соответствие между кластерами ДНК-штрихкодов и описаниями тех же образцов в базе данных, обозначенных в рамках традиционной систематики. Значения BIN могут выявлять согласие двух независимых классификаций (concordant classifications) или несогласованность классификаций (discordant classifications) в сопоставляемых массивах образцов в BOLD, что и составляет основу для статистической оценки степени сходства этих двух рядов данных. Поскольку получаемый сигнал относится к иерархическим древовидным реконструкциям, то можно говорить об их конгруэнтности.

В цитированной работе (Kartavtsev, 2018) проанализированы данные из BOLD, представленные тремя проектами, TZFPC (Steinke et al., 2009), FERU (Turanov et al., 2014) и SCFAA (McCusker et al., 2013), в которых таксономическая экспертиза обеспечена авторами представленных проектов. Именно эти данные по рыбам были выбраны для простоты работы, как наиболее близкие к профессиональным интересам авторов. Результаты анализа, проведенные по значениям BIN, выявили, что $81,4 \pm 2,3\%$ образ-

цов видов, $84,0 \pm 3,9\%$ образцов родов и $88,0 \pm 5,8\%$ образцов семейств (Kartavtsev, 2018) этих проектов BOLD согласовывались с предварительными зоологическими классификациями представленных в них таксонов рыб. Выяснилось, что даже для уровня семейства единственный молекулярный маркер *Co-1*, с неполной последовательностью нуклеотидов, хорошо подходит для идентификации образцов. Оказалось также, что нет значительных различий между тремя таксономическими уровнями (Kartavtsev, 2018, Table 1S), а данные из двух разных проектов статистически значимо не отличаются (Kartavtsev, 2018). Дополнительные детали этого анализа можно найти в цитированной работе и прилагаемых электронных материалах (Kartavtsev, 2018, Table 1S). В представленном анализе LOG-преобразованные численности всех значений BIN (переменная LOG-BIN ALL на Y-оси; образцы, определенные морфологически) и согласующиеся классификации среди значений BIN по *Co-1* (переменная LOG-BIN CONCORDANT на X-оси) показали положительно-пропорциональную изменчивость, которая хорошо аппроксимировалась уравнением линейной регрессии; результаты анализа справедливы для комбинированных данных из нашего собственного исследования и данных коллег FERU/TZFPС, а также только из литературных данных по проекту SCFAA. Коэффициент детерминации этой линейной зависимости составляет около $R^2 = 90\%$ ($r_p = 0,989$, $P < 0,001$, для наименьшего эффекта). Из информации, представленной ранее (Kartavtsev, 2018), и этих данных следует, что на уровне (4), выделенном ранее, все последовательности/особи одного и того же вида определяются в подавляющем большинстве случаев как кластеры одного вида, тогда как на уровне (3) различные виды классифицируются в отдельные роды, в согласии с традиционной таксономической практикой. Такой же вывод справедлив в отношении уровня (2), представленного образцами различных родов. Эти два типа ветвей на уровнях (3) и (4) ясно обособлены на основе любой из шкал генетических расстояний (Картавцев, Ли, 2006; Kartavtsev, 2009) и используются как одно из главных средств ДНК-штрихкодирования в iVOL и близких проектах. Исходя из изложенного материала теперь понятно, почему существует явное генеральное свойство формирования кластеров молекулярных маркеров, включая ДНК-штрихкоды по *Co-1*, которые представляют биологический вид. Имеются исключения из общего правила, когда вид представлен единой репродуктивной единицей. Исключения

включают прежде всего случаи с филогеографической подразделенностью видов, за счет достаточно изолированных подвидов (Avice, 2000). Существуют также ситуации, когда виды имеют общие или перекрывающиеся кластеры ДНК-штрихкодов вследствие сложной истории их формирования и интрогрессии мтДНК (Stoeckle, Thaler, 2018; Figs. 2,3; см. также дискуссию в разделе 2), что усложняет задачи идентификации. Возможны добротные, связанные с биологией, исключения из общей закономерности, приводящие к отсутствию дивергенции по молекулярным маркерам, например, при видообразовании не по географической модели (D1), с аккумулярованием мутаций-замен во время длительного существования в изоляции, а за счет регуляторных генных изменений, хромосомных трансформаций и т.п. (способы видообразования D3, T2-T4; Templeton, 1981).

Прежде, чем выполнить последующий анализ, в котором будут рассмотрены данные о генетических расстояниях, вычисленных на основе последовательностей молекулярных маркеров, обратимся еще раз к филогении на уровне семейств. Это весьма важный пункт. Наличие монофилии на этом уровне, особенно для таких обширных семейств камбалообразных рыб как Pleuronectidae, Soleidae и Bothidae, базовая информация для которых сегодня является морфолого-анатомической (см. FishBase; www.fishbase.org), имеет принципиальную значимость. К счастью, сравнительная информация для этих таксонов также получена и на основе молекулярной филогенетики (Berendzen, Dimmick, 2002; Martinez-Navarro et al., 2005; Pardo et al., 2005; Sharina, Kartavtsev, 2010; Betancur-R, Orti, 2014). Монофилия как минимум трех филетических линий (семейств) в пределах Pleuronectoidei исходно базировалась на данных *12S* рДНК и *16S* рДНК (Berendzen, Dimmick, 2002) и *16S* рДНК для нескольких семейств (Pardo et al., 2005), а позже дополнена данными для *Co-1*, *Cyt-b* и митохондриальному преимущественно для Pleuronectidae (Kartavtsev et al., 2016). Полное понимание филогении для последнего семейства развивается и недавно было пополнено молекулярными маркерами по нескольким генам мтДНК и яДНК (Betancur-R, Orti, 2014; Vinnikov et al., 2018), причем монофилия и отряда по некоторым данным выглядит достаточно убедительно (Betancur-R, Orti, 2014; Kartavtsev et al., 2016). Некоторые осложнения, как например присутствие парафилии в подсемействе Pleuronectinae и в роде *Limanda*, которые были недавно установлены на основе личиночной морфологии и молекулярно-филогенетических данных, очевидно неизбежны (Roje, 2010;

Kartavtsev et al., 2016). Есть сообщение о межвидовой гибридизации некоторых таксонов камбал Европы (Kijewska et al., 2009). Однако пока не ясно, есть ли парафилия даже для этих таксонов, или, может быть, политомию следует отнести к неадекватности морфологических признаков для идентификации, а не к гибридизации и формированию полностью гибридных популяций (и потенциальных таксонов) в зоне последнего исследования на Балтике, а также в соседних бассейнах Европы. Хотя подобные ситуации здесь и не исключены, как отмечено, например, для мидий в этом регионе (Väinölä, Strelkov, 2011; Smietanka et al., 2014).

Другой таксон, карпообразные рыбы (Cypriniformes), был подвергнут генетико-биохимическим и молекулярно-филогенетическим исследованиям даже более интенсивно, чем камбалы (Hanzawa et al., 1984; Kartavtsev et al., 2002; Saitoh et al., 2006, 2010; Miya et al., 2006; Sakai et al., 2006; Семина и др., 2006; Sasaki et al., 2007; Mayden et al., 2009; Батищева и др., 2011; Imoto et al., 2013; Kartavtsev et al., 2017; и многие другие). Для этих рыб, вопреки многочисленным находкам гибридов, существованию полиплоидных форм и предположениям о видообразовании посредством гибридизации (Saitoh et al., 2010; Yang et al., 2015), имеющиеся данные для деревьев отдельных генов и митогеномов указывают на отсутствие преобладания ретикулярной эволюции. Деревья имеют, как правило, бифуркационный тип и монофилию подавляющего большинства ветвей таксонов. Конечно, определенные проблемы в молекулярной систематике этого весьма разнообразного таксона существуют. Они будут возникать и далее при конструировании больших деревьев и их сравнении с небольшими деревьями. Например, было обнаружено, что большие генные деревья ельцов *Leuciscinae* имеют гораздо меньшую конгруэнтность по оценке на основе *Dendroscope*, по сравнению с небольшими деревьями (Kartavtsev et al., 2017). Однако очевидно, что это лишь требует увеличения информационной емкости сигнала для лучшего разрешения топологии.

Кроме упомянутых имеются сведения, противоречащие изложенным выше данным, которые поддерживают наличие ретикуляций в топологии деревьев. Подобный сигнал обнаружен в деревьях, построенных для таксонов из гибридных зон, как это недавно документировано для комплекса *Mytilus* ex. gr. *edulis* (например, Smietanka et al., 2014; Zbawicka et al., 2014, 2018). Комплексы богатой разнообразием тропической и неотропической фауны также представляют примеры ретикуляций (Nevado et al., 2011; Ре-

reira et al., 2013). В уже цитированном обзоре (Arnold, Fogarty, 2009, Table 1) имеются 17 находок филогенетических расхождений. Однако эти факты не опровергают главный сигнал, свидетельствующий о преобладании бифуркаций и монофилии в генных деревьях, а также способность ДНК и других молекулярных маркеров идентифицировать таксоны рыб с точностью более 80% (Pereira et al., 2013; Turanov et al., 2014; Kartavtsev, 2018; настоящая работа). Доказательства, базирующиеся на ДНК-штрихкодировании, основанные на обширных материалах BOLD, поддерживают эти заключения для верхних иерархических уровней, до родового уровня (на что преимущественно и ориентирована программа iVOL). Однако приведенные выше факты неожиданно доказывают распространение этого сигнала и до уровня семейства. Хорошее соответствие топологического сигнала генных деревьев по данным ДНК-штрихкодов (то есть для неглубоких филогений) и существующих таксономических иерархий недавно продемонстрировано для нескольких филумов, включая Chordata, Arthropoda, Mollusca, Echinodermata, представляющих 75% всех описанных видов этих таксонов (Stoeckle, Thaler, 2018).

Как предполагалось ранее, обратимся к данным о генетических расстояниях и их соответствию рангам эволюционной дивергенции. Один набор такой информации был суммирован для двух генов мтДНК *Co-1* и *Cyt-b* ранее в начале раздела 5 (см. рис. 14) и в публикациях (Kartavtsev 2009, 2011a,b, 2013a, 2015, Chapter 7). Эти данные будут приобщены к выводам, приведенным ниже. В сводке приведены новые данные, которые показывают изменчивость мтДНК для гена *16S* рРНК и полного митогенома животных в иерархии таксонов или групп сравнения (рис. 15 А, Б). Последовательности *16S* рРНК длиной после выравнивания 191–444 п.н. видов животных извлечены из базы данных GenBank, 01.05.2018 и подвергнуты выравниванию в программном пакете MEGA-6 (Tamura et al., 2013). Затем в этом же программном пакете авторами были рассчитаны попарные *p*-расстояния для двух выборок размером 6673 и 693 особей соответственно для первой и второй половины последовательностей всего исходного набора (набор 1 и набор 2); данная процедура понадобилась ввиду невозможности выполнить выравнивание одновременно из-за слишком больших различий последовательностей в исходном файле GenBank. После этого в программном пакете Statistica-6 с помощью однофакторного дисперсионного анализа проведено сравнение изменчивости внутри и между сравниваемыми группами (рис. 15, А). Анализ 7459

последовательностей полного митогенома животных, со средней длиной 15173 п.н. (данные GenBank, 13.02.2006–27.04.2018, длина: 15667, 15347, 14761, 16117, 13974 п.н.) выполнен примерно в такой же последовательности. Однако расчеты p -расстояний ввиду больших массивов данных первоначально выполнены по отдельности для каждой из групп сравнения, а затем сведены в общую таблицу для всех групп, на основе которой затем проведен однофакторный дисперсионный анализ в Statistica-6 (рис. 15, Б). Учитывая отклонения от нормального распределения вариационных рядов p -расстояний (хотя для представленных файлов они одномодальны и пригодны для этого анализа), дополнительно выполнен непараметрический дисперсионный анализ по Крускалу–Уоллису, сверх параметрического теста ANOVA, проиллюстрированного на рис. 15. Это тестирование подтвердило значимость различия сравниваемых групп как для последовательностей гена *16S* рРНК, так и для последовательностей митогенома.

Табличные материалы для уточнения подробностей расчетов могут быть представлены авторами для заинтересованных читателей по запросу. Данные о генетических расстояниях внутри видов и в иерархии таксонов, убеждают в том, что в большинстве исследованных филумов имеется зависимость между p -расстоянием и рангом таксона, которая близка к линейной, с минимальными величинами в группе сравнения 1 (внутри видов). Как следует из полученных данных, видовые кластеры на огромном массиве данных ДНК-штрихкодов отчетливо выделяются не только по отдельным генам, но и по митогеномам в целом (рис. 15, Б; Stoeckle, Thaler, 2018). Есть также исключения из этого правила, когда разрывы между видовыми кластерами минимальны или отсутствуют вовсе (Turanov et al., 2014; Kartavtsev et al., 2017; Stoeckle, Thaler, 2018). В основном такие случаи относятся к таксонам, не достигшим видového уровня (подвиды, полуви́ды или молодые виды), но могут быть также обусловлены присутствием видов (форм), не формирующих репродуктивных единиц, размножающихся половым путем, то есть видов, не подпадающих под БКВ, которые могут возникать в результате генетической трансформации, не затрагивающей или мало влияющей на структурные гены (Картавцев, 2009, 2013; Kartavtsev, 2009, 2011a,b, 2013a), как это уже было отмечено выше. Известны также примеры значительной вариабельности скорости молекулярной эволюции для таксонов одного ранга в различных филумах, которые могут затруднять применимость генетических расстояний (Avisе,

Aquadro, 1982; Avise, 2000; Картавцев, 2009, 2013; Kartavtsev, 2009, 2011a,b, 2013a). Поэтому универсальность ДНК-штрихкода и шкалы генетических расстояний не является абсолютной, что не вполне осознается в некоторых обобщениях по ДНК-штрихкодированию (Stoeckle, Thaler, 2018). Выходом служит создание алгоритмического инструментария и программных средств более универсального подхода, учитывающего необходимость использования различных мер генетической дивергенции и изменчивости, с использованием нескольких генотипических дескрипторов, а также фенотипических идентификаторов (Картавцев, 2009, 2013; Kartavtsev, 2009, 2011a,b, 2013a, 2015).

Обобщая все полученные данные, можно сформулировать три главных вывода:

Вывод 1. Диагностика видов является высокоэффективной в силу низкой внутривидовой и высокой межвидовой изменчивости используемых молекулярных маркеров (рис. 14, группы 1 и 2, рис. 15, группы 1 и 3), что обнаруживается как на уровне маркеров отдельных генов мтДНК (*Co-1*, *Cyt-b* и *16S* рДНК), так и на уровне полных митогеномов. Это заключение применимо к широкому спектру таксонов животных, для которых есть определенная концептуальная ясность, что такое вид.

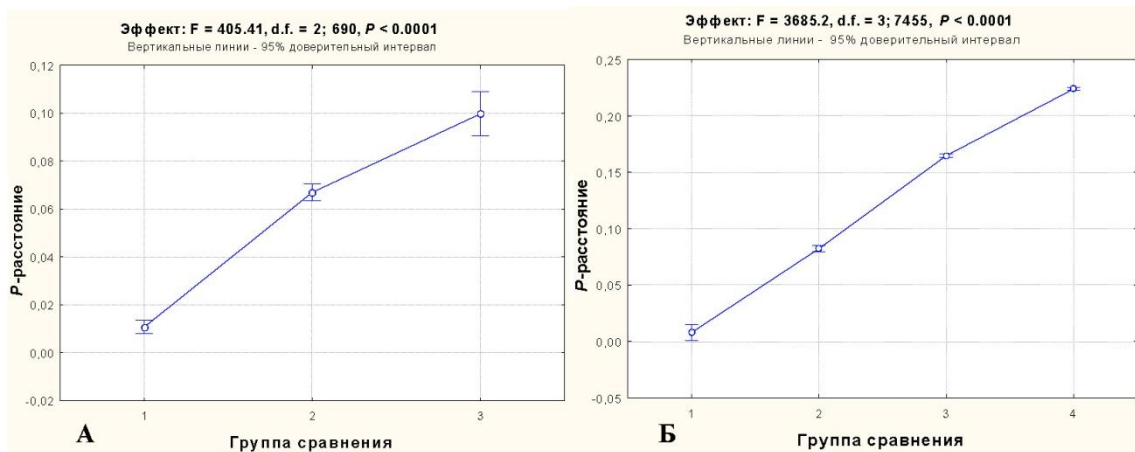


Рис. 15. Однофакторный дисперсионный анализ, показывающий изменчивость средних значений p -расстояний для групп сравнения сопоставленных последовательностей *16S* рРНК и митогеномов животных (по: Картавцев, Редин, 2019). А. Данные анализа последовательностей *16S* рРНК животных второго набора последовательностей (данные GenBank, 01.05.2018; см. пояснения в тексте). Б. Данные анализа последовательностей полного митогенома животных (GenBank, 13.02.2006–27.04.2018). Группы сравнения: 1 – особи одного вида, 2 – особи различных видов одного рода, 3 – особи различных родов одного семейства, 4 – особи различных семейств одного отряда.

Вывод 2. Положительная связь расстояния и ранга таксона, с минимумом на внутривидовом уровне, доказывает, что видообразование в основном происходит в соответствии с географической моделью (тип D1), а в животном мире преобладает филетическая эволюция. Последние утверждения в полной мере подтверждают базовые принципы БКВ и в целом неodarвинистскую трактовку видообразования и эволюции.

Вывод 3. Из представленных материалов следует, что альтернативные модели видообразования (D3, T2-T4 и др.) редки в природе. В противоположном случае, то есть если в природе реализуется множество равновероятных способов видообразования, распределение расстояний, ранжированных по таксонам, имело бы равномерный вид или слабый наклон. Очевидно, что представленный анализ и другие доказательства опровергают такую возможность. Однако это не значит, что альтернативных способов нет или они менее важны. Подтверждается справедливость известного положения, что дарвиновская эволюция, дающая наблюдаемое разнообразие живых форм, преобладает во времени, но кардинальные генетические трансформации, хотя и редко возникающие в эволюции, ведут к ароморфозам и дают принципиальные новации живой материи. Хотя это дискуссионный вопрос, который не нашел еще надежного фактического обоснования.

Благодарности

Исследования, представленные в главе 4, были также частично выполнены при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-34-00144) и гранта ДВО 18-4-040.

Список литературы

Антонов А.С., Белозерский А.Н. Сравнительное изучение нуклеотидного состава дезоксирибонуклеиновых кислот некоторых позвоночных и беспозвоночных животных // Докл. АН СССР. 1961. Т. 138. С. 1216–1220.

Антонов А.С., Мирошниченко Г.П., Слюсаренко А.Г. Данные о первичной структуре ДНК в систематике растений // Успехи соврем. биол. 1971. Т. 74. С. 247–261.

Баасанжав Г., Дгебуадзе Ю.Ю., Демин А.К. и др. Обзор видов ихтиофауны МНР // Рыбы Монгольской Народной Республики. М.: Наука, 1983. С. 102–224.

Баасанжав Г., Дгебуадзе Ю.Ю., Демин А.Н. и др. Рыбы Монгольской Народной Республики. Экология и хозяйственное значение рыб МНР. М.: Наука, 1985. С. 9–174.

Батищева Н.М., Картавцев Ю.Ф., Богуцкая Н.Г. Филогенетический анализ рода *Oreoleuciscus* (Pisces, Cyprinidae, Leuciscinae), основанный на исследовании нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы 1 (*Co I*) // Генетика животных. 2011. Т. 47, № 10. С. 1335–1345.

Бейли Н. Математика в биологии и медицине. М.: Мир, 1970. 326 с.

Берг Л.С. Фауна России. СПб.: Изд-во Академии наук. Т. 3. Вып. 1. 1912. 336 с.

Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Ч. 2. 4-е изд. М.; Л.: АН СССР, 1949. С. 925.

Богуцкая Н.Г. Морфологические основы системы карповых рыб подсемейства Ельцовых (Leuciscinae, Cyprinidae) // Вопр. ихтиологии. 1990. Т. 30, № 6. С. 920–933.

Богуцкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2004. 389 с.

Богуцкая Н.Г., Кияшко П.В., Насека А.М., Орлова М.И. Определитель рыб и беспозвоночных Каспийского моря. Т. 1. Рыбы и моллюски. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК. 2013. 543 с.

Борисовец Е.Э., Дгебуадзе Ю.Ю., Ермохин В.Я. Морфометрический анализ алтайских османов (*Oreoleuciscus*; Pisces, Cyprinidae) водоемов МНР: многомерный подход // Зоол. журн. 1985. Т. 64, вып. 8. С. 1199–1212.

Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н. Гибридизация, видообразование и систематика животных // Труды Зоологического института РАН. Приложение № 2. 2013. С. 83–139.

Брыков Вл.А., Полякова Н.Е., Семина А.В. Филогенетический анализ выявляет два периода дивергенции у крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis* (Pisces, Cyprinidae) // Генетика. 2011. Т. 47, № 11. С. 1491–1500.

Брыков Вл.А., Полякова Н.Е., Семина А.В. Сравнительный анализ изменчивости митохондриальной ДНК у четырех видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) // Генетика. 2013. Т. 49, № 3. С. 355–365.

Васильева Е.Д. О таксономическом статусе некоторых форм рода *Oreoleuciscus* (Cyprinidae) // Вопр. ихтиол. 1985. Т. 26. С. 196–211.

Варнаховский Н.А. Монография нового рода карповых рыб (*Oreoleuciscus*). СПб.: Императорская академия наук. 1889. 79 с.

Винников К.А., Иванков В.Н., Пупрук Д.Л. Таксономический статус японской лиманды *Pseudopleuronectes yokohame* и лиманды Шренка *P. schrenki* (Pleuronectidae, по: Cooper, Chapleau, 1998) // Вопр. ихтиол. 2006. Т. 46, № 3. С. 316–325.

Воронцов Н.Н. Синтетическая теория эволюции: ее истоки, основные постулаты и нерешенные проблемы // Журн. всесоюзн. хим. Общества. 1980. Т. 25, № 3. С. 295–314.

Гавренков Ю.И., Иванков В.Н. Таксономический статус и биология дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* Южного Приморья // Вопр. ихтиологии. 1979. Т. 19, № 6. С. 1014–1023.

Гавренков Ю.И., Свиридов В.В. Экология размножения дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* в бассейнах рек Приморья // Чтения памяти В.Я. Леванидова. Вып. 1. Владивосток: Дальнаука, 2001. С. 296–304.

Гафуров Ю.М. Дезоксирибонуклеазы. Методы исследования и свойства. Владивосток: Дальнаука, 1999. 230 с.

Гриценко О.Ф. Систематика дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Cyprinidae) *Leuciscus brandti* (Dybowskii) (Cyprinidae) // Вопр. ихтиологии. 1974. Т. 5, № 88. С. 782–795.

Гриценко О.Ф. Проходные рыбы острова Сахалин (систематика, экология, промысел). М.: Издательство ВНИРО, 2002. 248 с.

Дгебуадзе Ю.Ю., Рябов И.Н. К биологии алтайских османов // География и динамика животного и растительного мира МНР. М.: Наука, 1978. С. 174–182.

Егоров А.Г., Жамсаран М. Карликовый алтайский осман *Oreoleuciscus uspotanini* (Kessler) из озера Убсу-Нуур // Докл. высш. школы. Биол. науки. 1961. Т. 2. С. 42–43.

Жохова Е.В., Родионов А.В., Пovyдыш М.Н. и др. Современное состояние и перспективы использования ДНК-штрихкодирования и ДНК-фингерпринтинга для анализа качества лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов // Успехи соврем. биол. 2019. Т. 139, № 1. С. 25–40.

Заславская Н.И., Скурихина Л.А., Панькова В.В., Рязанова И.Н. Методы генетических исследований морских организмов: учебно-методическое пособие к спецкурсу «Методы генетических исследований» / ИБМ ДВО РАН, ДВГУ. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2009. 160 с.

Золотова А.О., Картавец Ю.Ф. Анализ дивергенции последовательностей участка митохондриальной (Co-1 и Cyt-b) и ядерной (Rho и ITS-1 – 5.8S – ITS-2) ДНК трёх видов рода *Tribolodon* (Cypriniformes, Cyprinidae) юга Приморья и острова Сахалин // Материалы Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам. Владивосток: Дальневост. федерал. ун-т, 2017. С. 215.

Иванков В.Н., Лукьянова П.Е., Мостовая Н.В., Рухлова Г.Ф. Таксономическое значение морфологических признаков двух видов дальневосточных красноперок // Биол. моря. 1984. № 3. С. 29–32.

Иванков В.Н., Лукьянов П.Е., Мостовая Н.В. Гибридизация двух близких видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Cyprinidae) // Гидробиол. журн. 1987. Т. 23, № 3. С. 35–39.

Иванков В.Н., Каплуненко В.А., Борисовец Е.Э., Золотова А.О. Методы диагностики морфологически и экологически близких видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Teleostei: Cyprinidae) по различиям структуры чешуи // Сборник всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Морские биологические исследования: достижения и перспективы», приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции. 2016. Т. 2. С. 73–76.

Картавец Ю.Ф. Молекулярная эволюция и популяционная генетика. Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2005. 234 с.

Картавец Ю.Ф. Молекулярная эволюция и популяционная генетика. Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2009. 280 с.

Картавец Ю.Ф. Генетическая дивергенция видов и других таксонов. Географическое видообразование и генетическая парадигма неodarвинизма в действии // Успехи соврем. биол. 2013. № 5. С. 419–451.

Картавец Ю.Ф., Свиридов В.В., Ханзава Н., Сазаки Т. Генетическая дивергенция видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) и близких таксонов // Генетика животных. 2002. Т. 38, № 9. С. 1–14.

Картавец Ю.Ф., Ли Д.С. Анализ нуклеотидного разнообразия по генам цитохрома *b* и цитохромоксидазы 1 на популяционном, видовом и родовом уровнях // Генетика. 2006. Т. 42, № 4. С. 437–461.

Картавцев Ю.Ф., Редин А.Д. Оценки генетической интрогрессии, ретикуляции генных деревьев, дивергенции таксонов и состоятельности ДНК-штрихкодирования по молекулярным маркерам генов // Успехи соврем. биол. 2019. Т. 139, № 1. С. 1–22.

Кафанова В.В. Материалы к систематике алтайских османов рода *Oreoleuciscus* Wapraschowsky // Вопр. ихтиол. 1961. Т. 1. С. 9–18.

Кимура М. *Молекулярная эволюция: теория нейтральности*. М.: Мир, 1985. 398 с.

Линдберг Г.У., Легеза М.Н. Рыбы Японского моря и сопредельных частей Охотского и Желтого морей. Ч. 2. М.; Л.: Наука, 1965. 391 с.

Майр Э. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир, 1968. 398 с.

Макушок В.М. Морфологические основы стихеевых и близких к ним семейств рыб (*Stichaeoidea*, *Blennioidei*, *Pisces*) // Труды ЗИН АН СССР. 1958. Т. 25. С. 3–129.

Макушок В.М. Группа *Neozoarcinae* и ее место в системе (*Zoarcidae*, *Blennioidei*, *Pisces*) // Труды Института океанологии АН СССР. 1961. Т. 43. С. 198–224.

Маляр В.В. Сравнительная филогеография четырех видов рыб семейств *Salmonidae* и *Surginidae* в Японском и Охотском морях: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2017. 27 с.

Манчин Э., Дгебуадзе Ю.Ю. Чужеродные виды рыб в монгольской части бассейна реки Селенги // Рос. журн. биол. инвазий. 2010. № 2. С. 89–96.

Незнанова С.Ю. Ультроструктурное исследование спермиогенеза дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (*Pisces*: *Cyprinidae*) // Биол. моря. 2012. Т. 38, № 2. С. 144–152.

Никольский Г.В. Частная ихтиология. М.: Советская наука, 1950. 428 с.

Омельченко В.Т., Полякова Н.Е., Иванков В.Н., Лукьянов П.Е. Генетико-биохимическая и морфологическая характеристика дальневосточных красноперок *Tribolodon brandti* (Dybowski), *Tribolodon hakonensis* (Gunther) (*Cyprinidae*) и их гибридного потомства // Вопр. ихтиол. 1986. Т. 26, № 2. С. 246–252.

Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая промышленность, 1966. 376 с.

Радченко О.А., Черешнев И.А., Петровская А.В., Баланов А.А. Молекулярная систематика и филогения бельдюговидных рыб подотряда *Zoarcoidei* // Вестник ДВО РАН. 2009. № 3. С. 40–47.

Рязанова И.Н., Полякова Н.Е. Дивергенция крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis* (Pisces: Cyprinidae) на российской части ареала по данным кариологического анализа и ПЦР-ПДФ-анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2012. Т. 48, № 2. С. 225–234.

Световидова А.А. Ревизия рода алтайских османов *Oreoleuciscus* Warp. (Pisces, Cyprinidae) // Вопр. ихтиол. 1965. Т. 5, вып. 2. С. 245–261.

Свиридов В.В. Морфологическая и генетическая дивергенция и географическая изменчивость дальневосточных красноперок рода *Tribolodon*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2002. 16 с.

Семина А.В., Полякова Н.Е., Брыков Вл.А. Генетический анализ выявляет криптический вид у дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* // Докл. РАН. 2006. Т. 407, № 4. С. 571–573.

Семина А.В., Полякова Н.Е., Брыков Вл.А. Анализ митохондриальной ДНК: филогенетические взаимоотношения в двух таксонах рыб (Pisces: Mugilidae, Cyprinidae) // Биохимия. 2007. Т. 72, № 12. С. 1651–1658.

Слынько Ю.В., Дгебуадзе Ю.Ю. Популяционно-генетический анализ алтайских османов (*Oreoleuciscus*, Cyprinidae) из водоемов Монголии // Вопр. ихтиол. 2009. Т. 49, № 5. С. 632–645.

Слынько Ю.В., Боровикова Е.А. Филогеография алтайских османов (*Oreoleuciscus* sp., Cyprinidae, Pisces) по данным изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома b митохондриальной ДНК // Генетика. 2012. Т. 48, № 6. С. 726–736.

Тимофеев-Ресовский М.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука, 1977. 301 с.

Черешнев И.А., Радченко О.А., Петровская А.В. Таксономическая структура подсемейства Xiphisterinae и его положение в системе стихеевых рыб (Stichaeidae, Zoarcoidei) // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2012. № 3. С. 90–99.

Шеховцов С.В., Шеховцова И.Н., Пельтек С.Е. ДНК-штрихкодирование: методы и подходы // Успехи соврем. биол. 2019. Т. 139, № 3. С. 211–220.

Шнеер В.С., Родионов А.В. ДНК-штрихкоды растений // Успехи соврем. биол. 2018. Т. 138, № 6. С. 531–537.

Abdo Z., Crandall K.A., Joyce P. Evaluating the performance of likelihood methods for detecting population structure and migration // Mol. Ecol. 2004. Vol. 13, N 4. P. 837–851.

Akaike H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle // Second International Symposium on Information Theory / B.N. Petrov, F. Csaki; Eds. Akademia Kiado. Budapest, 1973. P. 267–281.

Anderson M.E. Systematics and osteology of the Zoarcidae (Teleostei: Perciformes) // Ichthyol. Bull. J.L.B. Smith Inst. Ichthyology. 1994. N 60. 120 p.

Anderson M.E. Suborder: Zoarcoidei (Eelpouts and relatives) // Grzimek's Animal Life Encyclopedia. Michigan Farmington Hills: The Gale Group Inc. 2003. Vol. 5. P. 309–320.

Arenas M., Posada D. The effect of recombination on the reconstruction of ancestral sequences // Genetics. 2010. Vol. 184, N 4. P. 1133–1139.

Armbruster J.W. Standardized measurements, landmarks, and meristic counts for cypriniform fishes // Zootaxa. 2012. Vol. 3586. P. 8–16.

Arnold M.L. Natural Hybridization and Evolution. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1997. 228 p.

Arnold M.L. Evolution through Genetic Exchange. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2006. 252 p.

Arnold M.L., Emms S.K. Paradigm lost: natural hybridization and evolutionary innovations // Endless forme: species and speciation / Eds D.J. Howard, S.H. Berlocher. Oxford; N.Y.: Oxford Univ. Press, 1998. P. 379–389.

Arnold M.L., Fogarty N.D. Reticulate evolution and marine organisms: the final frontier? // Int. J. Mol. Sci. 2009. Vol. 10, N 9. P. 3836–3860. doi 10.3390/ijms10093836

Avise J.C. Phylogeography the history and formation of species. London, Cambridge, MA: Harvard University Press, 2000. 447 p.

Avise J.C., Aquadro C.F. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates: pattern and correlations // Evol. Biol. 1982. Vol. 15. P. 151–185.

Avise J.C., Wollenberg K. Phylogenetics and origin of species // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1997. Vol. 94. P. 7748–7755.

Bănărescu P. The zoogeographical position of the East Asian fresh-water fish fauna // Rev. Roum. Biol. ser. Zool. 1972. Vol. 17, N 5. P. 315–323.

Barton N.H. Multilocus clines // Evolution. 1983. Vol. 37. P. 454–471.

Barton N.H., Hewitt G.M. Analysis of hybrid zones // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1985. Vol. 16. P. 113–148.

Bayne B.L., Ahrens M., Allen S.K. et al. The proposed dropping of the genus *Crassostrea* for all Pacific cupped oysters and its replacement by a new genus *Magallana*: a dissenting view // Shellfish Res. 2017. Vol. 36, N 3. P. 545–547.

Behrens-Chapuis S., Herder F., Esmaeili H.R. et al. Adding nuclear rhodopsin data where mitochondrial COI indicates discrepancies – can this marker help to explain conflicts in cyprinids? // DNA Barcodes. 2015. Vol. 3, N 1. P. 187–199.

Berendzen P.B., Dimmick W.W. Phylogenetic relationships of Pleuronectiformes based on molecular evidence // Copeia. 2002. Vol. 3. P. 642–652.

Betancur-R.R., Orti G. Molecular evidence for the monophyly of flatfishes (Carangimorpharia, Pleuronectiformes) // Mol. Phyl. Evol. 2014. Vol. 73. P. 18–22.

Betancur-R.R., Broughton R.E., Wiley E.O. et al. The tree of life and a new classification of bony fishes // PLoS Currents Tree of Life. 2013.

Betancur-R.R., Wiley E., Bailly N. et al. Phylogenetic Classification of Bony Fishes. Version 3. 2014. (http://www.deepfin.org/Classification_v3.htm).

Birky C.W. Jr. Species detection and identification in sexual organisms using population genetic theory and DNA sequences // PLoS ONE 2013. Vol. 8, N 1. e52544. doi:10.1371/journal.pone.0052544.

Bogutskaya N.G. A revision of Altai osmans of the genus *Oreoleuciscus* (Cyprinidae: Leuciscinae) with a description of a new species, *O. angusticephalus*, from River Kobdo (Hovd) system, West Mongolia. St. Petersburg // Proc. Zool. Inst. RAS. 2001. Vol. 287. P. 5–44.

Borisanova A.O., Yushin V.V., Malakhov V.V., Temereva E.N. The fine structure of the cuticle of kamptozoans is similar to that of annelids // Zoomorphol. 2015. Vol. 134, N 2. P. 165–181.

Bringloe T.T., Cottenie K., Martin G.K., Adamowicz S.J. The importance of taxonomic resolution for additive beta diversity as revealed through DNA barcoding // Genome. 2016. Vol. 59, N 12. P. 1130–1140.

Broughton R.E., Betancur-R.R., Li C. et al. Multi-locus phylogenetic analysis reveals the pattern and tempo of bony fish evolution // PLoS Currents Tree of Life. 2013. doi: 10.1371/currents.tol.2ca8041495ffafd0c92756e75247483e.

Bufalino A.P., Mayden R.L. Molecular phylogenetics of North American phoxinins (Actinopterygii: Cypriniformes: Leuciscidae) based on RAG1 and S7 nuclear DNA sequence data // Mol. Phylogenet. Evol. 2010a. Vol. 55, N 1. P. 274–283.

Bufalino A.P., Mayden R.L. Phylogenetic relationships of North American phoxinins (Actinopterygii: Cypriniformes: Leuciscidae) as inferred from S7 nuclear DNA sequences // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010b. Vol. 55, N 1. P. 143–152.

Bush G.L. Modes of animal speciation // *Ann. Re Vol. Ecol. Syst.* 1975. Vol. 6. P. 339–364.

Campton D.E. Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and genetic interpretations // *Population genetics and fishery management* / Eds Ryman N., Utter F. Seattle: University of Washington Press, 1987. P. 161–192.

Chen W.J., Bonillo C., Lecointre G. Repeatability of clades as a criterion of reliability: A case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2003. Vol. 26. P. 262–288.

Chen W.J., Miya M., Saitoh K., Mayden R.L. Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing tree of life of rayfined fishes: the order Cypriniformes (Ostariophysi) as a case study // *Gene.* 2008. Vol. 423. P. 125–134.

Chen W.J., Mayden R.L. Molecular systematics of the Cyprinoidea (Teleostei: Cypriniformes), the world's largest clade of freshwater fishes: Further evidence from six nuclear genes // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009. Vol. 52, N 2. P. 544–549.

Chen X.L., Yue P.Q., Lin R.D. Major groups within the family Cyprinidae and their phylogenetic relationships // *Acta Zootaxonomica Sinica.* 1984. P. 424–440.

Chereshnev I.A., Radchenko O.A., Petrovskaya A.V. Relationships and position of the taxa of the subfamily Xiphisterinae in the system of the suborder Zoarcoidei (Perciformes) // *Rus. J. Mar. Biol.* 2013. Vol. 39, N 4. P. 276–286.

ChromasPro. <http://www.technelysium.com.au/chromas.html/>

Crawcraft J. Species concepts and speciation analysis // *Current Ornithology* / R.F. Johnston ed. Plenum Press, 1983. P. 159–187.

Dashdorzh A., Dulmaa A., Pivinicka K. Contribution to the systematics of the genus *Oreoleuciscus* Warpachowski, 1889 (Cyprinidae) // *Vestn. Českoslov. spol. zool.* 1969. Vol. 33, N 4. P. 289–299.

Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life // *Nat. Rev. Genet.* 2005. Vol. 6, N 5. P. 361–375.

Dettai A., Lecointre G. Further support for the clades obtained by multiple molecular phylogenies in the acanthomorph bush // *Comptes Rendus–Biologies*. 2005. Vol. 328. P. 674–689.

Dgebuadze Y.Y. The land inland-water ecotones and fish population of lake valley (West Mongolia) // *Hydrobiologia*. 1995. Vol. 303. P. 235–245.

Dobzhansky T. *Genetics and the origin of species*. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1937. 364 p.

Dobzhansky T. *Genetics and the origin of species*. 3rd edn. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1951. 364 p.

Dobzhansky T. *Evolution, genetics and man*. N.Y.; L. John Wiley and Sons Inc.: Chapman and Hall, Limited, 1955. 398 p.

Dobzhansky T. *Genetics of the evolutionary process*. N.Y.; L.: Columbia Univ. Press, 1970. 505 p.

Drummond A.K., Bouckaert R.R. Bayesian evolutionary analysis with BEAST. Cambridge: Cambridge University, 2015. 240 p.

Durand J.D., Tsigenopoulos C.S., Unlu E., Berrebi P. Phylogeny and biogeography of the family Cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome b DNA – Evolutionary significance of this region // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2002. Vol. 22, N 1. P. 91–100.

Durand J.D., Bianco P.G., Laroche J., Gilles A. Insight into the origin of endemic Mediterranean ichthyofauna: phylogeography of *Chondrostoma* genus (Teleostei, Cyprinidae) // *J. Hered.* 2003. Vol. 94, N 4. P. 315–328.

Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, N 5. P. 1792–1797.

Eschmeyer's Catalog of Fishes. Fricke R., Eschmeyer W.N. & R. van der Laan (eds); / California Academy of Sciences. Electronic version accessed in 2015 (<https://www.calacademy.org/scientists/projects/eschmeyers-catalog-of-fishes>).

Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References / Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & R. van der Laan (eds); California Academy of Sciences. Electronic version accessed 1 may 2019 (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach // *J. Mol. Evol.* 1981. Vol. 17, N 6. P. 368–376.

Frati F., Simon C., Sullivan J., Swofford D.L. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in collembola // *J. Mol. Evol.* 1997. Vol. 44, N 2. P. 145–158.

Fujisawa T., Barraclough T.G. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed Yule coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets // *Syst. Biol.* 2013. Vol. 62. P. 707–724.

Gerber A.S., Tibbets C.A., Dowling T.E. The role of introgressive hybridization in the evolution of the *Gila robusta* complex (Teleostei: Cyprinidae) // *Evolution.* 2001. Vol. 55, N 10. P. 2028–2039.

Ghigliotti L., Møller P.R., Cheng C.H. et al. Exploring the diversity of Arctic eelpouts: first cytogenetic data on species of the genus *Lycodes* (Teleostei, Zoarcidae) // *Mar. Genom.* 2012. Vol. 8. P. 35–41.

Gibbs M.J., Armstrong J.S., Gibbs A.J. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences // *Bioinformatics.* 2000. Vol. 16. P. 573–582.

Golubtsov A.S., Berendzen P.B., Annett C. A. Morphological variation and taxonomic status of Altai osmans, *Oreoleuciscus*, from the upper reaches of the Ob River system // *J. Fish Biol.* 1999. Vol. 54, N 4. P. 878–899.

Hall B. Phylogenetic trees made easy. A how-to manual for molecular biologist. Sunderland: Sinauer Assoc. Inc., 2001. 179 p.

Haldane J.B.S. The causes of evolution. London: Longmans and Green Press, 1932. 275 p.

Hanzawa N., Taniguchi N., Shinzawa H. Genetic markers of the artificial hybrids between *Tribolodon hakonensis* and *T. sp.* (Ukeguchi-Ugui) // *Otsuchi Mar. Res. Cent. Rep. Uni Vol. Tokyo.* 1984. Vol. 10. P. 11–17.

Harrison R.G. Linking evolutionary pattern and process: The relevance of species concepts for the study of speciation // *Endless forms: Species and speciation* / Howard D.J., Berlocher S.H. (eds). Oxford; N.Y.: Oxford Univ. Press, 1998. P. 19–31.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. Biological identifications through DNA barcodes // *Proc. R. Soc. L. B: Biol. Sci.* 2003a. Vol. 270, N 1512. P. 313–321.

Hebert P.D.N., Ratnasingham S., De Waard J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proc. R. Soc. L. B: Biol. Sci.* 2003b. Vol. 270, N S1. P. S96–S99.

Hedges S.B., Marin J., Suleski M. et al. Tree of life reveals clock-like speciation and diversification // *Mol. Biol. Evol.* 2015. Vol. 32. P. 835–845.

Hillis D.M., Mable B.K., Moritz C. Application of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. Hillis D.M., Moritz C., Mable B. (Eds.). *Molecular Systematics*. Sunderland, Massachusetts (01375–0407, USA): Sinauer. Assoc. Inc., 1996. Ch. 12, P. 515–543.

Hillis D.M. Taxonomic sampling, phylogenetic accuracy, and investigator bias // *Syst. Biol.*, 1998. Vol. 47. P. 3–8.

Holmes E.C., Worobey M., Rambaut A. Phylogenetic evidence for recombination in Dengue virus // *Mol. Biol. Evol.* 1999. Vol. 16, N 3. P. 405–409.

Howes G.J. Phyletics and biogeography of the aspinine cyprinid fishes // *Book Phyletics and biogeography of the aspinine cyprinid fishes* // Ed. Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.). 1984. Vol. 47, N 5. P. 283–303.

Howes G.J. *Systematic and Biogeography: an overview*. London: Chapman and Hall. 1991. 33 p.

Hubby J.L., Throckmorton D.H. Protein differences of *Drosophila*. II. Comparative species genetics and evolutionary problems // *Genetics*. 1965. Vol. 52. P. 203–215.

Huelsenbeck J.P., Crandall K.A. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood // *Annu Rev Ecol Syst.* 1997. Vol. 28. P. 437–466.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2001. Vol. 17. P. 754–755.

Hurvich C., Tsai C. Regression and time series model selection in small samples // *Biometrika*. 1989. Vol. 76, N 2. P. 297–307.

Huson D.H., Scornavacca C. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks // *Systematic Biology*. 2012. Vol. 61. P. 1061–1067.

Huxley J.S. The evolutionary process // *Evolution as a process* / Eds. J. Huxley, A.C. Hurdy, E.B. Ford. London: Georg Allen and Unwin Press, 1954. P. 156–180.

Imamura H., Yabe M. Demise of the Scorpaeniformes (Actinopterygii: Percomorpha): an alternative phylogenetic hypothesis // *Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ.* 2002. Vol. 53, N 3. P. 107–128.

Imoto J.S.K., Adachi J., Sasaki T. et al. Phylogenetic position of the Altaic fish, genus *Oreoleuciscus* in Leuciscinae based on mitogenome sequences // *Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological Genetics*:

International Symposium, Vladivostok. Vostok Marine Biological Station, September 6–12, Program and Abstracts. Vladivostok, 2009. P. 53.

Imoto J.M., Saitoh K., Sasaki T. et al. Phylogeny and biogeography of highly diverged freshwater fish species (Leuciscinae, Cyprinidae, Teleostei) inferred from mitochondrial genome analysis // *Gene*. 2013. Vol. 514, N 2. P. 112–124.

Inoue J.G., Miya M., Tsukamoto K., Nishida M. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001. Vol. 20, N 2. P. 275–285.

Ivankov V.N., Kaplunenko V.A., Borisovets E.E., Zolotova A.O. Taxonomic differences and ecological conditionality of scale structure in three morphologically similar species of Far Eastern redfins of the genus *Tribolodon* (Teleostei: Cyprinidae) // *Russ. J. Mar. Biol.* 2017. Vol. 43, N 3. P. 209–215.

Johns G.C., Avise J.C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene // *Molecular Biology and Evolution*. 1998. Vol. 15, N 11. P. 1481–1490.

Joly S. JML: testing hybridization from species tree // *Mol. Ecol. Res.* 2012. Vol. 12. P. 179–184.

Kartavtsev Y.Ph. Analysis of sequence diversity at mitochondrial genes on different taxonomic levels. Applicability of DNA based distance data in genetics of speciation and phylogenetics. Ch. 1 // *Genetic diversity* / Eds C.L. Mahoney, D.A. Springer. N.Y.: Nova Science Publishers Inc., 2009. P. 1–50.

Kartavtsev Y.Ph. Sequence divergence at mitochondrial genes in animals. Applicability of DNA data in genetics of speciation, phylogenetics and molecular ecology // *Mar. Genom.* 2011a. Vol. 49. P. 71–81.

Kartavtsev Y.Ph. Divergence at *Cyt-b* and *Co-1* mtDNA genes on different taxonomic levels and genetics of speciation in animals // *Mitochondrial DNA*. 2011b. Vol. 22, N 3. P. 55–65.

Kartavtsev Y.Ph. Sequence diversity at *Cyt-b* and *Co-1* mtDNA genes in animal taxa proved Neo-Darwinism // *J. Phyl. Evol. Biol.* 2013a. Vol. 1, N 4. P. 1–5.

Kartavtsev Y.Ph. Some current concerns of NeoDarwinism: Gene introgression throughout a species border // *J. Phyl. Evol. Biol.* 2013b. Vol. 1, N 5. P. 1–4.

Kartavtsev Y.Ph. Molecular evolution and population genetics. A course for marine biology students. N.Y.: CRS Press, Taylor and Francis Publ. Group, 2015. 349 p.

Kartavtsev Y.Ph. Barcode index number, taxonomic rank and modes of speciation: examples from fish // Mitochondrial DNA. Part A. 2018. Vol. 29, N 4. P. 535–542.

Kartavtsev Y.Ph., Sviridov V. V., Sasaki T., Hanzawa N. Genetic divergence of far eastern dace belonging to the genus *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) and closely related taxa: some insights in taxonomy and speciation // Rus. J. Genetics. 2002. Vol. 38, N 11. P. 1518–1531.

Kartavtsev Y.Ph., Hanzawa N. Inferences in Leuciscinae (Pisces, Cyprinidae) phylogeny and taxonomy based on cytochrome b sequence distances and on enzyme loci diversity // Korean J. Genet. 2007. Vol. 29, No 4. P. 427–435.

Kartavtsev Y.Ph., Jung S.-O., Lee Y.-M. et al. Complete mitochondrial genome of the bullhead torrent catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome description and phylogenetic considerations inferred from the Cyt b and 16S rRNA genes // Gene. 2007a. Vol. 396, N 1. P. 13–27.

Kartavtsev Y.Ph., Park T.J., Vinnikov K.A. et al. Cytochrome b (Cyt-b) gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae), with phylogenetic and taxonomic insights // Mar. Biol. 2007b. Vol. 152, N 4. P. 757–773.

Kartavtsev Y.Ph., Sharina S.N., Goto T. et al. Cytochrome oxidase 1 gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae) of Far East Russia with inferences in phylogeny and taxonomy // Mitochondrial DNA. 2008. Vol. 19, N 6. P. 479–489.

Kartavtsev Y.P., Sharina S.N., Goto T. et al. Molecular phylogenetics of pricklebacks and other percoid fishes from the Sea of Japan // Aquat. Biol. 2009a. Vol. 8. P. 95–103.

Kartavtsev Y.Ph., Sharina S.N., Goto T. et al. Sequence Diversity at Cytochrome Oxidase 1 (Co-1) Gene among Sculpins (Scorpaeniformes, Cottidae) and some other Scorpionfish of Russia Far East with Phylogenetic and Taxonomic Insights // Genes and Genomics. 2009b. Vol. 31, N 2. P. 183–197.

Kartavtsev Y.Ph., Sharina S.N., Saitoh K. et al. Phylogenetic relationships of Russian far eastern flatfish (Pleuronectiformes, Pleuronectidae) based on two mitochondrial gene sequences, Co-1 and Cyt-b, with inferences in order phylogeny using complete mitogenome data // Mitochondrial DNA. 2014. Vol. 28. P. 667–678.

Kartavtsev Y.Ph., Sharina S.N., Saitoh K. et al. Phylogenetic relationships of Russian Far Eastern Flatfish (Pleuronectiformes, Pleuronectidae) based on

two mitochondrial gene sequences, *Co-1* and *Cyt-b*, with inferences in order phylogeny using complete mitogenome data // *Mitochondrial DNA*. 2016. Vol. 27, N 1. P. 667–678.

Kartavtsev Y.Ph., Batischeva N.M., Bogutskaya N.G. et al. Molecular systematics and DNA barcoding of Altai osmans, *Oreoleuciscus* (Pisces, Cyprinidae, and Leuciscinae), and their nearest relatives, inferred from sequences of cytochrome *b* (*Cyt-b*), cytochrome oxidase *c* (*Co-1*) // *Mitochondrial DNA*. Part A. 2017. Vol. 28, N 4. P. 502–517.

Kijewska A., Burzynski A., Wenne R. Molecular identification of European flounder (*Platichthys flesus*) and its hybrids with european plaice (*Pleuronectes platessa*) // *ICES J. Mar. Sci.* 2009. Vol. 66, N 5. P. 902–906.

Kim K.H., Horn M.H., Sosa A.E., German D.P. Sequence and expression of an α -amylase gene in four related species of prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and species-level effects // *J. Comp. Physiol. B*. 2014. Vol. 184, N 2. P. 221–234.

Kimura M. *The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations* // *Genetics*. 1969. Vol. 61. P. 893–901.

King M. *Species Evolution: the role of chromosome change*. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 336 p.

Kondrashov A.S., Yampolsky L.Y., Shabalina S.A. On the sympatric origin of species by means of natural selection // *Endless forms: species and speciation* / Eds. D.J. Howarth, S.H. Berlocher. Oxford: Oxford Univ. Press, 1998. P. 90–98.

Kottelat M. *Fishes of Mongolia. A check-list of the fishes known to occur in Mongolia with comments on systematics and nomenclature*. The World Bank. Washington: Washington DC. 2006. 103 p.

Kumar S., Tamura K., Nei M. *Manual for MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software*. University Park. PA: Pennsylvania State University, 1993. 333 p.

Kwun H.J., Kim J.-K. Molecular phylogeny and new classification of the genera *Eulophias* and *Zoarchias* (PISCES, Zoarcoidei) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2013. Vol. 69, N 3. P. 787–95.

Lanfear R., Calcott B., Ho S.Y.W., Guindon S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses // *Mol. Biol. Evol.* 2012. Vol. 29, N 6. P. 1695–1701.

Lanfear R., Calcott B., Kainer D. et al. Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets // *BMC Evol. Biol.* 2014. Vol. 14, N 82. P. 1–14.

Li C., Ortí G., Zhang G., Lu G. A practical approach to phylogenomics: the phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study // *BMC Evol. Biol.* 2007. Vol. 7, N 44. P. 1–11.

Li B., Dettai A., Cruaud C. et al. RNF213, a new nuclear marker for acanthomorph phylogeny // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009. Vol. 50, N 2. P. 345–363.

Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics.* 2009. Vol. 25. P. 1451–1452.

Maniatis T., Fritsch T.T., Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* // *Book Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

Martin D., Rybicki E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences // *Bioinformatics.* 2000. Vol. 16. P. 562–563.

Martin D.P., Posada D., Crandall K.A., Williamson C. A modified BOOTSCAN algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints // *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005. Vol. 21. P. 98–102.

Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes // *Virus Evolution.* 2015. Vol. 1, N 1. P. 1–5.

Martinez-Navarro E.M., Galian J., Serrano J. Phylogeny and molecular evolution of the Tribe Harpalini (Coleoptera, Carabidae) inferred from mitochondrial cytochrome-oxidase I // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005. Vol. 35. P. 127–146.

Mayden R.L., Chen W.-J., Bart H.L. et al. Reconstructing the phylogenetic relationships of the earth's most diverse clade of freshwater fishes-order Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): A case study using multiple nuclear loci and the mitochondrial genome // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009. Vol. 51, N 3. P. 500–514.

Mayr E. *Process of speciation in animals* // *Mechanisms of speciation* / Ed. C. Barigozzi. N.Y.: Alan R. Liss, 1982. P. 1–19.

McCusker M.R., Denti D., van Guelpen L. et al. Barcoding Atlantic Canada's commonly encountered marine fishes // *Mol. Ecol. Res.* 2013. Vol. 13. P. 177–188.

Mecklenburg C.W. Family Bathymasteridae Jordan and Gilbert 1883. Annotation Checklist of Fishes / California Academy of Science. Sep. 2003. Num. 7.

Meyer A. Evolution of the mitochondrial DNA in fishes. Amsterdam: Elsevier. 1993. P. 3–38.

Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees / Gateway Computing Environments Workshop (GCE). 2010. P. 1–8.

Minin V., Abdo Z., Joyce P., Sullivan J. Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation // *Systematic Biology*. 2003. Vol. 52, N 5. P. 674–683.

Miya M., Nishida M. Organization of the Mitochondrial Genome of a Deep-Sea Fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): First Example of Transfer RNA Gene Rearrangements in Bony Fishes // *Marine Biotechnology*. 1999. Vol. 1, N 5. P. 416–426.

Miya M., Kawaguchi A., Nishida M. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences // *Mol. Biol. Evol.* 2001. Vol. 18, N 11. P. 1993–2009.

Miya M., Takeshima H., Endo H. et al. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences // *Mol. Phyl. Evol.* 2003. Vol. 26, N 1. P. 121–138.

Miya M., Saitoh K., Wood R. et al. New primers for amplifying and sequencing the mitochondrial ND4/ND5 gene region of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysii) // *Ichthyol. Res.* 2006. Vol. 53. P. 75–81.

Møller P.R., Gravlund P. Phylogeny of the eelpout genus *Lycodes* (Pisces, Zoarcidae) as inferred from mitochondrial cytochrome band 12S rDNA // *Mol. Phylog. Evol.* 2003. Vol. 26. P. 369–388.

Nailor G.J., Collins T.M., Brown W.M. Hydrophobicity and phylogeny // *Nature*. 1996. Vol. 373. P. 565–566.

Nakabo T. Fishes of Japan with pictorial keys to the species. Tokai Univ. Press. 2002. 1747 p.

Nanney D.L. Genes and phenes in *Tetrahymena* // *Bioscience*. 1982. V. 32, No 10. P. 783–788.

Nazarkin M.V. New stichaeid fishes (Stichaeidae, Perciformes) from Miocene of Sakhalin // *J. Ichthyol.* 1998. Vol. 38, N 4. P. 279–291.

Near T.J., Eytan R.I., Dornberg A., et al. Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification // *PNAS.* 2012. Vol. 109, N 34. P. 13698–13703.

Near T.J., Eytan R.I., Keck B.P. et al. Phylogeny and tempo of diversification in the superradiation of spiny-rayed fishes // *PNAS.* 2013. Vol. 113, N 31. P. 12738–12743.

Nedunoory A., Turanov S.V., Kartavtsev Y.Ph. Fish product mislabeling identified in the Russian far east using DNA barcoding // *Gene Reports.* 2017. Vol. 8. P. 144–149.

Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics.* N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.

Nei M., Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics.* N.Y.: Oxford Univ. Press. 2000. 333 p.

Nelson J.S. *Fishes of the world.* 4th ed. N.Y.: John Wiley and Sons. 2006. 601 p.

Nevado B., Fazalova V., Backeljau T. et al. Repeated unidirectional introgression of nuclear and mitochondrial DNA between four congeneric Tanganyikan cichlids // *Mol. Biol. Evol.* 2011. Vol. 28, N 8. P. 2253–2267.

Neznanova S.Yu. Comparative analysis of gamete ultrastructure in bigscaled redbfin *Tribolodon hakonensis* (Cyprinidae) from Southern Primorye and Sakhalin // *Voprosy Ikhtiologii.* 2015. Vol. 55, N 6. P. 713–718.

Padidam M., Sawyer S., Fauquet C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination // *Virology.* 1999. Vol. 265. P. 218–225.

Pardo B.G., Machordom A., Foresti F. et al. Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: Perspectives on phylogeny and biogeography // *J. Mol. Evol.* 2003. Vol. 56. P. 464–472.

Pardo B.G., Machordom A., Foresti F. et al. Phylogenetic analysis of flatfish (order Pleuronectiformes) based on mitochondrial 16S rDNA sequences // *Sci. Mar.* 2005. Vol. 69. P. 531–543.

Paterson H.E.H. More evidence against speciation by reinforcement // *South African J. Sci.* 1978. Vol. 74. P. 369–371.

Paterson H.E.H. The recognition concept of species // *Species and Speciation* / Ed. E.S. Vrba. Pretoria: Transvaal Museum Monograf, 1985. P. 21–29.

Pereira L.H.G., Hanner R., Foresti F., Oliveira C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? // *BMC Genetics*. 2013. Vol. 14, N 20. P. 1–14.

Polyakova N.E., Semina A.V., Brykov V.I.A. Analysis of mtDNA and nuclear markers points to homoploid hybrid origin of the new species of far eastern redfins of the genus *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) // *Rus. J. Genetica*. 2015. Vol. 51, N 11. P. 1075–1087.

Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging // *Mol. Biol. Evol.* 2008. Vol. 25, N 7. P. 1253–1256.

Posada D., Crandall K.A. MODELTEST: testing the model DNA substitution // *Bioinformatics*, 1998. Vol. 14. P. 817–818.

Posada D., Crandall K.A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98. P. 13757–13762.

Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation // *Mol. Ecol.* 2012. Vol. 21, N 8. P. 1864–1877.

Radchenko O.A., Chereshnev I. A., Petrovskaya A.V. Relationships and divergence of some taxa of the subfamily Lycodinae (Zoarcidae, Pisces) based on molecular-genetic and morphological data // *J. Ichthyol.* 2009. Vol. 49, N 8. P. 585–598.

Radchenko O.A., Chereshnev I.A., Petrovskaya A.V. Relationships and position of the genus *Neozoarces* of the subfamily Neozoarcinae in the system of the suborder Zoarcoidei (Pisces, Perciformes) by molecular-genetic data // *J. Ichthyol.* 2010a. Vol. 50, N 3. P. 246–251.

Radchenko O.A., Chereshnev I.A., Petrovskaya A.V. Phylogenetic relations in the family Pholidae (Perciformes: Zoarcoidei) based on genetic and morphological data // *J. Ichthyol.* 2010b. Vol. 50, N 9. P. 728–739.

Radchenko O.A., Chereshnev I.A., Petrovskaya A.V. Position of the genera *Lycenchelys* Gill and *Lycodapus* Gilbert in the family zoarcidae (Perciformes: Zoarcoidei) inferred from molecular genetic analysis // *Rus. J. Genet.* 2012a. Vol. 48, N 3. P. 310–320.

Radchenko O.A., Chereshnev I.A., Petrovskaya A.V. Position of neck banded blenny *Leptostichaeus pumilus* (Perciformes: Zoarcoidei) in the system of the suborder Zoarcoidei as inferred from molecular genetic data // *J. Ichthyol.* 2012b. Vol. 52, N 9. P. 592–598.

Radchenko O.A., Chereshnev I.A., Petrovskaya A.V. et al. Position of the genus *Azygopterus* (Stichaeidae, Perciformes) in the system of the suborder Zoarcoidei as inferred from sequence variation of mitochondrial and nuclear genes // *Rus J. Genet.* 2014a. Vol. 50, N 3. P. 280–287.

Radchenko O.A., Chereshnev I.A., Petrovskaya A.V. Genetic differentiation of species and taxonomic structure of the superfamily Stichaeoidea (Perciformes: Zoarcoidei) // *Rus. J Mar. Biol.* 2014b. Vol. 40, N 6. P. 473–485.

Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: the barcode of life data system // *Mol. Ecol. Notes.* 2007. Vol. 7, N 3. P. 355–364. (Available: www.barcodinglife.org)

Redin A.D., Kartavtsev Y.Ph. Molecular phylogeny of Russian far eastern flatfish (Pleuronectiformes, Pleuronectidae) based on sequences of mitochondrial genes // *Modern achievements in population, evolutionary, and ecological genetics: Int. symp. Vladivostok – Vostok Marine Biological Station, Sept. 3–8.* 2017. P. 34–35.

Reyes A., Gissi C., Pesole G., Saccone C. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals // *Mol. Biol. Evol.* 1998. Vol. 15. P. 957–966.

Roje D.M. Incorporating molecular phylogenetics with larval morphology while mitigating the effects of substitution saturation on phylogeny estimation: a new hypothesis of relationships for the flatfish family Pleuronectidae (Percomorpha: Pleuronectiformes) // *J. Mol. Phyl. Evol.* 2010. Vol. 56. P. 586–600.

Ronquist F., Huelsenbeck J.P. Mr. BAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics.* 2003. Vol. 19. P. 1572–1574.

Ronquist F., Teslenko M., Mark P.V.D. et al. MrBayes3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Syst. Biol.* 2012. Vol. 61, N 3. P. 539–542.

Ryazanova T.V., Eliseikina M.G., Kalabekov I.M., Odintsova N.A. A herpes-like virus in king crabs: Characterization and transmission under laboratory conditions // *J. Invertebr. Pathol.* 2015. Vol. 127. P. 21–31.

Saitoh K., Chen W.-J., Mayden R.L. Extensive hybridization and tetraploidy in spined loach fish // *Mol. Phyl. Evol.* 2010. Vol. 56. P. 1001–1010.

Saitoh K., Sado T., Mayden R.L. et al. Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): the first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater

fish clade based on 59 whole mitogenome sequences // J. Mol. Evol. 2006. Vol. 63. P. 826–841.

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

Sakai H. Life-histories and genetic divergence in three species of *Tribolodon* (Cyprinidae) // Mem. Fac. Fish Hokkaido Univ. 1995. Vol. 42. P. 1–98.

Sakai H., Hamada K. Electrophoretic discrimination of *Tribolodon* species (Cyprinidae) and the occurrence of their hybrids // Jap. J. Ichthyol. 1985. Vol. 32, N 2. P. 216–224.

Sakai H., Amano S. A New Subspecies of Anadromous Far Eastern Dace, *Tribolodon brandtii maruta* subsp. nov. (Teleostei, Cyprinidae) from Japan // Bull. 173. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. A. 2014. Vol. 40, N 4. P. 219–229.

Sakai H., Goto A., Jeon S.-R. Speciation and dispersal of *Tribolodon* species (Pisces, Cyprinidae) around the Sea of Japan // Zool. Sci. 2002. Vol. 19, N 11. P. 1291–1303.

Sakai H., Ito Y., Shedko S.V. et al. Phylogenetic and taxonomic relationships of northern Far Eastern phoxinin minnows, *Phoxinus* and *Rhynchocypris* (Pisces, Cyprinidae), as inferred from allozyme and mitochondrial 16S rRNA sequence analyses // Zool. Sci. 2006. Vol. 23, N 4. P. 323–331.

Salminen M.O., Carr J.K., Burke D.S., McCutchan F.E. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by BOOTSCANning // AIDS Res Hum Retroviruses. 1995. Vol. 11. P. 1423–1425.

Sambrook J. Molecular Cloning. N.Y.: Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor laboratory Press. 1989. 1626 p.

Sasaki T., Kartavtsev Y.Ph., Chiba S.N. et al. Genetic divergence and phylogenetic independence of Far Eastern species in subfamily Leuciscinae (Pisces: Cyprinidae) inferred from mitochondrial DNA analyses // Genes a Gen. Syst. 2007a. Vol. 82, N 4. P. 329–340.

Saveliev P.A. On the systematic position of the genus *Petroschmidtia* Taranetz et Andriashev, 1934 (Perciformes: Zoarcidae) // Rus. J. Mar. Biol. 2012. Vol. 38, N 2. P. 139–148.

Sawyer S. Statistical tests for detecting gene conversion // Mol. Biol. Evol. 1989. Vol. 6. P. 526–538.

Schwarz G. Estimating the dimensions of a model // Book Estimating the dimensions of a model /// *Ann Stat.* 1978. Vol. 6. P. 461–464.

Scornavaca C., Zickmann F., Huson D.H. Tanglegrams for rooted phylogenetic trees and networks // *Bioinformatics.* 2011. Vol. 27, N 13, P. i248–i256.

Sharina S.N., Kartavtsev Y.Ph. Phylogenetic analysis of flatfish (Teleostei, Pleuronectiformes) based on the investigation of nucleotide sequences of cytochrome oxidase 1 gene (Co-1) // *Rus. J. Genetics.* 2010. Vol. 46, N 3. P. 401–407.

Simpson G.G. Principles of animal taxonomy. The species and lower categories. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1961. 247 p.

Smietanka B., Burzynski A., Hummel H., Wenne R. Glacial history of the European marine mussels *Mytilus*, inferred from distribution of mitochondrial DNA lineages // *Heredity.* 2014. Vol. 113. P. 250–258.

Smith M.J. Analyzing the mosaic structure of genes // *J. Mol. Evol.* 1992. Vol. 34. P. 126–129.

Sneath P.H., Sokal R.R. Numerical taxonomy. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.

Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics.* 2014. Vol. 30, N 9. P. 1312–1313.

StaSoft Inc. StatSoft. Statistica Data Analysis Software System, version 7. 2005. Retrieved from <http://www.statsoft.com/>

Steinke D., Zemlak T.S., Hebert P.D.N., Adamowicz S.A. DNA barcoding of Pacific Canadas fishes // *Mar. Biol.* 2009. Vol. 156. P. 2641–2647.

Stevenson D.E., Matarese A.C. The ronquils: a review of the North Pacific fish family Bathymasteridae (Actinopterygii: Perciformes: Zoarcoidei) // *Proc. Biol. Soc. Wash.* 2005. Vol. 118, N 2. P. 367–406.

Stoeckle M.Y., Thaler D.S. Why should mitochondria define species? // *Hum. Evol.* 2018. Vol. 33, N 1–2. P. 1–30.

Sullivan J., Markert J.A., Kilpatrick C.W. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood // *Syst. Biol.* 1997. Vol. 46, N 3. P. 426–440.

Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30, N 12. P. 2725–2729.

Tateno Y., Nei M., Tajima F. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. I. Distantly related species // *J. Mol. Evol.* 1982. Vol. 18. P. 387–404.

Templeton A.R. Mechanisms of speciation – a population genetic approach // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1981. Vol. 12. P. 23–48.

Templeton A.R. Species and speciation: geography, population structure, ecology, and gene trees // *Endless forms: species and speciation* / Eds D.J. Howard, S.H. Berlocher . N.Y.; Oxford: Oxford Univ. Press, 1998. P. 32–43.

Travers R.A. Systematic account of collection of fishes from the Mongolian People's Republic: with a review of the hydrobiology of the major Mongolian drainage basins // *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.* 1989. Vol. 55, N 2. P. 173–207.

Truett G.E., Heeger P., Mynatt R.L., Truett A.A., Walker J.A., Warman M.L. Preparation of PCR-quality mouse genomic dna with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) // *BioTechniques.* 2000. Vol. 29, N 1. P. 52–54.

Turanov S.V., Kartavtsev Yu.Ph., Zemnukhov V.V. Molecular phylogenetic study of several eelpout fishes (Perciformes, Zoarcoidei) from Far Eastern seas on the basis of the nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase 1 gene (Co-1) // *Russ. J. Genetics.* 2012. Vol. 48, N 2, P. 208–233.

Turanov S.V., Kartavtsev Y.Ph., Lipinsky V.V. et al. DNA-barcoding of perch-like fishes (Actinopterygii: Perciformes) from far-eastern seas of Russia with taxonomic remarks for some groups // *Mitochondrial DNA.* 2014. Vol. 40, N 6. P. 447–454.

Turanov S.V., Kartavtsev Yu.Ph., Lipinsky V.V. et al. DNA-barcoding of perch-like fishes (Actinopterygii: Perciformes) from far-eastern seas of Russia with taxonomic remarks for some groups // *Mitochondrial DNA. Part A.* 2016. Vol. 27, N 2. P. 1188–1209.

Turanov S.V., Kartavtsev Y.Ph., Lee Y.H., Jeong D. Molecular phylogenetic reconstruction and taxonomic investigation of eelpouts (Cottoidei: Zoarcales) based on Co-1 and Cyt-b mitochondrial genes // *Mitochondrial DNA Part A.* 2017. Vol. 28, N 4. P. 547–557.

Väinölä R., Strelkov P. *Mytilus trossulus* in Northern Europe // *Mar. Biol.* 2011. Vol. 58. P. 815–833.

Van Vallen L. Ecological species, multispecies, and oaks // *Taxon.* 1976. Vol. 25. P. 233–239.

Vinnikov K.A., Thomson R.C., Munroe T.A. Revised classification of the righteye flounders (Teleostei: Pleuronectidae) based on multilocus phylogeny with complete taxon sampling // *Mol. Phyl. Evol.* 2018. Vol. 125. P. 147–162.

Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B. H. et al. DNA barcoding Australia's fish species // Philos. Trans. Roy. Soc. B. Biol. Sci. 2005. Vol. 360, N 1462. P. 1847–1857.

Ward R.D., Holmes B.H., White W.T., Last P.R. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. Mar. Freshw. Res. 2008. Vol. 59. P. 57–71.

Wiens J.J., Kuczynski C.A., Stephens P.R. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: implications for speciation and conservation // Biol. J. Lin. Soc. 2010. Vol. 99. P. 445–461.

Wiley E.O. Phylogenetics. The theory and practice of phylogenetic systematics. N.Y.: John Wiley and Sons, 1981. 456 p.

Yang L., Sado T., Hirt M.V. et al. Phylogeny and polyploidy: resolving the classification of Cyprinine 4 fishes (Teleostei: Cypriniformes) // Mol. Phyl. Evol. 2015. Vol. 85. P. 97–116.

Yatsu A. A revision of the gunnel family Pholididae (Pisces, Blennioidei) // Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo. Ser. A. 1981. Vol. 7, N 4. P. 165–190.

Zardoya R., Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates // Mol. Biol. Evol. 1996. Vol. 13, N 7. P. 933–942.

Zardoya R., Doadrio I. Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: Systematics and biogeographical implications // Proc. R. Soc. Lond. B. 1998. Vol. B 265. P. 1365–1372.

Zardoya R., Doadrio I. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids // J. Mol. Evol. 1999. Vol. 49, N 2. P. 227–237.

Zbawicka M., Wenne R., Burzynski A. Mitogenomics of recombinant mitochondrial genomes of Baltic Sea *Mytilus* mussels // Mol. Genet. Genomics. 2014. Vol. 289. P. 1275–1287.

Zbawicka M., Trucco M.I., Wenne R. Single nucleotide polymorphisms in native South American Atlantic coast populations of smooth shelled mussels: hybridization with invasive European *Mytilus galloprovincialis* // Genet. Sel. Evol. 2018. Vol. 50. P. 5.

Zemluchov V.V., Savelyev P.A. Neck banded blenny *Leptostichaeus pumilus* Miki, 1985 (Perciformes: Stichaeidae): A new genus and species for Russian waters // Rus. J. Mar. Biol. 2011. Vol. 37, N 2. P. 163–164.

Zemnukhov V.V. Genus *Leptostichaeus* and its position in the taxonomy of fishes (Perciformes: Zoarcoidei, Stichaeidae) // J. Ichthyol. 2012. Vol. 52, N 6, P. 363–368.

Zhang J., Kapli P., Pavlidis P., Stamatakis A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements // Bioinformatics. 2013. Vol. 29, N 22. P. 2869–2876.

Zhuravlev Y.N., Avetisov V.A. The definition of life in the context of its origin // Biogeosciences. 2006. Vol. 3. P. 281–291.

Zolotova A.O., Kartavtsev Y.Ph. Sequence divergence in the genus *Tribolodon* (Cypriniformes: Cyprinidae) based on mtDNA and nDNA markers and its applications to the systematics and genetics of speciation of redbfin // Scientific and Technological Developments of Research and Monitoring of Marine Biological Resources. / Shevchenko O.G., Ed. Vladivostok, 2017a. P. 125.

Zolotova A.O., Kartavtsev Y.Ph. Analysis of sequence divergence in Pacific red fin (Cypriniformes: Cyprinidae, *Tribolodon*) based on mtDNA and nDNA markers with inferences in systematics and genetics of speciation // Modern achievement in population, evolutionary, and ecological genetics. International symposium. / Kartavtsev Yu.Ph., Katugin O.N. Eds. Vladivostok, 2017b. P. 49.

Zolotova A.O., Kartavtsev Yu.Ph. Analysis of sequence divergence in redbfin (Cypriniformes, Cyprinidae, *Tribolodon*) based on mtDNA and nDNA markers with inferences in systematics and genetics of speciation // Mitochondrial DNA. Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis. 2018. Vol. 29, N 7. P. 975–992.

Zolotova A.O., Nikitin V.D., Dzen G.N. Identification of hybrids between the Far Eastern redbfins *Tribolodon hakonensis* and *T. brandtii* based on the cephalic lateral-line system and four molecular genetic markers // Journal of Ichthyology. 2019. Vol. 59, N 3. P. 317–326.

Zuckermandl E., Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history // J. Theor. Biol. 1965. Vol. 8, N 2. P. 357–366.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КРИОГЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК МОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ

Н.А. Одинцова, М.А. Майорова

*Национальный научный центр морской биологии
им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения
Российской академии наук,
Владивосток, Россия
E-mail: nelodin@mail.ru*

STUDY OF THE EFFECTS OF CRYOGENIC TEMPERATURES ON THE STATE OF MARINE MOLLUSCAN CELLS

N.A. Odintsova, M.A. Maiorova

*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology,
FEB RAS, Vladivostok, Russia
E-mail: nelodin@mail.ru*

Данная работа продолжает наши предыдущие исследования путей гибели клеток морских беспозвоночных в ответ на холодовой стресс. Конкретные задачи работы связаны с исследованием изменений, которые происходят в клетках личинок двустворчатых моллюсков в стандартных условиях культивирования и после холодового повреждения, при индукции или ингибировании апоптоза. Впервые обнаружено, что помимо механического разрушения клеток, которое было связано с самим процессом замораживания, большинство клеток личинок мидии погибали в результате некроза или

апоптоза, которые развивались в процессе их культивирования после оттаивания. Апоптоз – не основной путь смерти для клеток моллюсков после криоконсервации, но его индукция проходила в значительной части клеток сразу после оттаивания и зависела от типа используемого криопротектора. Были обнаружены ядерные нарушения, которые следует учитывать при оценке эффективности криоконсервации. Обзор работ по индукции апоптоза в клетках моллюсков после различных стрессовых воздействий позволил выбрать методы оценки апоптоза. Установлено, что химические индукто-

ры апоптоза, известные для клеток млекопитающих, могут оказывать неизвестные еще эффекты для клеток моллюсков. К сожалению, уменьшить апоптоз в культурах клеток личинок двустворчатых моллюсков после криоконсервации с помощью тестируемых ингибиторов апоптоза не удалось.

This work continues our previous studies of cell death pathways in response to cold stress in marine invertebrates. The specific tasks of the work are connected with the study of changes occurring in bivalve larval cells both in standard culture conditions and in response to cold injury, as well as during induction or inhibition of apoptosis. It was first discovered that in addition to mechanical destruction of cells, which was associated with the freezing process itself, the majority of mussel

larval cells died as a result of necrosis or apoptosis, which appeared to increase during their cultivation after thawing but its induction took place in a significant part of cells immediately after thawing and depended on the type of cryoprotectant used. Nuclear abnormalities were detected, which should be considered when evaluating the effectiveness of cryopreservation. A review of studies of various stressful influences on the induction of apoptosis in molluscan cells made it possible to choose methods for assessing apoptosis. It has been established that chemical inducers of apoptosis, known to mammalian cells, may have unknown yet effects on molluscan cells. Unfortunately, we could not get a decrease in apoptosis after the freeze-thaw cycle in primary cell cultures of bivalve larvae using tested inhibitors of apoptosis.

Введение

Для поддержания биоразнообразия необходимо сохранение отдельных видов, поскольку уничтожение любого из них может приводить к нарушению функционирования целых экосистем. Утрата отдельных популяций ведет к снижению генетического разнообразия, что негативно сказывается на устойчивости вида в меняющихся условиях среды обитания (Матишов и др., 2010). Вымирание некоторых видов животных, а тем более, их отдельных популяций, в последнее время происходит с большой скоростью, главным образом вследствие действий человека: уничтожения среды обитания, индустриализации, антропогенного загрязнения, конкуренции, чрезмерной охоты и т.п. Наше понимание механизмов, вовлеченных в процесс клеточной смерти у млекопитающих, может стать яснее при исследовании различных ответов на внешний стресс клеток более

простых организмов, таких как двустворчатые моллюски. Исследование стрессовых воздействий окружающей среды на состояние клеток морских моллюсков и выявление механизмов их холодовой устойчивости важно для рационального использования морских гидробионтов в интересах устойчивого развития экономики Дальневосточного региона. Данная работа продолжает наши предыдущие исследования путей гибели клеток в ответ на холодовой стресс у морских беспозвоночных.

Хотя главные пути гибели клеток (апоптоз и некроз) высоко консервативны, они варьируют по морфологии, биохимии и физиологии у разных животных (Zeiss, 2003; Zhivotovsky, 2004; Elmore, 2007; Kiss, 2010; Bissoyi et al., 2014). Некроз часто наблюдается при циклах замораживания-оттаивания в клетках млекопитающих (Bissoyi et al., 2014). В отличие от некроза, апоптоз происходит при нормальных физиологических условиях и обнаружен у всех эукариот, от простейших до многоклеточных животных (Elmore, 2007). Активация каспаз у многоклеточных рассматривается как наиболее специфический маркер апоптоза, но это не всегда так (Zhivotovsky, 2004). Сохранение целостности плазматической мембраны до последних стадий дезинтеграции клетки – главная отличительная черта апоптоза, которая отсутствует при некрозе.

Если для млекопитающих молекулярные механизмы, отвечающие за контроль стрессовых условий, во многом определены (Sun, 2010; Wu, 2012), то для моллюсков подобная информация отсутствует. Молекулярные шапероны, в частности, белки теплового шока (HSPs), могут играть ключевую роль в восстановлении белковых нарушений и поддержании жизнеспособности клеток (Lindquist, 1986; Ellis, 1987). Эти белки описаны для большинства живых организмов (Hartl, 1996). Среди 5 главных семейств этих белков, некоторые HSPs, в частности, HSP 60 и HSP 70, могут быть подходящими маркерами для различных видов стрессов. Члены семейства HSP 60, по-видимому, стабилизируют белки во время промежуточных стадий упаковки (Martin et al., 1991), тогда как члены другого семейства, HSP 70, важны для восстановления денатурированных белков (Gaitanaris et al., 1990; Skowyrza et al., 1990). Программы клеточной смерти могут быть активированы повышенными уровнями апоптоза как при скачках температуры, так и при окислительном стрессе у прибрежных организмов, включая моллюсков (Sokolova et al., 2004).

Апоптоз в клетках моллюсков по своей сложности не уступает апоптозу в клетках позвоночных животных (Kiss, 2010), но имеет некоторые уникальные черты, и его детали представлены для представителей разных классов моллюсков во многих работах (Mondy, Pierce, 2003; Sunila, LaBanca, 2003; Sokolova et al., 2004; Buckland-Nicks, Tompkins, 2005; Russo, Madec, 2007; Sokolova, 2009; Koropatnick et al., 2007; 2014; Romero et al., 2011; 2015). Однако влияние множественных стрессовых факторов на морские моллюски проанализировано только в немногих исследованиях (Sokolova et al., 2004; Lockwood et al., 2015; Przeslawski et al., 2015). Окружающие поллютанты и резкие температурные скачки могут привести к разнообразным нарушениям в клетках, включая апоптоз или некроз. В случае нескольких стрессоров, это может привести к апоптозу (Mondy, Pierce, 2003; Sđti et al., 2003; Sokolova et al., 2004; Sokolova, 2009; Romero et al., 2011; Estévez-Calvar et al., 2013). Только одна работа опубликована о путях гибели клеток моллюсков после стрессовых воздействий криогенных температур (Odintsova et al., 2017). Это наша работа, в которой были использованы исследования *in vitro*, выполненные на клетках личинок мидии. По-видимому, происходят нарушения в анти-оксидантных защитных механизмах после замораживания-оттаивания клеток моллюсков. Эти анти-оксидантные механизмы могли бы предотвратить разрушения, вызванные реактивными формами кислорода или апоптозом после криоконсервации (Odintsova et al., 2009).

Известно, что ранние жизненные стадии морских организмов отличаются повышенной восприимчивостью к различным факторам стресса по сравнению со взрослыми организмами (Przeslawski et al., 2015). Как показано в нашей работе (Odintsova et al., 2017), общее количество живых клеток личинок мидии в культуре значительно уменьшается в результате воздействия окислительного стресса. Примерно равное количество клеток на стадии раннего апоптоза (6–7%) было обнаружено в незамороженных клетках мидии, обработанных стауроспорином (STS-индуцированный апоптоз) или перекисью водорода (апоптоз, индуцированный окислительным стрессом).

Мидии рода *Mytilus* являются сидячими организмами, которые обитают в сильно стрессовых приливных экосистемах и поэтому должны обладать механизмами противодействия стрессовым факторам (Halpin et al., 2002; Lockwood et al., 2015), такими как аккумуляция криопротекторных метаболитов или продукция шаперонов. Однако мы знаем очень немного,

как экспрессия *Hsp* генов регулируется в ответ на различные изменения окружающей температуры (Hofmann, Somero, 1996; Hofmann, 2005). Два вида антарктических моллюсков, *Laternula elliptica* и *Nacella concinna*, продемонстрировали значительное нарушение экспрессии HSP70 в ответ на увеличение температуры морской воды (Clark et al., 2008). Известно, что классическая активация индуцибельных *Hsp70* генов происходит в ответ на повышение окружающей температуры (Morimoto, 1998), тогда как активация конститутивных *Hsp70* генов у двустворчатых моллюсков не связана с эффектом температуры (Clark et al., 2008). Недавние исследования моллюсков рода *Mytilus* показали, что высокотемпературный стресс индуцирует изменения в экспрессии генов и белков (Lockwood et al., 2010; Fields et al., 2012). Ответы на высокотемпературный стресс отличались у гемоцитов двух видов мидий *Mytilus galloprovincialis* и *M. californianus*, однако, оба вида были толерантны к холодному стрессу, по крайней мере, в течение короткого времени (Yao, Somero, 2012). Авторы предположили, что существует причинно-следственная связь между уровнем ДНК нарушений при резких изменениях температуры и регуляторными ответами, включая индукцию апоптоза. Ранее обнаружено, что HSPs белки мидий *M. trossulus* могут восстанавливать денатурированные в результате воздействия температурного стресса структурные белки (Buckley et al., 2001), и уровни убиквитированных белков (после белковой денатурации) значительно повышаются при тепловой акклимации, а не при холодной. Эти результаты подтверждают ранее полученные данные, что уровень убиквитиновых конъюгатов в тканях мидии *M. trossulus* был значительно выше летом, чем зимой (Hofmann, Somero, 1995).

Возможно, различная чувствительность к апоптозу клеток млекопитающих и моллюсков связана с существованием мощной анти-апоптозной системы в моллюсках. Недавно описанная анти-апоптозная регуляторная сеть генов устрицы *Crassostrea gigas*, вероятно, играет важную роль в защите клеток моллюсков против температурных стрессов (Zhang et al. 2012). Геном устрицы содержит большое количество генов, связанных с защитными путями в клетке. Так, 88 генов, кодирующих белки HSP70, были обнаружены в геноме устрицы, по сравнению с 17 генами у человека и 39 у морских ежей (Zhang et al. 2012). В настоящее время, некоторые гены, ответственные за криоустойчивость, были идентифицированы только в клетках дрожжей (Tanghe et al., 2000; Kim et al., 2012).

Хранимый в замороженном состоянии при температуре жидкого азота (-196°C) материал остается генетически стабильным. Как мы установили ранее, время хранения в жидком азоте не влияет на сохранность клеток двусторчатых моллюсков (Odintsova, Tsal, 1995), также, как и клеток других морских беспозвоночных (Odintsova et al., 2009). Более того, теоретическое моделирование показало, что на материал, хранящийся в жидком азоте хоть несколько тысяч лет, время не может оказывать влияние из-за недостаточности термической энергии для какой-либо химической реакции при столь низкой температуре (McGee, Martin, 1962; Mazur, 1984).

Баланс между индукторами и ингибиторами апоптоза играет важную роль в определении судьбы клеток (Schultz, Harrington, 2003; Elmore, 2007). Установлено, что апоптоз, связанный с экспрессией генов каспаз и других ферментов, ответственен за контролируемое разрушение клеток как у позвоночных, так и беспозвоночных животных (Bissoyi et al., 2001; Romero et al., 2015). В данном исследовании в присутствии оптимального для клеток моллюсков криопротектора – 5–7% диметилсульфоксида (ДМСО) (Odintsova et al., 2017) и различных индукторов и ингибиторов апоптоза, хорошо известных для клеток млекопитающих, было проанализировано поведение клеток личинок моллюсков до и после замораживания в жидком азоте. Проточная цитометрия стала мощным инструментом для выявления живых, апоптозных и мертвых клеток, а также наиболее общим используемым методом для того, чтобы различить апоптоз от некроза в диссоциированных клетках (Pozarowski et al., 2003). В качестве положительных контролей мы использовали две различные системы культивируемых клеток млекопитающих – первичную культуру эмбриональных фибробластов мыши (MEF) и опухолевые клетки человека линии H7C116, так как известно, что в культуре апоптозные клетки можно выявлять в течение длительного времени (Wlodkowic et al., 2011).

Низкая вязкость мембран клеток морских гидробионтов облегчает “флип-флоп” переход липидов между внутренним и внешним слоями бислоя, включая молекулы фосфатидилсерина, для выявления которых обычно используют типичный маркер апоптоза – аннексин-V. Этот процесс может увеличивать ложное определение аннексин-V-положительных клеток. Для дополнительного контроля изменений в мембране клеток моллюсков после оттаивания мы использовали окраску с реактивом Yellow-Pro. Клетки были последовательно окрашены FLICA и DAPI, чтобы иденти-

фицировать клетки на стадии раннего апоптоза и мертвые клетки, а затем другие клетки из той же группы были окрашены YO-PRO®-1 и DAPI, чтобы идентифицировать клетки на стадии позднего апоптоза и мертвые клетки. В итоге, при использовании двух типов окрасок можно более точно идентифицировать стадии апоптоза в клетках моллюсков после криоконсервации. Именно проточная цитометрия позволяет проводить многофакторный анализ, хотя выбор апоптозных маркеров зависит от многих факторов.

На клетках моллюсков нами были тестированы три индуктора апоптоза, которые рутинно используют для индукции химического апоптоза клеток млекопитающих, такие как стауроспорин, STS (природный антибиотик), камптотецин, САМ (ингибитор топоизомеразы I), и митомицин С, ММС (вещество, входящее в то же самое семейство, что и САМ) (Mehlen et al., 1996; Morris, Geller, 1996; Pirnia et al., 2002). Обнаружено, что только STS приводил к очевидному апоптозу как в контрольных незамороженных клетках моллюсков (6,6% по сравнению с 2,9% в контроле), так и после цикла замораживания-оттаивания (9,1% по сравнению с 5,6% в контрольных клетках). САМ не увеличивал апоптоз в клетках моллюсков, но приводил к небольшому увеличению жизнеспособности клеток после замораживания-оттаивания. ММС показал сходные результаты с САМ. Мы предполагаем, что некоторые индукторы апоптоза могут оказывать неизвестные еще эффекты для клеток моллюсков. Кроме того, мы тестировали три ингибитора апоптоза (Y-27632, циклический пирифитрин- α , и CHIR99021), известные для клеток млекопитающих, чтобы уменьшить долю апоптозных клеток после цикла замораживания-оттаивания. Y-27632 – хорошо проникающий мощный ингибитор сигнального пути, связанного с Rho-белковой киназой в клетках млекопитающих и блокирующий работу серин-треониновых киназ. В эндотелиальных клетках человека, обработанных этим ингибитором, уровень апоптоза резко уменьшался, вероятно, из-за снижения активности каспазы 3 (Peh et al., 2015). Более того, ранее было доложено, что Rho-фермент может быть вовлечен в анти-апоптозный механизм в гемоцитах устрицы (Lacoste et al., 2002). Два других тестируемых ингибитора апоптоза (циклический пирифитрин- α и CHIR99021) связаны с блокировкой работы белка Р-53. В культурах клеток мышей циклический пирифитрин- α препятствовал Р-53–связанному апоптозу, который развивался в ответ на воз-

действие ультрафиолета или ионизирующей радиации (Marión et al., 2009). Другой специфический ингибитор апоптоза, CHIR99021, блокировал ацетилирование лизина 120 в P-53-белке и препятствовал появлению апоптоза в клетках лимфомы человека, подвергнутых воздействию ионизирующей радиации (Ambroise et al., 2015). Мы исходили из предположения, что ингибиторы апоптоза могут заблокировать апоптоз после замораживания, и это способствовало бы более высокому выходу жизнеспособных клеток после криоконсервации. К сожалению, нам не удалось получить снижение апоптоза после цикла замораживания-оттаивания в культурах клеток моллюсков (Voroda et al., 2019).

Материалы и методы

Животные

В качестве объектов исследования использовали личинок мидии *Mytilus trossulus* Gould, 1850 (Mytilidae, Mollusca). Взрослые моллюски были собраны в зал. Восток Японского моря (МБС “Восток”) в мае 2017–2018 гг., помещены в ванны с проточной морской водой (МВ) при температуре 11–15°C и перед началом эксперимента промыты два-три раза фильтрованной МВ, обработанной ультрафиолетом. Нерест индуцировали термическим шоком: животных сначала помещали на 8–10 ч в охлажденную до 10°C МВ, а затем переносили в МВ, нагретую до 22°C. Эмбриональный материал получали путем искусственного оплодотворения, смешивая яйцеклетки и сперматозоиды из расчета 1–2 спермия на одну яйцеклетку. Интервал между индукцией нереста и моментом оплодотворения не превышал 55 мин (Dyachuk, Odintsova, 2009). В дальнейшем, личинок культивировали в 5 л-аквариумах при 16–17°C в термостате, и затем собирали на газ (диаметр ячеи 30 мкм) со стадии трохофоры (22 ч после оплодотворения при 17°C) для получения первичных культур клеток, как описано в (Odintsova et al., 2017).

Культуры клеток

Контрольные незамороженные клетки моллюсков и клетки после замораживания-оттаивания культивировали при концентрации 120–150 × 10³ клеток/на лунку в стерильной МВ с 2% эмбриональной сывороткой коров (FBS) и антибиотиками (100 U/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) в 6-луночных планшетах (TPP, Швейцария) при 17°C в течение 4–48 ч. Для индукции апоптоза клетки инкубировали либо с 1–5 мкМ STS,

либо с 1–10 мкМ САМ, или 1–10 мкМ ММС. Все тестируемые индукторы апоптоза растворяли в ДМСО (1 ммоль) и хранили при -20°C. Перекись водорода была добавлена к клеткам до конечной концентрации 125 мкМ, чтобы индуцировать окислительный стресс. Для уменьшения уровня апоптоза после цикла замораживания-оттаивания, клетки моллюсков инкубировали с ингибиторами апоптоза, известными для клеток млекопитающих (указана конечная концентрация): Y-27632 (10–50 мкМ, Y), циклический пифитрин-α (5 мкМ, Альфа) или CHIR99021 (1–5 мкМ, CHIR); все эти ингибиторы получены из Sigma (США).

В качестве положительного контроля для анализа эффектов индукторов и ингибиторов апоптоза использовали клетки млекопитающих (MEFs и НСТ 116 клетки, Sigma, Германия). Первичная культура MEFs была получена согласно протоколу, описанному в (Peterson et al., 2007). Клетки млекопитающих культивировали в среде DMEM с 10% FBS в 6-луночных планшетах (TPP) при 5% CO₂, 37°C в течение 4–48 ч. Клетки инкубировали либо с индукторами апоптоза, либо с ингибиторами апоптоза или с ингибиторами апоптоза в присутствии STS. Эффекты тестируемых индукторов и ингибиторов апоптоза для клеток млекопитающих хорошо описаны в литературе (Mehlen et al., 1996; Morris, Geller, 1996; Pirnia et al., 2002; Marión et al., 2009; Ambroise et al., 2015; Peh et al., 2015).

Замораживание-оттаивание клеток моллюсков

Результирующая клеточная суспензия (0,6 мл), которая содержала все типы клеток, была перенесена в стерильные 2-мл-полипропиленовые пробирки (TPP), с постепенным добавлением криопротекторного раствора (1,2 мл), охлажденного до 4°C. Криопротекторная смесь была приготовлена на стерильной 34‰ МВ и содержала различные комбинации непроникающих криопротекторов, таких как дегидрат D-(+)-трегалозы (Tr), и/или поливинилпирролидон (средний молекулярный вес 10000)(ПВП) при конечной концентрации 10–15 мг/мл каждый (w/v), и/или проникающих криопротекторов, таких как диметилсульфоксид (ДМСО) и/или этиленгликоль (ЭГ) при конечной концентрации 5–10% каждый. Все криопротекторы были получены из Sigma-Aldrich (США). Проникающий криопротектор ДМСО оказался оптимальным криопротектором для клеток моллюсков, обеспечивая максимальный уровень жизнеспособности; при этом даже среди мертвых клеток редко встречались полностью разрушенные клетки без цитоплазмы. Образцы переносили на ледяную баню на 10 мин до замораживания, а потом за-

мораживали трехступенчатым методом с низкой (до 2°C/мин) скоростью замораживания, как описано в (Odintsova et al., 2015).

Мы анализировали целостность плазматических мембран клеток личинок мидии и активность каспаз с помощью проточной цитометрии, ультраструктурные изменения в морфологии клеток с помощью электронной микроскопии; кроме того, была проведена оценка пролиферативного уровня и дефектов в митотическом аппарате клеток после замораживания-оттаивания с помощью иммуноцитохимии. Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью нескольких тестов: либо с помощью теста по исключению красителя трипанового синего, проводя прямой подсчет клеток в камере Горяева, либо колориметрическим МТТ-методом (Mosmann, 1983), основанном на измерении метаболической активности митохондриальных ферментов в жизнеспособных клетках, либо с помощью окраски флуоресцентным красителем DAPI с последующим анализом на проточном цитометре CytoFlex (Beckman-Coulter, США).

МТТ-тест. Первичные культуры клеток переносили в 96-луночные планшеты (TPP) с плоским дном по 100 мкл суспензии на лунку. Добавляли по 10 мкл раствора МТТ (5 мкг/мл в CMFSS, Sigma-Aldrich) в каждую лунку и инкубировали в темноте 24 ч при комнатной температуре (RT), после чего добавляли по 150 мкл 0,04 н раствора HCl в изопропанол, суспендировали до полного растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 570 нм с референсной длиной волны 620 нм с помощью планшетного спектрофотометра xMark (Bio-Rad, США) не позднее, чем через 20 мин после окраски.

Анализ изменений, происходящих в клетках моллюсков после замораживания-оттаивания, может стать ключом для идентификации различных механизмов приспособления морских гидробионтов к изменению условий среды.

Оценка состояния клеток с помощью проточной цитометрии

Для того, чтобы определить возможные изменения апоптоза и оценить его уровень в культурах клеток моллюсков до и после замораживания-оттаивания, мы использовали проточную цитометрию. Все образцы анализировали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman-Coulter, США) (Лаборатория биологии морских беспозвоночных ШЕН ДВФУ). Использовали следующие окраски: H₂DCFDA (Sigma) – маркер активных митохондрий в живых клетках для выявления реактивных форм кислорода;

флуоресцентный маркер ДНК DAPI (Gerbu, Германия) для окраски мертвых клеток с разрушенными внешними мембранами, который не окрашивает живые клетки или клетки, находящиеся на стадии раннего апоптоза; FLICA® (Molecular Probes, США) – маркер общей каспазной активности в живых клетках, специфически показывающий апоптозные клетки на стадии раннего апоптоза; и флуоресцентно меченый краситель YO-PRO™-1 (Molecular Probes) – маркер целостности плазматической мембраны, указывающий на клетки на стадии позднего апоптоза. Цитометрический анализ зеленых флуоресцентных красок – H2DCFDA-, FLICA®, или YO-PRO™-1 (488 нм лазер) и ультрафиолетовой краски – DAPI (405 нм лазер) был выполнен в течение 20 мин после окраски. В каждом образце оценивали по крайней мере 20000 событий.

Детекция функциональной активности клеток

Краситель H₂DCFDA был добавлен к 100 мкл суспендированных клеток при конечной концентрации 10 мкМ. Клетки инкубировали в темноте при RT в течение 20 мин. Далее к суспензии клеток добавили 150 мкл искусственной морской воды без Ca⁺² и Mg⁺² (CMFSS, клетки моллюсков) или фосфатного буфера (DPBS, клетки млекопитающих), центрифугировали при 500 x g 5 мин и ре-суспендировали в 100 мкл свежего раствора CMFSS или DPBS. Образцы окрашивали DAPI (1 мкг/мл) в темноте при RT дополнительные 7 мин и затем разбавляли в 150 мкл CMFSS или DPBS перед началом цитометрического анализа.

Определение общей активности каспаз и целостности плазматической мембраны

Ранее нами было показано, что аннексин V не подходит для детекции апоптозных клеток в культурах клеток моллюсков (Odintsova et al., 2017). Анализ клеточных образцов, проведенный с помощью двух различных комбинаций окраски, таких как FLICA–DAPI и YO-PRO–DAPI, более точно отражает количество апоптозных клеток на стадии раннего и позднего апоптоза, а также количество мертвых клеток в культурах клеток моллюсков. Временное окно для детекции апоптоза за счет связывания с FLICA-реагентом или YO-PRO-1 окраски намного шире, чем таковое при оценке связывания с аннексином V (Pozarowski et al., 2003; Wlodkowic et al., 2011). Такое сочетание окрасок позволяет не получать ложноположительные или отрицательные артефакты.

Сначала 50 мкл клеточной суспензии окрашивали в темноте при RT в течение 45 мин реагентом FAM-VAD-FMK FLICA®, согласно рекомендациям производителя. Не связавшийся реагент FLICA® был удален из клеток промывкой 150 мкл CMFSS (клетки моллюсков) или DPBS (клетки млекопитающих) с последующим центрифугированием 500 x g в течение 5 мин, ре-суспендированием в 95 мкл свежего раствора CMFSS или DPBS. Образцы затем были окрашены DAPI, как описано выше, разбавлены в 150 мкл CMFSS или DPBS перед проведением цитометрического анализа. Эти окраски были использованы для идентификации мертвых клеток (DAPI) и клеток на стадии раннего апоптоза (FLICA). Далее, другая группа клеток была последовательно окрашена YO-PRO®-1 и DAPI, чтобы идентифицировать клетки на стадии позднего апоптоза, проницаемые только для YO-PRO®-1, и мертвые клетки, мембрана которых становится проницаемой как для YO-PRO®-1, так и для DAPI. 1 мкл YO-PRO™-1 (15 мкМ) был добавлен к 100 мкл клеточной суспензии в CMFSS (клетки моллюсков) или DPBS (клетки млекопитающих). После 10-мин инкубации при RT в темноте, образцы были окрашены DAPI и анализированы с помощью проточного цитометра.

Иммуноцитохимические методы

Для иммунохимического мечения использовали последовательную обработку культивированных клеток мидии первичными и вторичными антителами. Оценку пролиферирующих клеток проводили с помощью маркера митотических клеток – Н3-гистона, фосфорилированного по серину (клон крысы HTA28, Abcam, США; разведение 1:500). Специфичность выбранного клона антител была ранее показана на многих типах клеток позвоночных и беспозвоночных животных (Кирик и др., 2009). Для иммунохимического маркирования тубулина использовали антитела мыши к ацетилированному тубулину (клон DM1A, Sigma) в разведении 1:2000, специфичность которых ранее была показана для моллюсков (Voronezhskaya et al., 2008). Клетки мидии, через различные интервалы времени после посадки (12–24 ч), промывали два раза стерильной МВ и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma) в течение 7–10 мин при RT. Затем клетки три раза промывали фосфатным буфером (ФБ) и хранили до окрашивания при +4° С в ФБ с 0,03% NaN₃. Для предотвращения неспецифического связывания антител, клетки инкубировали в блокирующем буфере (ББ), содержащем 10% нормальной козьей сы-

воротки, 0,5% бычьего сывороточного альбумина, 0,1% Тритон X-100, и 0,03% NaN_3 в ФБ 1 ч, а затем в первичных антителах 2 ч при RT или ночь при $+4^\circ\text{C}$ во влажных камерах. Все первичные антитела были приготовлены на ББ. После отмывок ФБ (3 раза по 10 мин), к препаратам были добавлены вторичные антитела на 1 ч при RT. В качестве вторичных антител использовали антитела козы против антител мыши или крысы, конъюгированные с различными флуорохромами (Molecular Probes, разведение 1:1000). Растворы вторичных антител были приготовлены на ФБ. Стандартные контроли включали материал, инкубированный только с вторичными антителами. Далее материал отмывали трижды ФБ от красителя и заключали в среду Vectashield (Vector, США), препятствующую выгоранию флуорохрома и содержащую флуоресцентный маркер ДНК – DAPI (Dyachuk et al., 2015).

Световая и конфокальная микроскопия

Морфологический анализ клеточных культур был проведен при помощи инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия) с $100\times$ масляным иммерсионным объективом или при помощи инвертированного микроскопа СКХ 41 (Olympus, Япония), оборудованных цветной цифровой камерой AxioCam 105 (Carl Zeiss). Фотографии клеток были получены в двух параллельных образцах на 10 случайно выбранных микроскопических полях каждого эксперимента. Основной анализ и съемку препаратов культивированных клеток производили с помощью лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss), оснащенного аргонным и тремя диодными лазерами, Центра коллективного пользования (ЦКП) «Дальневосточный (ДВ) центр электронной микроскопии» ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Были использованы иммерсионные объективы EC Plan-Neofluar $40\times/1.30$ Oil, Plan Aplanachromat $63\times/1.40$ Oil, alpha Plan Aplanachromat $100\times/1.46$ Oil. Измерения объектов и дальнейшую обработку изображений производили соответственно с помощью программ AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) и Adobe Photoshop CS5 Extended 12.0.1 (Adobe Systems, США).

Оценка состояния клеток с помощью электронной микроскопии

Для трансмиссионной электронной микроскопии образцы оттаянных клеток моллюсков (30 мин и 4 ч после оттаивания) были центрифугированы при 600 g в течение 5 минут. Затем осадки вкалывали в кусочки агарозы ($0,8\%$, $3\text{--}5\text{ мм}^3$), промывали МВ и фиксировали в растворе, содержа-

шем 2%-ный глютаральдегид (Sigma), 100 мМ HEPES-КОН, pH 7,4, 350 мМ NaCl, 140 мМ маннитол, в течение 2 ч при 16°C, промывали несколько раз в растворе, содержащем 100 мМ HEPES-КОН, pH 7,4, 350 мМ NaCl, 340 мМ маннитол. Осмотичность растворов для фиксации и промывок соответствовала осмотичности МВ – 34 %. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Leica EM UC6 (Leica Microsystems, Германия) и красили уранил ацетатом с последующей обработкой цитратом свинца. Остальные процедуры были проведены, как описано в работе (Yakovlev, 2016). Образцы анализировали под трансмиссионным электронным микроскопом Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss) ЦКП «ДВ центр электронной микроскопии» ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Статистический анализ

Файлы, полученные с помощью программного обеспечения CytExpert, были анализированы в программе Калюза (Software v.1,5a, Beckman-Coulter). Статистическая обработка результатов выполнена с применением одновариантного анализа (ANOVA) с последующим множественным сравнением с помощью программы Excel 2013 (Microsoft, США). Каждый эксперимент был выполнен не менее трех раз. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Полученные данные оценивали по спаренному *t*-критерию Стьюдента. Уровень значимости 0,05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

Результаты

Эффекты индукторов и ингибиторов апоптоза, а также замораживания-оттаивания, на клетки моллюсков

Ранее мы обнаружили высокую жизнеспособность контрольных незамороженных клеток и значительные различия в жизнеспособности клеток в зависимости от метода воздействия (рис. 1). Количество живых клеток уменьшалось с 83–87% (контрольные незамороженные клетки) до 75–80% (незамороженные клетки после воздействия STS) и 35–50% (незамороженные клетки после воздействия окислительного стресса). Жизнеспособность клеток после оттаивания достигала 60–65% для клеток, замороженных только с ДМСО (Odintsova et al., 2017). Самая низкая выживаемость клеток моллюсков после криоконсервации была обнаружена в тех случаях, когда использовали смесь проникающих и непроникающих кри-

опротекторов (жизнеспособность была более чем в 2 раза ниже, чем в контрольных незамороженных клетках) (рис. 1, Б).

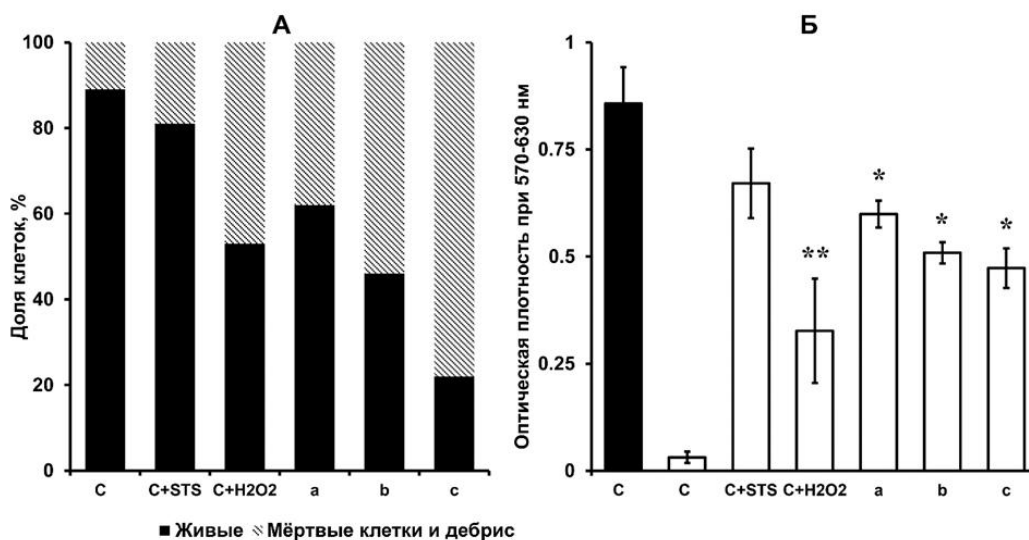


Рис. 1. Жизнеспособность клеток личинок мидии *Mytilus trossulus* до и после криоконсервации (30 мин после оттаивания), определенная с помощью теста по исключению трипанового синего (А) и МТТ теста (Б). Ключ обработок: контрольные незамороженные клетки (С); среда без клеток (С); незамороженные клетки после воздействия стауроспорина (С+STS); незамороженные клетки после воздействия окислительного стресса (С+H₂O₂); клетки, замороженные в присутствии 7% ДМСО (а); клетки, замороженные в присутствии 7% ДМСО и Тр (10 мг/мл) (б); клетки, замороженные в присутствии ДМСО, ЭГ (10%) и Тр, ПВП (10 мг/мл) (с). (Б) Полная черная штриховка – контрольные клетки (С), неокрашенные столбцы – экспериментальные клетки. Уровень значимости выбран как *P < 0,05 и **P < 0,01.

Почему клетки моллюсков погибают после замораживания-оттаивания? Клеточная смерть может быть связана с механическим разрушением клеток, вызванным самим процессом замораживания-оттаивания, также как с активацией апоптоза или некроза, которые развиваются при последующем культивировании. Мы установили, что уровень активности каспаз, определенный с помощью FLICA™ реагента и проточной цитометрии, был низким в клетках моллюсков до замораживания, но после криоконсервации количество апоптозных клеток с высокой активностью каспаз значительно возросло (в зависимости от используемых криопротекторов). В отличие от контрольных незамороженных клеточных культур моллюсков, в которых доля клеток на стадии раннего апоптоза была около 3%, сразу после криоконсервации доля клеток на стадии раннего апоптоза возросла до 15–26% (в зависимости от типа криопротектора), а через 48 ч после

оттаивания это доля уменьшалась во всех использованных криопротекторах до 10–12%, так как часть клеток на стадии раннего апоптоза за эти несколько часов погибала, переходя на стадию позднего апоптоза и/или некроза.

На рисунке 2 представлены изменения активности клеток моллюсков в течение 6-48 часов после инкубации с индукторами или ингибиторами апоптоза, также как после цикла замораживания-оттаивания. Установлены существенные изменения в активности клеток моллюсков после инкубации с H_2O_2 в течение всего исследованного периода времени, тогда как ответ был незначительным или вообще отсутствовал после инкубации с известными для млекопитающих индукторами или ингибиторами апоптоза. Активность митохондрий клеток через 6 ч после замораживания-оттаивания была немного ниже таковой в контрольных незамороженных клетках, но через 24–48 ч культивирования после замораживания-оттаивания эта активность увеличивалась. Результаты выявили временной эффект добавленных компонентов, при этом, через 6 ч инкубации этот эффект был еще не выражен (время было недостаточно для развития эффектов тестируемых веществ), а после 48 ч многие клетки были уже разрушены и, как следствие, это приводило к уменьшению некоторой доли мертвых клеток. Таким образом, 24-часовой период был выбран как оптимальный, который мы и использовали в последующих экспериментах. САМ не увеличивал апоптоз в клетках моллюсков, но стабильно приводил к небольшому увеличению жизнеспособности клеток после замораживания-оттаивания. Среди тестированных индукторов апоптоза, только STS приводил к 10% уменьшению активности митохондрий (жизнеспособности клеток). Ингибиторы апоптоза не увеличивали жизнеспособность ни контрольных, ни экспериментальных клеток моллюсков.

2D-плоты культивированных в течение 24 ч после размораживания клеток моллюсков, окрашенных двумя комбинациями – FLICA® и DAPI для идентификации клеток на стадии раннего апоптоза (активация каспаз) и мертвых клеток, соответственно (А), и YO-PRO™-1 и DAPI для идентификации клеток на стадии позднего апоптоза (нарушения в целостности клеточной мембраны) и мертвых клеток, соответственно (Б), представлены на рисунке 3. Мы не стали проводить разделяющую черту между мертвыми клетками мидии (окрашенными DAPI) и клетками, погибшими в результате некроза.

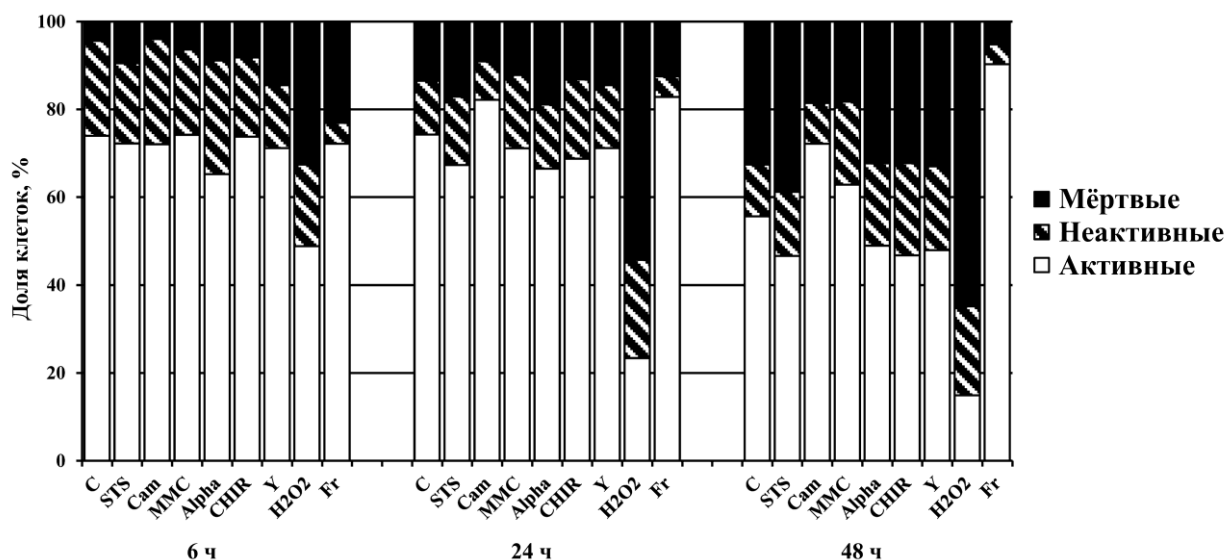


Рис. 2. Временная динамика изменений в состоянии клеток моллюсков после обработки с индукторами или ингибиторами апоптоза и после цикла замораживания-оттаивания. Клетки культивировали в течение 6, 24 и 48 ч. Активность митохондрий клеток (жизнеспособность) оценивали с помощью комбинации окрасок H_2DCFDA и DAPI. Ключ обработок: контрольные незамороженные клетки (C); клетки, в которых химически индуцирован апоптоз: после воздействия стауроспорина (STS), камптотецина (CAM), микостатина С (MMC); клетки, обработанные ингибиторами апоптоза: циклическим пифитрином (Alpha), CHIR99021 (CHIR), Y-27632 (Y); клетки, обработанные H_2O_2 (окислительный стресс); клетки, замороженные с 5% ДМСО (Fr). Стандартные отклонения меньше 5,0%.

Только четкие морфологические изменения, которые можно было наблюдать во всех клетках моллюсков после инкубации с тестируемыми веществами в течение 24 ч, представлены на рисунке 4. Эти изменения включали изменения в форме клеток, зависящие от их прикрепления. Инкубация с STS всегда приводила к массовому появлению округлых клеток и была связана с заметным уменьшением в плотности клеток как в контрольных культурах до замораживания, так и в культурах после замораживания-оттаивания. Замороженные и оттаянные клетки мидии, инкубированные с CAM или MMC, выглядели субъективно «здоровее», хотя четких различий в морфологии клеток по сравнению с контрольными клетками не было выявлено. После инкубации с тестируемыми ингибиторами апоптоза изменения в морфологии клеток были заметны только после инкубации с ингибитором апоптоза CHIR99021: многие клетки выглядели округлыми, хотя тоже четких различий в морфологии клеток по сравнению с контрольными замороженными-оттаянными клетками не было выявлено.

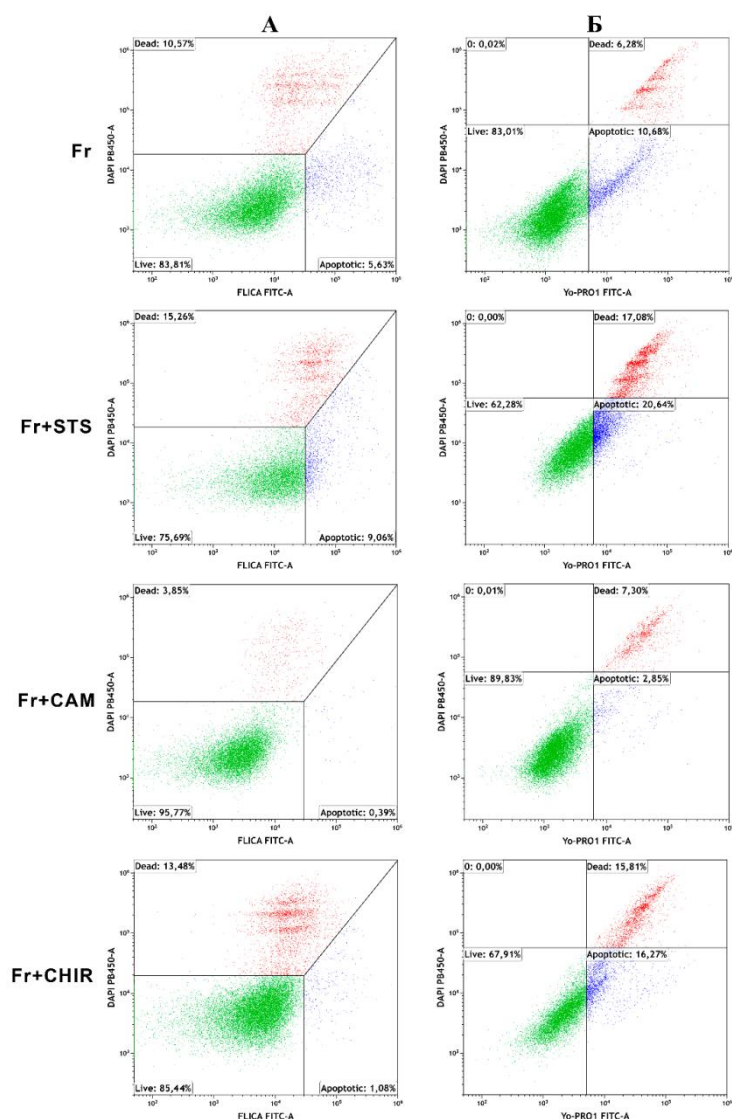


Рис. 3. 2D-плоты клеток личинок мидии *Mytilus trossulus*, культивированных после цикла замораживания-оттаивания в течение 24 ч. Клетки были окрашены FLICA и DAPI (А), или YO-PRO™-1 и DAPI (Б). Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman-Coulter, США). Ключ обработок: клетки, замороженные с 5% ДМСО (Fr); клетки после замораживания-оттаивания, в которых химически индуцирован апоптоз: после воздействия стауроспорина (Fr+STS), камптотецина (Fr+CAM); клетки после замораживания-оттаивания, обработанные ингибитором апоптоза CHIR99021 (Fr+CHIR).

Несмотря на все преимущества проточной цитометрии, «золотым стандартом» для конечной классификации способов клеточной смерти считают трансмиссионную электронную микроскопию (Pozarowski et al., 2003). На этом основании мы провели ультраструктурный анализ морфологии клеток мидии после замораживания-оттаивания, выбрав самый худший вариант из тестируемых криопротекторных смесей, исходя из наименьшей жизнеспособности клеток.

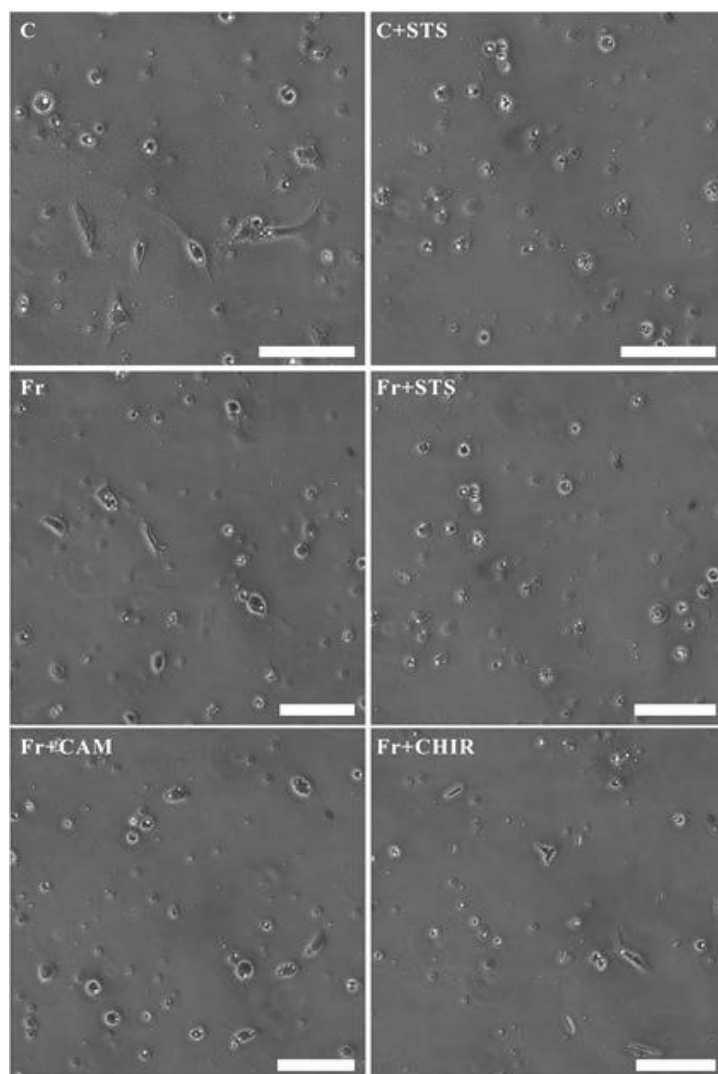


Рис. 4. Морфология клеток личинок мидии *Mytilus trossulus*, культивируемых в разных условиях в течение 24 ч. Образцы анализировали на инвертированном микроскопе СКХ41 (Olympus), оборудованном фазово-контрастной оптикой и цифровой камерой Аxiocam 105 (Carl Zeiss). Масштабная линейка: 20 мкм. *Ключ обработок:* контрольные незамороженные клетки (С); незамороженные клетки после воздействия стауроспорина (С+STS); клетки после замораживания-оттаивания (Fr); клетки после замораживания-оттаивания, в которых химически индуцирован апоптоз: после воздействия стауроспорина (Fr+STS), камптотецина (Fr+CAM); клетки после замораживания-оттаивания, обработанные ингибитором апоптоза CHIR99021 (Fr+CHIR).

Морфология живых и мертвых клеток в культурах мидии была сходна на обоих сроках тестирования (30 мин и 4 ч после оттаивания), поэтому мы представляем результаты, полученные в культурах клеток личинок мидии только через 30 мин после оттаивания. Наши результаты показали, что в препаратах мидии после замораживания-оттаивания присутствуют четыре основные популяции клеток: живые клетки, апоптозные клетки, мертвые клетки, погибшие в результате некроза или замораживания-оттаивания

(рис. 5). Многие клетки содержали липофусциновые гранулы (*l*). На рисунке 5 А представлен агрегат живых клеток мидии, в которых видны целые мембраны и хорошо выраженное ядро (*n*). На рисунке 5 Б обнаружена живая клетка мидии с фагосомой (*ph*), в которой происходит фагоцитоз клеточных остатков мертвых и поврежденных клеток. Фагоцитирующая клетка в культуре первичноротых подтверждает эволюционный консерватизм фагосомального пути (Kiss, 2010). В разрушенных после криоконсервации клетках отсутствовала цитоплазма, и только иногда сохранялись остатки поврежденной цитоплазматической мембраны (рис. 5 В). Для некротических клеток характерны разрушенная клеточная мембрана, некоторая агрегация хроматина и присутствие вакуолей или липофусциновых гранул в цитоплазме (рис. 5 Г). В апоптотических клетках (рис. 5 Д), количество которых зависело от используемого криопротектора, клеточная мембрана сохраняла свою целостность, цитоплазма содержала большое количество вакуолей и была сильно конденсированной; в ядрах наблюдали гетерохроматинизацию, а вокруг ядер присутствовали компактные структуры с упорядоченными цистернами эндоплазматического ретикулума (ЭР). Эти структуры хорошо видны при большем увеличении (рис. 5 Е). Подобные структуры обнаружены впервые и отсутствуют в апоптотических клетках моллюсков после других стрессовых воздействий (Sokolova, 2009; Pichon et al., 2013). Присутствие заметно конденсированной цитоплазмы и четкого ЭР в апоптотических клетках после криоконсервации подтверждает известный факт увеличения плотности клеток и уменьшения их объема при апоптозе. Более того, недавно стало известно, что при длительном стрессе сам ЭР может индуцировать апоптоз (Wu, 2012).

Дополнительно, для анализа возможных повреждений клеток моллюсков после замораживания-оттаивания, мы провели оценку пролиферативной активности в культурах клеток личинок мидии. Моллюски – это животные с очень ранним типом детерминации всех зародышевых листков. При такой ранней детерминации очень трудно получить делящиеся клетки. Тем не менее, митозы были обнаружены в длительно-переживающих культурах (до 5–6 месяцев) клеток моллюсков (Odintsova, Khomenko, 1991). Количество митотических клеток в незамороженных культурах было низким и едва достигало 1,0–1,5%. После замораживания-оттаивания в клетках моллюсков общее количество митозов достоверно падало и находилось примерно на одном уровне, независимо от используемых криопротекторов, – 0,4–0,7%, при этом иногда встречались митотические клетки с цитогенетическими нарушениями, такими как клетки с мультиполярным веретеном деле-

ния, а также с полным отсутствием тубулинового цитоскелета, в том числе, и веретена деления (рис. 6) (Odintsova et al., 2017).

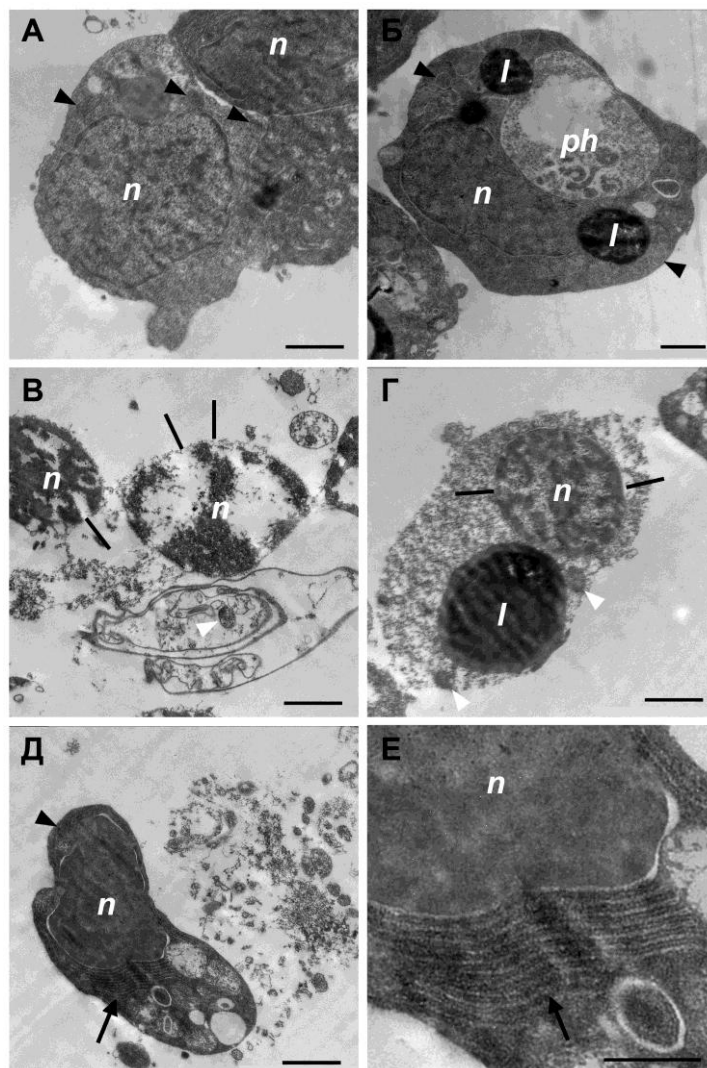


Рис. 5. Ультраструктура клеток личинок мидии *Mytilus trossulus* через 30 мин после замораживания-оттаивания. Образцы анализировали на трансмиссионном электронном микроскопе Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). (А, Б) Живые клетки; (Б) живая клетка с фагосомой (*ph*), содержащей клеточный дебрис; (В) разрушенные мертвые клетки без цитоплазмы; (Г) некротическая клетка; (Д) апоптотическая клетка; (Е) часть апоптотической клетки при более высоком разрешении. Стрелка указывает на многослойный стек цистерн ЭР. Черные линии показывают участки поврежденной ядерной мембраны (В, Г). Черные стрелки-головки указывают на неповрежденные митохондрии. Белые стрелки-головки указывают на поврежденные митохондрии. *n* – ядро; *l* – липофусциновые гранулы; *ph* – фагосома. Масштабная линейка: А – Д, 1 мкм; Е, 0,5 мкм.

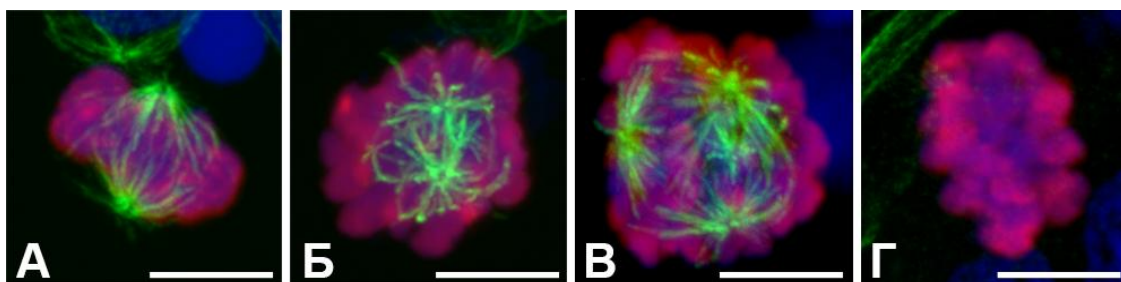


Рис. 6. Иммунодетекция митотических (фосфо-гистон H3-положительных) клеток в культуре личинок мидии *Mytilus trossulus* со стадии трохофоры до и после замораживания. Препараты получены с помощью конфокальной микроскопии (конфокальный микроскоп Zeiss LSM 780). Контрольные незамороженные клетки (А) и клетки после замораживания (Б, В, Г) культивировали на стеклянных покровных стеклах в морской воде, содержащей 2% эмбриональной бычьей сыворотки и инсулин (50 мкг/мл), в течение 12–24 ч, а затем красили антителами против фосфорилированного гистона H3 для выявления митотических клеток и α -тубулина для выявления микротрубочек. Ядра были окрашены DAPI. Масштабная линейка: 10 мкм.

Даже при использовании оптимальных криопротекторов (раствор 5–7% ДМСО без всяких добавок) были обнаружены ядерные нарушения, которые следует учитывать при оценке эффективности криоконсервации. Появление таких аномалий в дальнейшем может привести к анеуплоидии (Таблица 1).

Таблица 1

Количество митозов и ядерных аномалий до и после замораживания в культурах клеток мидии *Mytilus trossulus*

	Кол-во митотических клеток, (%)	Нормальное веретено деления, (%)	Отсутствие веретена деления, (%)	Мультиполярное веретено деления, (%)
Контрольные незамороженные клетки	1,21 ± 0,16	92,5 ± 2,50	4,58 ± 2,08	0,83 ± 0,00
Клетки, замороженные с ДМСО	0,58 ± 0,12	59,44 ± 8,06	38,81 ± 7,98	1,75 ± 0,08
Клетки, замороженные с ДМСО + Тр	0,60 ± 0,22	59,44 ± 4,26	36,11 ± 6,30	1,39 ± 0,74
Клетки, замороженные с ДМСО +ЭГ + Тр + ПВП	0,58 ± 0,13	67,85 ± 2,98	29,55 ± 2,88	2,60 ± 0,10

Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение.

На рис. 7 А отчетливо видно, что количество апоптозных клеток на ранней стадии апоптоза в культурах мидии значительно увеличивается после замораживания, причем самыми эффективными агентами были как само замораживание (Fr), так и индуктор апоптоза стауроспорин (Fr+STS). САМ увеличивал количество живых клеток после оттаивания и слегка уменьшал количество апоптозных клеток (Fr+САМ); ММС показал сходные результаты, но его эффект был менее выражен (Fr+ММС). Достоверный эффект снижения количества апоптозных клеток был обнаружен только после инкубации с ингибитором апоптоза CHIR99021 (Fr+CHIR), который уменьшал количество апоптозных клеток на стадии раннего апоптоза (1,0% по сравнению с 5,6% в контрольных клетках после замораживания-оттаивания), но увеличивал количество мертвых клеток (13,48% по сравнению с 9,57% в контрольных клетках после замораживания-оттаивания).

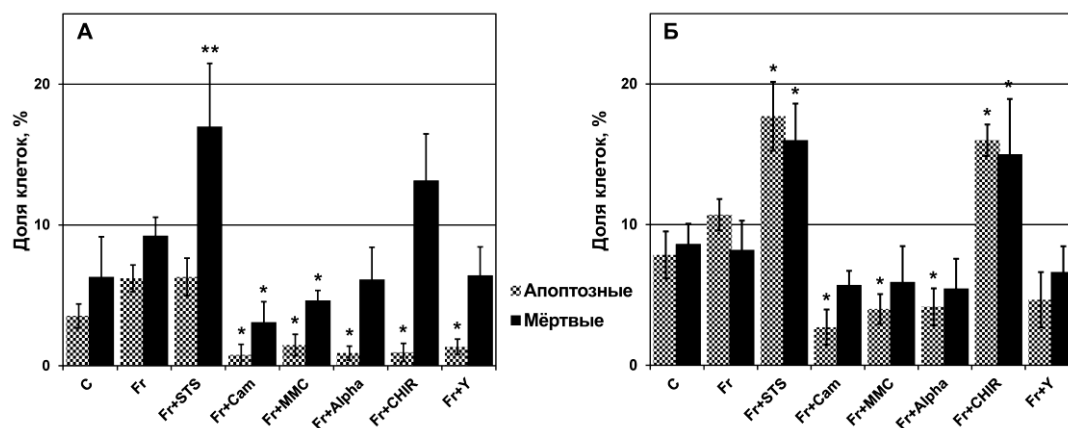


Рис. 7. Анализ апоптоз-связанной флуоресценции и некроз-связанной флуоресценции в клетках мидии *Mytilus trossulus* до и после замораживания. Клетки культивировали в течение 24 ч, красили, используя две комбинации красителей - FLICA® в сочетании с DAPI (А) или YO-PRO™-1 в сочетании с DAPI (Б). Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman-Coulter, США). Ключ обработок: контрольные незамороженные клетки (С); клетки, замороженные с 7% ДМСО (Fr); замороженные-оттаянные клетки, в которых химически индуцирован апоптоз: после воздействия стауроспорина (Fr+STS), камптотецина (Fr+САМ), микостатина С (Fr+ММС); замороженные-оттаянные клетки, инкубированные с ингибиторами апоптоза: циклическим пифитрином (Fr+Alpha), CHIR99021 (Fr+CHIR), Y-27632 (Fr+Y). *P < 0,05 и **P < 0,01.

На стадии позднего апоптоза (рис. 7 Б) количество апоптозных клеток продолжало увеличиваться, даже в контроле, достигая максимальных значений после замораживания, особенно после инкубации со стауроспорином (Fr+STS) и, как ни странно, после инкубации с ингибитором апоптоза CHIR99021 (Fr+CHIR). В этих же случаях значительно увеличивалось ко-

личество мертвых клеток. Индукторы апоптоза для клеток млекопитающих (САМ и ММС), также как два других тестируемых ингибитора апоптоза (Alpha и Y), уменьшали достоверно количество апоптозных клеток в культурах моллюсков после замораживания по сравнению с незамороженными клетками, причем все эти агенты снижали количество мертвых клеток, приводя к небольшому увеличению жизнеспособности после замораживания-оттаивания.

Эффекты индукторов/ингибиторов апоптоза на клетки млекопитающих

Из двух клеточных систем млекопитающих, выбранных в качестве положительных контролей, именно мышинные фибробласты, MEFs (первичная культура), представляют собой гетерогенную модельную систему, сходную с первичной культурой клеток личинок моллюсков. Поэтому сначала представлены результаты инкубации MEFs с тестируемыми веществами (оценка была проведена с помощью двух комбинаций окрасок FLICA®- DAPI или YO-PRO™-1-DAPI с последующим анализом на проточном цитометре) (рис. 8). Количество апоптозных клеток возрастало после инкубации с индукторами апоптоза (STS или САМ) и падало после инкубации с ингибиторами апоптоза на стадии раннего и позднего апоптоза (рис. 8А, Б), тогда как количество апоптозных клеток резко возросло при окислительном стрессе.

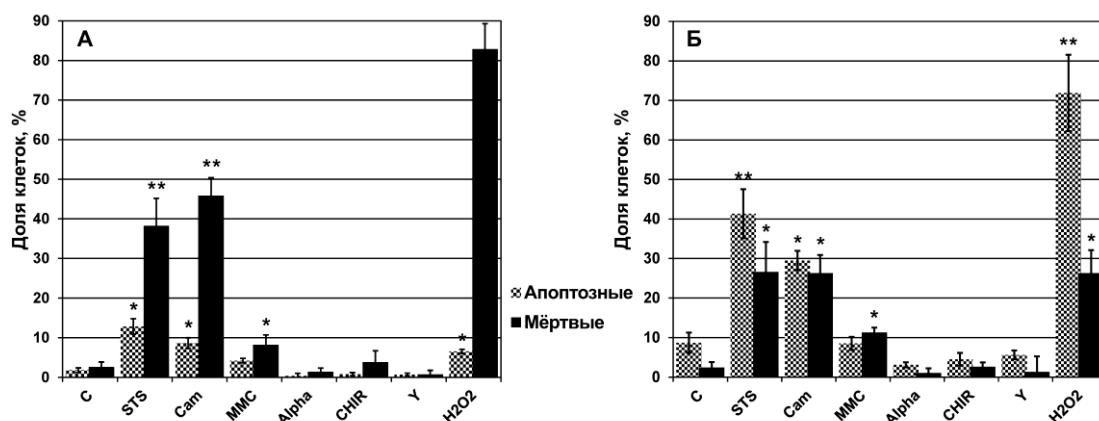


Рис. 8. Анализ апоптоз-связанной флуоресценции и некроз-связанной флуоресценции в мышинных эмбриональных фибробластах (MEFs).

Клетки культивировали в течение 24 ч, красили, используя две комбинации красителей - FLICA® + DAPI (А) или YO-PRO™-1 + DAPI (Б).

Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX. *Ключ обработок:* контрольные клетки (С); клетки, в которых химически был индуцирован апоптоз: после воздействия стауроспорина (STS), камптотецина (САМ), микостатина С (ММС); клетки, инкубированные с ингибиторами апоптоза: циклическим пифитрином (Alpha), CHIR99021 (CHIR), Y-27632 (Y); клетки, инкубированные с H₂O₂. *P < 0,05 и **P < 0,01.

Уменьшение апоптоза после инкубации с ингибиторами апоптоза было более заметно в НСТ 116 клетках, особенно после предварительной инкубации со STS (рис. 9), однако, в этом случае, количество мертвых клеток значительно возрастало. В этой системе также количество апоптозных и мертвых клеток резко возрастало при окислительном стрессе.

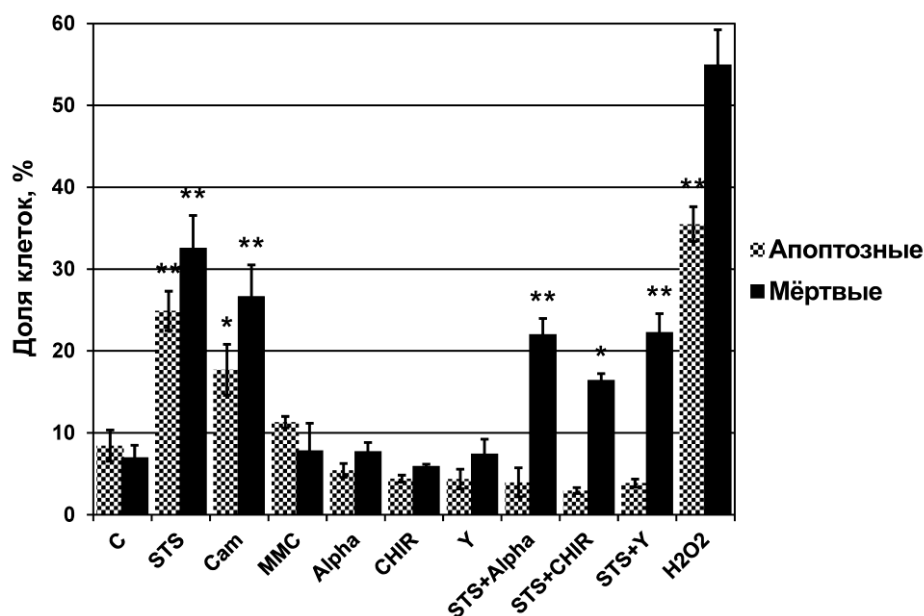


Рис. 9. Анализ апоптоз-связанной флуоресценции и некроз-связанной флуоресценции в опухолевых клетках человека (НСТ 116).

Клетки культивировали в течение 24 ч, красили FLICA® в сочетании с DAPI. Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX.

Ключ обработок: контрольные клетки (C); клетки, в которых химически был индуцирован апоптоз: после воздействия стауроспорина (STS), камптотецина (CAM), микостатина С (MMC); клетки, инкубированные с ингибиторами апоптоза: циклическим пифитрином (Alpha), CHIR99021 (CHIR), Y-27632 (Y); предварительно обработанные STS клетки и затем инкубированные с ингибиторами апоптоза: STS+Alpha, STS+CHIR, STS+Y; клетки, инкубированные с H₂O₂. *P < 0,05 и **P < 0,01.

Заклучение

При воздействии холодого стресса происходят существенные изменения в клетках личинок моллюсков, и они гибнут как в результате механического разрушения клеток, которое было связано с самим процессом замораживания, так и в результате активации некроза или апоптоза, которые развиваются после замораживания-оттаивания, поэтому важно использовать комплексный набор маркеров для контроля состояния клеток. Доля погибших клеток моллюсков увеличивалась по мере культивирования, причем 8–24 % клеток обнаружено на стадии раннего апоптоза в за-

висимости от времени после размораживания и метода оценки. Благодаря разработанным протоколам удается сохранять живыми и функционально активными до 65% клеток личинок двустворчатых моллюсков от их количества до замораживания. В данной работе, как альтернатива тестам, которые пока не могут быть выполнены на целых животных, были использованы исследования *in vitro*, выполненные на клетках личинок двустворчатых моллюсков, до и после замораживания в жидком азоте.

Недавно установлено, что два главных пути апоптоза, описанные для позвоночных животных, также присутствуют у двустворчатых моллюсков (Estévez-Calvar et al., 2013), хотя механизмы холодового повреждения у моллюсков до сих пор неизвестны. При различных видах стресса могут быть задействованы различные молекулярные механизмы апоптоза. На это указывают ранее полученные противоречивые результаты при анализе активности каспаз в клетках моллюсков, предположительно находящихся в апоптозе, с использованием общих каспазных ингибиторов (например, FLICA™ реагента) (Romero et al., 2011). Ранее каспазные гены, участвующие в каспаз-специфических ответах на патогены или поллютанты, были описаны при развитии апоптоза у мидии *M. galloprovincialis* (Romero et al., 2015). Но активность каспазы-3 (хотя каспаза-3 является ключевым ферментом в апоптозной деструкции клеток) отсутствовала в гемоцитах устрицы в результате кадмий-индуцированного апоптоза (Sokolova, Pörtner, 2001). Не исключено, что различные факторы стресса по-разному влияют на активность каспаз морских моллюсков, даже у близкородственных видов.

В клетках после стресса, денатурированные белки либо деградируют с помощью клеточных протеаз либо восстанавливаются с помощью молекулярных шаперонов (Wickner et al., 1999). Ранее было показано, что экспрессия HSP70 белков комаров из семейства *Chironomidae* не увеличивается при температурном стрессе или экспозиции с тяжелыми металлами (Yoshimi et al. 2009), но количество убиквитинированных белков у мидий *M. trossulus* было значительно выше при тепловой, а не холодовой акклимации (Buckley et al. 2001). Белки-шапероны могут быть основной причиной адаптаций биохимической машины антарктических моллюсков к низким, но стабильным температурам (Clark et al., 2008), однако, участие шаперонов в сохранении клеток моллюсков при криогенных температурах неизвестно. По сравнению с тепловой акклимацией, холодовая акклимация

крабов индуцировала большие изменения в экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в связывание с ДНК и РНК, а также в регуляцию транскрипции и трансляции (Ronges et al., 2012). Более того, известно, что при холодной акклимации происходят изменения в фосфолипидах у двустворчатых моллюсков (Pernet et al., 2007).

Нам удалось установить возможность модуляции уровня апоптоза в клетках моллюсков. В отличие от контрольных культур моллюсков, в которых число клеток на стадии раннего апоптоза было около 2,9%, сразу после криоконсервации даже с оптимальным криопротектором для моллюсков (5% ДМСО) количество клеток на стадии раннего апоптоза возросло до 24% (Odintsova et al., 2017), а через несколько часов после оттаивания это количество уменьшалось до 10–12%, так как часть клеток на стадии раннего апоптоза за эти несколько часов погибала, переходя на стадию позднего апоптоза и/или некроза (Odintsova et al., 2017).

Используя только проточную цитометрию, сложно получить реальные цифры количества апоптозных клеток в культурах моллюсков, но привлечение дополнительных данных, полученных на клетках млекопитающих, значительно повышает достоверность результатов. С помощью проточной цитометрии можно идентифицировать апоптозные, живые и мертвые клетки моллюсков после различных видов воздействия. Среди тестированных индукторов апоптоза только STS достоверно приводил к очевидному апоптозу в клетках моллюсков. Первоначально это вещество было обнаружено в морских актиномицетах (Omura et al., 1977), а позже изолировано из таксономически далеко расположенных друг от друга групп морских беспозвоночных, таких как асцидии и брюхоногие моллюски (Kinzel, Scheuer, 1992; Horton et al., 1994; Cantrell et al., 1999; Schupp et al., 2002). Присутствие веществ, подобных STS, в тканях морских беспозвоночных, включая ткани некоторых моллюсков, могло бы объяснить его значительный апоптозный эффект на клетки моллюсков, но STS не влиял на индукцию апоптоза в гемоцитах устрицы *C. gigas* (Lacoste et al., 2002). Вторым тестированным индуктором, САМ, не увеличивал апоптоз в клетках моллюсков, но воспроизводимо приводил к небольшому увеличению жизнеспособности клеток после замораживания-оттаивания. Третьим известным для млекопитающих индуктором, ММС, показал сходные результаты с САМ. Таким образом, мы обнаружили индукторы апоптоза, которые работают как в клетках млекопитающих, так и в клетках

моллюсков, и, по-видимому, могут проявлять еще неизвестные для клеток моллюсков эффекты.

Анализ всех используемых нами методов для оценки состояния клеток после замораживания-оттаивания показал, что наиболее информативными подходами для исследования клеток личинок моллюсков после криоконсервации являются электронная микроскопия и выявление апоптотных клеток с помощью проточной цитометрии. Кроме того, анализ ядерных нарушений может стать полезным инструментом для идентификации различных механизмов приспособления морских гидробионтов к изменению условий среды. Для многих типов животных установлено, что после различных стрессовых ситуаций происходят изменения в пролиферации и дифференцировке клеток.

До сих пор отсутствует информация о реальных сигнальных путях, ведущих к активации апоптоза у моллюсков после холодового стресса. На этой ступени исследования мы только приближаемся к ответу на вопрос, каков механизм холодового повреждения у моллюсков. Мы обнаружили, что STS и холодовой стресс вызывают апоптоз в культурах клеток моллюсков. Однако, мы не смогли найти ингибиторы апоптоза (среди тестированных ингибиторов апоптоза, которые, по литературным данным, значительно снижают апоптоз в клетках млекопитающих после разнообразных стрессовых воздействий), способные значительно уменьшить апоптоз после цикла замораживания-оттаивания в культурах клеток моллюсков. Возможно, это связано с тем, что количество генов, кодирующих белки, участвующие в защите клеток моллюсков, намного больше, чем в клетках человека или морских ежей (Zhang et al., 2012). Отсутствие эффекта ингибитора апоптоза Y-27632 на количество апоптотных клеток в культурах моллюсков после замораживания ставит под вопрос роль сигнального пути, в котором задействованы серин-треониновые протеазы. Другие апоптотные ингибиторы, известные для клеток млекопитающих за счет воздействия на p53-зависимый сигнальный путь, показали только слабо положительный (или даже негативный) эффект на количество апоптотных клеток и жизнеспособность клеток моллюсков. Однако, экспрессия гена *p53* в клетках устрицы после обработки одним из используемых нами ингибиторов апоптоза, циклического пифитрина- α , сильно менялась после воздействия такого фактора стресса, как УФ-облучение (Estévez-Calvar et

al., 2013). Возможно, использованные нами концентрации ингибиторов апоптоза не достаточны для развития нужных эффектов.

Данное направление является одним из подходов к длительному сохранению видов морских животных.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность всем сотрудникам лаборатории клеточных технологий ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН за постоянную помощь на всех этапах исследования, предоставление экспериментальных данных и обсуждение полученных результатов. Отдельная благодарность к.б.н. А.В. Бороде за помощь в оформлении.

Список литературы

Кирик О., Безнин Г., Коржевский Д. Маркеры пролиферации, применяемые в гистологических исследованиях // Морфология. 2009. Т. 136, № 6. С. 95–100.

Матишов Г., Берестовский Е., Мартынов В., Балыкин П. Перспективные методы сохранения популяционного разнообразия проходных видов лососевых рыб в северных и дальневосточных регионах России // Вестник МГТУ. 2010. Т. 13, №4/1. С. 647–654.

Ambroise G., Portier A., Roders N., et al. Subcellular localization of PU-MA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma B cells // Oncotarget. 2015. Vol. 6. P. 38181–38194.

Bissoyi A., Nayak B., Pramanik K., Sarangi S.K. Targeting cryopreservation-induced cell death: a review // Biopreserve Biobank. 2014. Vol. 12. P. 23–34.

Boroda A.V., Kipryushina Y.O., Odintsova N.A. Chemical modulation of apoptosis in molluscan cell cultures // Cell Stress and Chaperones. 2019. V. 24, N 5. P. 905–916.

Buckley B.A., Owen M-E., Hofmann G.E. Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history // J. Exp. Biol. 2001. Vol. 204. P. 3571–3579.

Buckland-Nicks J., Tompkins G. Paraspermatogenesis in *Ceratostoma foliatum* (Neogastropoda): confirmation of programmed nuclear death // J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol. 2005. Vol. 303. P. 723–741.

Cantrell C.L., Groweiss A., Gustafson K.R., Boyd M.R. A New staurosporine analog from the prosobranch mollusk *Coriocella nigra* // Nat. Prod. Res. 1999. Vol.14. P. 39–46.

Clark M.S., Fraser K.P.P., Peck L.S. Antarctic marine molluscs do have an HSP70 heat shock response // Cell Stress and Chaperones. 2008. Vol. 13. P. 39–49.

Dyachuk V.A., Maiorova M.A., Odintsova N.A. Identification of beta integrin-like- and fibronectin-like proteins in the bivalve mollusk *Mytilus trossulus* // Dev., Growth & Differ. 2015. Vol. 57, № 7. P. 515–528.

Dyachuk V., Odintsova N. Development of the larval muscle system in the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca, Bivalvia) // Dev., Growth & Differ. 2009. Vol. 51. P. 69–79.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // Toxicol. Pathol. 2007. Vol. 35. P. 495–516.

Ellis J. Proteins as molecular chaperones // Nature. 1987. Vol. 3 (28). P. 378–379.

Estévez-Calvar N., Romero A., Figueras A., Novoa B. Genes of the mitochondrial apoptotic pathway in *Mytilus galloprovincialis* // PLOS One. 2013. Vol. 8. P. e61502.

Fields P.A., Zuzow M.J., Tomanek L. Proteomic responses of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation // J. Exp. Biol. 2012. Vol. 215. P. 1106–1116.

Gaitanaris G.A., Papavassiliou A.G., Rubock P., et al. Renaturation of denatured λ repressor requires heat shock proteins // Cell. 1990. Vol. 61. P. 1013–1020.

Halpin P.M., Sorte C.J., Hofmann G.E., Menge B.A. Patterns of variation in levels of Hsp70 in natural rocky shore populations from Microscales to Mesoscales // Integr. Comp. Biol. 2002. Vol. 42. P. 815–824.

Hartl F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding // Nature. 1996. Vol. 381. P. 571.

Hofmann G., Somero G. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus* // J. Exp. Biol. 1995. Vol. 198. P. 1509–1518.

Hofmann G.E., Somero G.N. Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M.*

galloprovincialis: evidence from the heat-shock response and protein ubiquitination // *Mar. Biol.* 1996. Vol. 126. P. 65–75.

Hofmann G.E. Patterns of *Hsp* gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales // *Integr. Comp. Biol.* 2005. Vol. 4(5). P. 247–255.

Horton P.A., Longley R.E., McConnell O.J., Ballas L.M. Staurosporine aglycone (K252-c) and arcyriaflavin A from the marine ascidian, *Eudistoma sp* // *Experientia.* 1994. Vol. 50. P. 843–845.

Kim H., Kim A., Cunningham K.W. Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) promotes vacuolar membrane permeabilization and nonapoptotic death in stressed yeast // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, № 23. P. 19029–19039.

Kinnel R.B., Scheuer P.J. 11-Hydroxystaurosporine: a highly cytotoxic, powerful protein kinase C inhibitor from a tunicate // *J. Org. Chem.* 1992. Vol. 57. P. 6327–6329.

Kiss T. Apoptosis and its functional significance in molluscs // *Apoptosis.* 2010. Vol. 15. P. 313–321.

Koropatnick T., Goodson M.S., Heath-Heckman E.A., McFall-Ngai M. Identifying the cellular mechanisms of symbiont-induced epithelial morphogenesis in the squid-vibrio association // *Biol. Bull.* 2014. Vol. 226. P. 56–68.

Koropatnick T.A., Kimbell J.R., McFall-Ngai M.J. Responses of host hemocytes during the initiation of the squid-Vibrio symbiosis // *Biol. Bull.* 2007. Vol. 212. P. 29–39.

Lacoste A., Cueff A., Poulet S.A. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate β -adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells // *J. Cell Sci.* 2002. Vol. 115. P. 761–768.

Lindquist S. The heat-shock response // *Ann. Rev. Biochem.* 1986. Vol. 55. P. 1151–1191.

Lockwood B.L., Connor K.M., Gracey A.Y. The environmentally tuned transcriptomes of *Mytilus* mussels // *J. Exp. Biol.* 2015. Vol. 218. P.1822–1833.

Lockwood B.L., Sanders J.G., Somero G.N. Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success // *J. Exp. Biol.* 2010. Vol. 213. P. 3548–3558.

Marión R.M., Strati K., Li H., et al. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity // *Nature.* 2009. Vol. 460. P. 1149–1153.

Martin J., Langer T., Boteva R., et al. Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate // *Nature*. 1991. Vol. 352. P. 36.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Amer. J. Cell Physiol.* 1984. Vol. 247. P. C125–C142.

McGee H.A., Martin W.J. Cryochemistry // *Cryogenics*. 1962. Vol. 2. P. 257–267.

Mehlen P., Schulze-Osthoff K., Arrigo A.-P. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis: Heat Shock Protein 27 Blocks Fas/Apo-1- and Staurosporine-Induced cell death // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 16510–16514.

Mondy W.L., Pierce S.K. Apoptotic-like morphology is associated with annual synchronized death in kleptoplastic sea slugs (*Elysia chlorotica*) // *Invert. Biol.* 2003. Vol. 122. P. 126–137.

Morimoto R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators // *Genes & Dev.* 1998. Vol. 12. P. 3788–3796.

Morris E.J., Geller H.M. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity // *J. Cell Biol.* 1996. Vol. 134. P. 757–770.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays // *J. Immunol. Methods* 1983. Vol. 65. P. 55–63.

Odintsova N.A., Khomenko A.V. Primary cell culture from embryos of the Japanese scallop *Mizuchopecten yessoensis* (Bivalvia) // *Cytotechnol.* 1991. Vol. 6 (1). P. 49–54.

Odintsova N., Tsal L. Cryopreservation of primary cell cultures of Bivalvia // *Cryo-Lett.* 1995. Vol. 16. P. 13–20.

Odintsova N.A., Ageenko N.V., Kipryushina Yu.O., Maiorova M.A., et al. Freezing tolerance of sea urchin embryonic cells: Differentiation commitment and cytoskeletal disturbances in culture // *Cryobiology*. 2015. Vol. 71. P. 54–63.

Odintsova N.A., Boroda A.V., Velansky P.V., Kostetsky E.Y. The fatty acid profile changes in marine invertebrate larval cells during cryopreservation // *Cryobiology*. 2009. Vol. 59. P. 335–343.

Odintsova N.A., Boroda A.V., Maiorova M.A., Yakovlev K.V. The death pathways in mussel larval cells after a freeze-thaw cycle // *Cryobiology*. 2017. Vol. 77. P. 41–49.

Omura S., Iwai Y., Hirano A., et al. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization // *J. Antibiot.* 1977. Vol. 30. P. 275–282.

Peh G.S.L., Adnan K., George B.L., et al. The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 9167.

Pernet F., Tremblay R., Comeau L., Guderley H. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodeling of membrane lipids // *J. Exp. Biol.* 2007. Vol. 210. P. 2999–3014.

Peterson S., Loring J.F., Wesselschmidt R.L., Schwartz P.H. (Eds) Human stem cell manual: A Laboratory Guide, 1st ed. Academic Press, Elsevier, London, 2007, 488 p.

Pichon D., Cudennec B., Huchette S., et al. Characterization of abalone *Haliotis tuberculatae*-*Vibrio harveyi* interactions in gill primary cultures // *Cytotechnol.* 2013. Vol. 65. P. 759e772.

Pirnia F., Schneider E., Betticher D.C., Borner M.M. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway // *Cell Death Differ.* 2002. Vol. 9. P. 905–914.

Pozarowski P., Huang X., Halicka D., et al. Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: A caution in data interpretation // *Cytometry*. 2003. Vol. A 55. P. 50–60.

Przeslawski R., Byrne M., Mellin C. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae // *Global Change Biol.* 2015. Vol. 21. P. 2122–2140.

Romero A., Estevez-Calvar N., Dios S., Figueras A., et al. New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis* // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. P. e17003.

Romero A., Novoa B., Figueras A. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. Vol. 46. P. 79–87.

Ronges D., Walsh J.P., Sinclair B.J., Stillman J.H. Changes in extreme cold tolerance, membrane composition and cardiac transcriptome during the first day of thermal acclimation in the porcelain crab *Petrolisthes cinctipes* // *J. Exp. Biol.* 2012. Vol. 215. P. 1824–1836.

Russo J., Madec L. Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant // Cell Tissue Res. 2007. Vol. 328. P. 431–441.

Schultz D.R., Harrington W.J. Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level // Semin Arthritis Rheum. 2003. Vol. 32. P. 345–369.

Schupp P., Proksch P., Wray V. Further New Staurosporine Derivatives from the Ascidian *Eudistoma todealensis* and Its Predatory Flatworm *Pseudoceros* sp. // J. Nat. Prod. 2002. Vol. 65. P. 295–298.

Skowrya D., Georgopoulos C., Zylicz M. The *E. coli* dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner // Cell. 1990. Vol. 62. P. 939–944.

Sokolova I., Evans S., Hughes F. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition // J. Exp. Biol. 2004. Vol. 207. P. 3369–3380.

Sokolova I.M., Pörtner H.O. Physiological adaptations to high intertidal life involve improved water conservation abilities and metabolic rate depression in *Littorina saxatilis* // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2001. Vol. 224. P. 171–186.

Sokolova I. Apoptosis in molluscan immune defense // Invert. Survival J. 2009. Vol. 6. P. 49–58.

Söti C., Sreedhar A.S., Csermely P. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: chaperone occupancy as a potential switch // Aging Cell. 2003. Vol. 2. P. 39–45.

Sun Z. Cardiovascular responses to cold exposure // Front. Biosci. 2010. (Elite Ed.) Vol. 2. P. 495–503.

Sunila I., LaBanca J. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* // Dis. Aqua. Org. 2003. Vol. 56. P.163–170.

Tanghe A., Teunissen A., Van Dijck P., Thevelein J.M. Identification of genes responsible for improved cryoresistance in fermenting yeast cells // Int. J. Food Microbiol. 2000. Vol. 55 (1-3). P. 259–262.

Voronezhskaya E.E., Nezlin L.P., Odintsova N.A., et al. Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // Zoomorphology. 2008. Vol. 127. P. 97–110.

Wickner S., Maurizi M.R., Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins // Science. 1999. Vol. 286. P. 1888–1893.

Wlodkowic D., Telford W., Skommer J., Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death // *Meth. Cell Biol.* 2011. Vol. 103. P. 55–98.

Wu J. Molecular responses to environmental stresses // *J. Mol. Cell Biol.* 2012. Vol. 4. P. 60–65.

Yakovlev K.V. Localization of germ plasm-related structures during sea urchin oogenesis // *Dev. Dynam.* 2016. Vol. 245. P. 56–66.

Yao C-L., Somero G.N. The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *M. californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signalling pathways // *J. Exp. Biol.* 2012. Vol. 215. P. 4267–4277.

Yoshimi T., Odagiri K., Hiroshige Y., et al. Induction profile of HSP70-cognate genes by environmental pollutants in Chironomidae // *Envir.Toxicol. Pharmacol.* 2009. Vol. 28. P. 294–301.

Zeiss C.J. The apoptosis-necrosis continuum: Insights from genetically altered mice // *Veter. Pathol.* 2003. Vol. 40. P. 481–495.

Zhang G., Fang X., Guo X., et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation // *Nature.* 2012. Vol. 490. P. 49–54.

Zhivotovsky B. Apoptosis, necrosis and between // *Cell Cycle.* 2004. Vol. 3. P. 63–65.

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ГЕМОЛИМФЫ В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРА
В МОНИТОРИНГЕ СОСТОЯНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ
ПРИМОРСКОГО ГРЕБЕШКА
MIZUHOPECTEN YESSOENSIS**

*А.А. Анисимова, И.А. Дмитриева,
Ю.Н. Сокольникова,
А.В. Гринченко, В.Г. Спудулите*

*Дальневосточный федеральный университет,
Владивосток 690091*

*E-mails: anisimova.aa@dvfu.ru, dmitrieva.ia@dvfu.ru,
sokolnikova.yu.n@dvfu.ru, grinchenko.av@dvfu.ru,
spudulite.vg@students.dvfu.ru*

**PROSPECTS FOR THE USE OF HEMOLYMPH
IN MONITORING THE STATE OF POPULATIONS
OF YESSO SCALLOP MIZUHOPECTEN YESSOENSIS**

*A.A. Anisimova, I.A. Dmitrieva, Yu.N. Sokolnikova,
A.V. Grinchenko, V.G. Spudulite*

*Far Eastern Federal University,
Vladivostok 690091*

*E-mails: anisimova.aa@dvfu.ru, dmitrieva.ia @dvfu.ru,
sokolnikova.yu.n@dvfu.ru, grinchenko.av@dvfu.ru,
spudulite.vg@students.dvfu.ru*

Возможность использования гемолимфы двустворчатых моллюсков в качестве биомаркера рассматривается давно, однако для разработки методов гематологической диагностики требуются надежные критерии, дифференцирующие норму и патологию. Поиск таких критериев подразумевает всесторонний анализ состава и морфофункциональных свойств гемолимфы, а также оценку состояния ге-

нома в гемоцитах при различных условиях. Одним из подходов является сравнение популяций, обитающих в районах с разным уровнем антропогенной нагрузки.

В настоящей работе мы проводим сравнительный анализ гемолимфы приморских гребешков *Mizuhopecten yessoensis* из двух модельных акваторий зал. Петра Великого – зал. Восток (условно фоновый район) и

Спортивная гавань Амурского залива (импактный район).

У гребешков из Спортивной гавани зарегистрированы следующие ответы на антропогенный стресс: пятикратное снижение числа циркулирующих клеток, двукратное повышение количества клеточных фрагментов, увеличение размера и гранулярности гемоцитов, повышение продукции активных форм кислорода (АФК), снижение фагоцитоза, литической активности гемоцитов и концентрации общего белка в гемолимфе. И в зал. Восток, и в Спортивной гавани обнаружена массовая полиплоидизация гемоцитов.

Полученные результаты обсуждаются с точки зрения возможности применения ряда показателей для экспресс-диагностики состояния гребешков, в том числе в целях экологического мониторинга.

Using bivalve hemolymph as a biomarker has been considered for a long time. However, reliable criteria differentiating between the norm and pathology are required to develop hemolymph-based diagnostic methods. Searching for these criteria involves a comprehensive analysis of the hemolymph composition,

structure and function of hemocytes, as well as their genome state in various conditions. In this relation, it would be fruitful to compare populations living in areas differing in anthropogenic impact.

In the present study, we performed a comparative analysis of hemolymph obtained from Yesso scallops *Mizuhopecten yessoensis* from two parts of the Peter the Great Bay, Vostok Bay (background area) and Sportivnaya Harbor (Amursky Bay) (impact area).

The scallops from the Sportivnaya Harbor displayed the following responses to anthropogenic stress: a fivefold decrease in the number of circulating cells and a twofold increase in the number of cell fragments; an increase in the hemocyte size, granularity, and reactive oxygen species (ROS) production; a decrease in phagocytic and lytic activity of hemocytes; a drop in the total protein concentration in hemolymph. Both in the Vostok Bay and Sportivnaya Harbor, massive polyploidization of hemocytes was found.

We discuss potential use of some of the differences presently found for rapidly testing scallop state for various purposes including environmental monitoring.

Введение

Возможность применения гемолимфы двустворчатых моллюсков в качестве биомаркера давно рассматривается в литературе (см. обзоры: Анисимова, 2013; Oliver, Fisher, 1999; Chu, 2000; Auffret, 2005; Donaghy et al., 2009b; Matozzo, Gagné, 2016). В последние годы биомаркеры предлагаются использовать не только для оценки состояния природных экосистем, но и для контроля качества морских хозяйств (Pellizzato, Da Ros, 2005; Moschino et al., 2010; Matozzo et al., 2018). Гемолимфа отвечает за поддержание гомеостаза и формирование физиологических адаптаций моллюсков к меняющимся условиям обитания, включая реакции врожденного (неспецифического) иммунитета. Иммунная система *Bivalvia* представлена подвижными амeboидными клетками – гемоцитами, а также различными гуморальными факторами, растворенными в гемолимфе. За счет способности к фагоцитозу, продукции активных форм кислорода (АФК) и других веществ гемоциты играют важнейшую роль в иммунной защите, переносе и переваривании нутриентов, процессах репарации и реструктуризации тканей. Нарушение работы этих клеток приводит к изменению физиологического состояния моллюсков, в том числе к снижению иммунного статуса и резистентности к патогенам (см. обзоры: Анисимова, 2013; Cheng, 1981; Sminia, van der Knaap, 1987; Auffret, 1988; Hine, 1999; Chu, 2000; Canesi et al., 2002, 2006; Tiscar, Mosca, 2004; Pruzzo et al., 2005; Ottaviani, 2006; Donaghy et al., 2009b).

Общее количество гемоцитов в циркуляции, их размер и пропорция морфотипов могут сильно различаться у моллюсков разных видов. С другой стороны, морфологические и функциональные (иммунологические) параметры гемолимфы демонстрируют значительную внутривидовую вариабельность, поскольку существенно зависят от факторов негенетической природы – температуры воды, стадии полового цикла, наличия инфекций, уровня антропогенного загрязнения и т.д. (см. обзоры: Анисимова, 2013; Cheng, 1981; Sminia, van der Knaap, 1987; Oliver, Fisher, 1999; Chu, 2000; Canesi et al., 2002; Auffret, 2005; Donaghy et al., 2009b). Кроме того, важным показателем здоровья клеточной популяции гемоцитов является стабильность генома в клетках гемолимфы. Геномные мутации (анеу- и полиплоидия) возникают в результате неконтролируемых изменений митотического цикла и могут указывать на серьезные нарушения процессов репродукции и дифференцировки клеток, включая злокаче-

венную трансформацию. Классическим примером малигнизации у двустворчатых моллюсков является гемопоэтическая неоплазия (Elston et al., 1990; Moore et al., 1991; Reno et al., 1994; Collins, 1998; Da Silva et al., 2005; Delaporte et al., 2008; Vassilenko, Baldwin, 2014; Carella et al., 2017) – фатальное заболевание, сходное с лейкемией позвоночных животных. Таким образом, как морфофункциональные, так и цитогенетические параметры клеток гемолимфы должны иметь большое диагностическое значение в мониторинге состояния популяций двустворчатых моллюсков.

Однако для разработки методов гематологической диагностики необходимо использовать действительно надежные критерии, уверенно дифференцирующие норму и патологию. Поиск таких критериев подразумевает всесторонний анализ гемолимфы (включающий комплексную оценку морфофункциональных свойств гемоцитов и определение их генетического статуса) в различных условиях, и одним из подходов является сравнение показателей у животных, обитающих в районах с разным уровнем стрессовой нагрузки.

В настоящей работе мы проводим сравнительный анализ гемоцитов приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857), ценнейшего объекта промысла и аквакультуры на Дальнем Востоке России, из двух модельных акваторий зал. Петра Великого – зал. Восток, который относится к условно фоновым районам (Христофорова и др., 2001; Журавель и др., 2012; Голозубова и др., 2017), и Амурского залива (район Спортивной гавани), воды которого омывают г. Владивосток и испытывают серьезное антропогенное воздействие (Ковековдова, Симоконь, 2004; Наумов, 2006; Черняев и др., 2006; Маркина, Айздайчер, 2011; Tkalin et al., 1993). Регистрация различных ответов со стороны гемолимфы на антропогенный стресс позволит рассматривать гематологические и иммунологические показатели в качестве потенциальных биомаркеров физиологического статуса гребешков, предложить методы экспресс-диагностики состояния здоровья моллюсков и рекомендовать их к использованию как в хозяйственных целях (повышение продуктивности морского промысла и аквакультуры), так и в целях экологического мониторинга.

Основная часть

Клеточная популяция гемоцитов *Bivalvia* морфологически неоднородна, в ее составе традиционно выделяют два основных клеточных морфотипа – агранулоциты (гиалиноциты) и гранулоциты (см. обзоры: Анисимова, 2013;

Cheng, 1981; Sminia, van der Knaap, 1987; Auffret, 1988; Hine, 1999; Canesi et al., 2002, 2006; Tiscar, Mosca, 2004; Pruzzo et al., 2005; Ottaviani, 2006; Donaghy et al., 2009b). Гиалиноциты всегда базофильны и распределяются на две размерные категории – малые и большие. Характерными признаками малых агранулярных клеток являются округлая форма, большое сферическое ядро (редко сегментовидное или гантелевидное), занимающее центральное положение в клетке и окруженное узким ободком цитоплазмы. Большие гиалиноциты также характеризуются относительно крупными ядрами, но при этом имеют большой объем цитоплазмы базофильного характера. Такие клетки часто образуют ламеллоподии и хорошо распластываются на субстрате. Гранулоциты могут различаться размерами, иметь округлую или амебоидную форму, проявлять преимущественно базофильную или эозинофильную реакцию. Согласно данным ультраструктурного анализа, гранулоциты, по сравнению с гиалиноцитами, имеют не большое сильно гетерохроматинизированное ядро и слабо развитый аппарат белкового синтеза (ШЭР, аппарат Гольджи), а в их цитоплазме присутствуют многочисленные включения разной величины и электронной плотности (Дзюба, Романова, 1992; Sminia, van der Knaap, 1987; Sajaraville, Pal, 1995). Многие авторы также выделяют клетки, морфологически промежуточные между гиалиноцитами и гранулоцитами; такие переходные клеточные формы были описаны в гемолимфе *Crassostrea virginica* (см. Goedken, DeGuise, 2004), *Mytilus galloprovincialis* (см. Mix, 1976; Ottaviani et al., 1998; Garcia-Garcia et al., 2008), *Modiolus kurilensis* (см. Анисимова, 2012) и других *Bivalvia*.

Гистогенетические отношения между разными формами гемоцитов двустворчатых моллюсков до сих пор неясны; относительно схемы гемопоэза существует два противоположных мнения. Согласно одной из гипотез, гранулоциты и гиалиноциты представляют собой независимые клеточные субпопуляции и, соответственно, параллельные ряды дифференцировки (Cheng, 1981; Auffret, 1988). Другая точка зрения предполагает наличие одного морфофункционального типа клеток, дифференцировка которых связана с последовательным созреванием гиалиноцитов в гранулоциты путем постепенного накопления гранул (Mix, 1976; Ottaviani et al., 1998; Hine, 1999). Последняя гипотеза подтверждается не только указанными выше морфологическими особенностями гемоцитов, но и рядом функциональных различий. Так, гранулоциты, по сравнению с гиалиноцитами, характеризуются

более высоким уровнем фагоцитарной активности и продукции АФК (Pipe et al., 1997; Wootton et al., 2003; Garcia-Garcia et al., 2008). Авторадиографический анализ показал, что гиалиноциты представляют собой активную в отношении пролиферации стадию дифференцировки, в то время как гранулоциты в норме не включают ^3H -тимидин (Дзюба, Романова, 1992; Mix, 1976; Wootton et al., 2003), хотя и сохраняют способность к пролиферации в ответ на воздействие митогенов (Wootton et al., 2003).

Соотношение гранулярных и агранулярных форм в гемолимфе двустворчатых моллюсков значительно варьирует у разных представителей класса. Преобладание гранулоцитов над агранулоцитами характерно для *Mytilus edulis* (см. Rasmussen et al., 1985), *Mytilus galloprovincialis* (см. Carballal et al., 1998), *Modiolus kurilensis* (см. Анисимова, 2012), *Mercenaria mercenaria* (см. Foley, Cheng, 1974; Allam et al., 2002), *Mya arenaria* (см. Huffman, Tripp, 1982), *Anodonta cygnea* (см. Soares-da-Silva et al., 2002), *Ruditapes philippinarum* (см. Allam et al., 2002), *Corbicula japonica* (см. Анисимова и др., 2017). Обратные отношения зарегистрированы у устриц: так, у *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* (см. Chagot, 1989), *Crassostrea virginica* (см. Feng et al., 1971; Allam et al., 2002) и *Crassostrea ariakensis* (см. Donaghy et al., 2009a) количество гиалиноцитов значительно превышает количество гранулоцитов. Что касается гемограммы представителей семейства Pectinidae, данные о соотношении клеток разных морфотипов противоречивы. Согласно одним наблюдениям, клеточная популяция гемоцитов гребешков преимущественно представлена агранулярными клетками. Исключительно гиалиноциты (малые и большие) были обнаружены в гемолимфе *Chlamys varia* (см. Auffret, 1988) и *Nodipecten subnodosus* (см. Estrada et al., 2013). С другой стороны, у *Chlamys farreri* (см. Jing, Wenbin, 2005; Liu et al., 2009; Xing et al., 2014) и *Mizuhopecten yessoensis* (см. Дзюба, Романова, 1992) авторы различают субпопуляцию гранулоцитов, хотя доля этих клеток невелика. Данные могут расходиться даже для одного и того же объекта: так, в обзоре Ченга (Cheng, 1981) гемоциты *Pecten maximus* традиционно дифференцируются на гиалиноциты и гранулоциты, в то время как в другой работе (Auffret, 1988) наличие гранулярных форм в гемолимфе гребешков этого вида опровергается. Для *Argopecten purpuratus* также показано наличие гранулоцитов, но авторы не указывают их долю среди всех циркулирующих клеток (González, Arenas, 2002).

Подробное описание гемоцитов приморского гребешка из зал. Петра Великого приводится в работе Дзюбы и Романовой (1992). Согласно этому описанию, в гемолимфе *M. yessoensis* на долю гранулярных клеток приходится около 4% циркулирующих гемоцитов. Гранулоциты представляют собой овальные клетки размером 9–15 мкм, с гиперхромным ядром бобовидной или палочковидной формы, расположенным эксцентрично. Цитоплазматические включения различаются размерами и электронной плотностью; в некоторых клетках этого ряда включения представлены 1–2 крупными глобулами. Данный морфотип, судя по описанию, представляет собой терминальную стадию дифференцировки. Подавляющее же большинство гемоцитов авторы относят к агранулярным клеткам и классифицируют их по размерам: малые агранулоциты (1,5–6 мкм в диаметре, рассматриваются как бластные формы) и большие агранулоциты (7–16 мкм в диаметре, стадия ранней дифференцировки), при этом в последних не исключается наличие мелкой зернистости. Согласно нашим результатам, гемоциты приморского гребешка действительно весьма слабо дифференцируются на морфотипы. На мазках гемолимфы, фиксированной 4% параформальдегидом, как неокрашенных, так и окрашенных по Романовскому–Гимзе, практически не удавалось различить типичные гранулоциты – видимо, ввиду их малого количества. Все гемоциты представляли собой единый морфотип – агранулярный, иногда с мелкой диффузной зернистостью и преимущественно базофильной реакцией цитоплазмы; форма клеток варьировала от округлой до распластанной; часто встречались клетки характерной каплевидной формы, что, скорее всего, соответствует начальной стадии формирования псевдоподии (рис. 1).

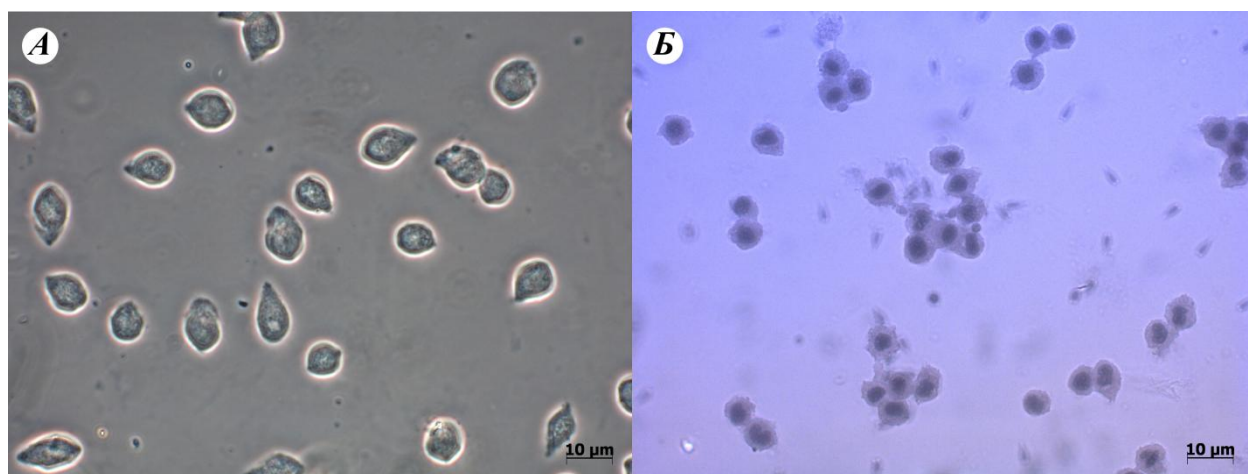


Рис. 1. Общая морфология гемоцитов *Mizuhopecten yessoensis*. Световая микроскопия. А – фазовый контраст; Б – окраска по Романовскому–Гимзе.

Анализ клеточного состава гемолимфы приморского гребешка методом проточной цитометрии показал, что гемоциты отличаются по параметрам переднего (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, т.е. их размеры и гранулярность варьируют. Однако популяция гемоцитов характеризовалась высокой степенью однородности. Если не брать в расчет обособление на гистограмме небольшой группы клеток с минимальными значениями FSC и SSC (соответствуют малым бластоподобным агранулоцитам), четкой кластеризации на отдельные субпопуляции не наблюдалось (рис. 2).

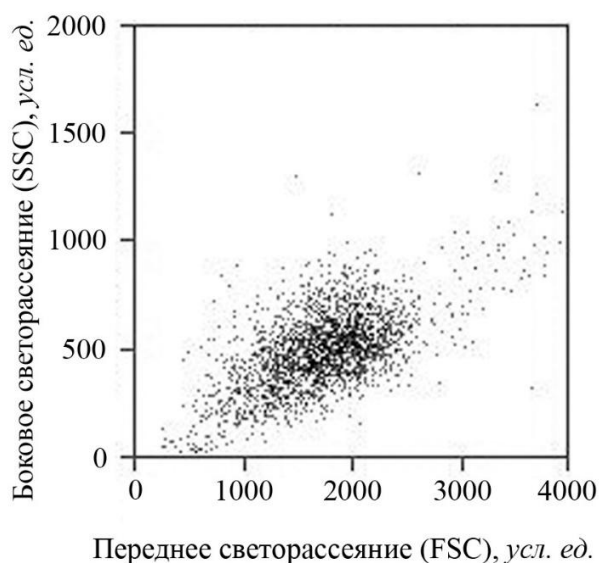


Рис. 2. Распределение гемоцитов *Mizuhopecten yessoensis* по размеру (переднее светорассеяние) и гранулярности (боковое светорассеяние) методом проточной цитометрии.

Мы не исключаем тот факт, что отсутствие гранулоцитов в циркуляции может носить характер сезонного явления. Материал, использованный в работе Дзюбы и Романовой (1992), был собран в чистой акватории вблизи о. Попова, в период с мая по сентябрь 1986–1987 гг. В нашей работе исследовались гребешки, собранные в мае–июле 2017 г. в зал. Восток и Спортивной гавани Амурского залива. В обоих случаях время взятия материала совпало с периодом максимальной половой активности приморского гребешка (завершение гаметогенеза и нерестовая стадия), а, как известно, количество клеток (как абсолютное, так и относительное) в гемолимфе *Bivalvia* зависит от стадии полового цикла. Ранее мы наблюдали значительное, но обратимое снижение доли гранулоцитов в гемолимфе корбикулы японской (*Corbicula japonica* Prime, 1864) во время нереста

(Анисимова и др., 2017). В некоторых других полевых исследованиях авторы отмечали уменьшение общей концентрации гемоцитов в летний сезон – в связи с энергетическим дефицитом на фоне гаметогенеза (Delaporte et al., 2006), а также миграцией клеток в период нереста из гемолимфы в половые железы, где они участвуют в резорбции гамет и реструктуризации самих гонад (Pipe et al., 1995; Fisher et al., 1996). Кроме того, летний сезон характеризуется максимальным уровнем развития инфекций и паразитарных инвазий, что также требует присутствия активных фагоцитов в очагах повреждения. Таким образом, учитывая синхронизацию нереста с периодом высоких температур и массовых эпизоотий, а также принимая во внимание наиболее высокую активность гранулоцитов в отношении фагоцитоза (Pipe et al., 1997; Wootton et al., 2003; Garcia-Garcia et al., 2008), исчезновение гранулярных клеток из циркуляции может отражать миграционные процессы, приводящие к резкому перераспределению гемоцитов между гемолимфой и внутренними органами.

Анализ концентрации клеток в гемолимфе приморского гребешка выявил высоко достоверные ($p < 0.0001$) различия у животных из двух исследованных акваторий (см. таблицу). Концентрация клеток у гребешков из зал. Восток в пять раз превышала концентрацию клеток у животных из Спортивной гавани. Средние значения количества клеток в 1 мкл гемолимфы составили $10221,79 \pm 1120,57$ и $1890,48 \pm 384,80$ для зал. Восток и Спортивной гавани соответственно. Оценивая концентрацию клеток методом проточной цитометрии, мы попутно обратили внимание на существенную разницу в количестве дебриса (мелкий мусор, включающий фрагменты разрушенных клеток), который всегда присутствует в клеточных суспензиях (см. таблицу). Доля этих событий в образцах гемолимфы гребешков из Спортивной гавани была в два раза выше по сравнению с образцами животных из зал. Восток, что может отчасти пояснять столь значительные различия в концентрации гемоцитов у моллюсков из двух районов. Корреляционный анализ подтвердил, что количество клеточных фрагментов находится в обратной зависимости от количества целых клеток ($R = -0.54$) и, следовательно, может выступать в качестве дополнительного оценочного критерия. Возможность использования показателей жизнеспособности гемоцитов в качестве индикатора физиологического статуса двустворчатых моллюсков обсуждается и в других работах – с акцентом на важность учета количества мертвых клеток для мониторинга

состояния популяций в случаях массовой гибели особей (Paillard et al., 1996; Soudant et al., 2004).

Содержание клеточных агрегатов в образцах гемолимфы гребешков из двух исследованных районов статистически не отличалось, что не позволяет нам расценивать агрегационную активность гемоцитов как информативный показатель антропогенного стресса (см. таблицу). Что касается среднего размера гемоцитов и степени их гранулярности, у гребешков из Спортивной гавани оба параметра были ненамного, но статистически значимо выше, чем у особей из зал. Восток (см. таблицу). Таким образом, в целом наблюдалась обратная пропорция между концентрацией клеток, с одной стороны, и их средним размером и гранулярностью, с другой, хотя достоверной корреляции выявлено не было из-за очень высокой индивидуальной вариабельности параметров, особенно в популяции зал. Восток. В то же время значимая обратная корреляция между общим количеством гемоцитов и их средним размером была отмечена в других работах. Так, у *Ruditapes philippinarum* увеличение концентрации клеток в гемолимфе, наблюдаемое в весенне-летний сезон, сопровождалось возрастанием доли молодых гемоцитов небольшого размера, что авторы связывают с увеличением скорости клеточных делений при повышении температуры воды (Soudant et al., 2004). Как было показано для *Mytilus edulis*, общее количество гемоцитов в циркуляторном русле действительно может резко возрастать в результате их быстрой пролиферации (Maugrand et al., 2005). Кроме того, в уже упомянутом исследовании Судана и соавторов (Soudant et al., 2004) была выявлена отрицательная корреляция между концентрацией клеток в гемолимфе и уровнем клеточной гибели, а также положительная корреляция между размерами гемоцитов и количеством мертвых клеток; оба факта согласуются с нашими наблюдениями. Есть основания полагать, что индекс кондиции (фактически отражающий состояние здоровья особи) находится в прямой связи с количеством циркулирующих клеток и в обратной – с долей мертвых гемоцитов; прямая корреляция между количеством мертвых клеток в гемолимфе и уровнем смертности моллюсков показана для *Crassostrea virginica* (см. Paillard et al., 1996) и *Ruditapes philippinarum* (см. Soudant et al., 2004). Таким образом, наши результаты позволяют сделать предварительный вывод о том, что гребешки из Спортивной гавани, с низкой концентрацией гемоцитов и высоким содержанием клеточных фрагментов, действительно испытыва-

ют значительный стресс, вызванный неблагоприятными условиями обитания, и имеют невысокий индекс кондиции. Хотя, с другой стороны, патологические процессы могут сопровождаться и всплесками митотической активности гемоцитов. Так, содержание *Ruditapes philippinarum* в присутствии токсичных видов динофлагеллят *Karenia selliformis* и *K. mikimotoi* приводило к повышению концентрации гемоцитов, уменьшению их размеров и гранулярности, а также снижению количества апоптотических клеток. Эта динамика, отражающая накопление в гемолимфе молодых гемоцитов, опять же, трактуется авторами как результат активации пролиферативных процессов, но уже в ответ на токсическое воздействие (Hégaret et al., 2007; Da Silva et al., 2008). Следовательно, высокая концентрация гемоцитов у гребешков из зал. Восток, в сочетании с их небольшими размерами и слабой гранулярностью, не может приниматься за норму a priori и требует тщательного анализа различных органов на предмет инфекций и инвазий.

Как уже упоминалось выше, наряду с изменением пролиферативного режима существенный вклад в изменение количества и соотношения клеток в гемолимфе моллюсков вносит двусторонняя миграция гемоцитов. Возможность активного перемещения гемоцитов из тканей в гемолимфу обсуждается некоторыми авторами в связи со стрессом различной природы. Так, быстрое возрастание концентрации гемоцитов в циркуляции наблюдали у *Mytilus edulis* при импульсном загрязнении фенолом (Renwranz, 1990), а также у *Chamelea gallina* при увеличении инфекционной нагрузки в условиях высоких температур (Monari et al., 2007). Однако следует принимать во внимание зависимость эффекта от дозы и времени воздействия стрессового фактора. Так, низкие концентрации кадмия вызвали некоторое снижение общего числа клеток в гемолимфе *Mytilus edulis*, тогда как при высоком его содержании количество гемоцитов в циркуляции существенно возрастало. Какого-либо значимого изменения уровня пролиферации гемоцитов при этом отмечено не было, поэтому повышение концентрации циркулирующих клеток могло произойти только вследствие их миграции из тканей в гемолимфу (Coles et al., 1995). В результате экспериментального инфицирования *Ruditapes philippinarum* бактериями *Vibrio tapetis* общее количество гемоцитов в циркуляторном русле моллюсков увеличивалось в течение первых двух недель после заражения, а затем уменьшалось в результате миграции клеток из гемолимфы в

тканевые очаги инфекции (Oubella et al., 1993, 1994; Paillard et al., 1994, 2004; Allam et al., 2000). Токсический эффект динофлагеллят *Karlodinium veneficum* у *M. edulis* проявлялся в увеличении в гемолимфе относительного количества молодых базофильных клеток и, соответственно, в уменьшении доли зрелых эозинофильных гранулоцитов, что, по мнению авторов, также объясняется миграцией наиболее активных фагоцитов из циркуляторного русла в пищеварительную железу – основной очаг инвазии (Galimany et al., 2008). Мониторинговые исследования также показывают, что хроническое воспаление и инфекции внутренних органов у двустворчатых моллюсков приводят к снижению концентрации клеток в гемолимфе вследствие перемещения гемоцитов в пораженные ткани. Такие эффекты были зарегистрированы, в частности, у *M. edulis* в одном из районов залива Ла Специя (Италия), неблагоприятном с точки зрения патогенной микрофлоры (Matozzo et al., 2018).

Таким образом, концентрация гемоцитов в циркуляторном русле, их средний размер и пропорция морфотипов зависят от соотношения уровней пролиферации, миграции и гибели клеток. У гребешков из зал. Восток увеличение количества гемоцитов в циркуляции может быть следствием как активной миграции клеток из тканей в гемолимфу, так и высоких темпов обновления клеточной популяции, однако небольшие размеры и невысокий уровень гранулярности клеток (в сравнении со Спортивной гаванью) говорят в пользу второго предположения. Резкое уменьшение числа гемоцитов у особей из Спортивной гавани, скорее всего, обусловлено высоким уровнем гибели клеток (например, в результате токсического воздействия среды) на фоне снижения пролиферативной активности гемобластов и/или активной миграции зрелых фагоцитов во внутренние органы (в связи с выраженной инфекционной нагрузкой).

Для оценки состояния клеточного звена неспецифического иммунитета гребешков из двух акваторий мы выбрали два основных функциональных параметра гемоцитов – фагоцитарная активность и уровень продукции АФК. Фагоцитарную активность определяли при помощи планшетного флуориметра по уровню суммарной флуоресценции от фиксированного количества клеток после проведения реакции *in vitro* фагоцитоза с мечеными бактериями, уровень продукции АФК – методом световой микроскопии по содержанию в клетках диформаза, который образуется путем восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в присутствии супероксид-

анионов в цитоплазме активных фагоцитов. Кроме прямого подсчета дискретных гранул диформаза мы также учитывали интенсивность фоновой окраски цитоплазмы, обусловленной присутствием мелкодисперсной интергранулярной фракции красителя. Дополнительно оценивали активность гуморального звена иммунитета – посредством гемолитической реакции (ГЛР) с использованием бесклеточной гемолимфы гребешков против эритроцитов человека с последующим спектрофотометрическим анализом выхода гемоглобина в раствор. Также определяли концентрацию общего белка в бесклеточной гемолимфе.

Анализ фагоцитарной активности выявил 1,5-кратное снижение уровня фагоцитоза у гребешков из Спортивной гавани Амурского залива по сравнению с особями из зал. Восток (см. таблицу). Также в условиях импактной акватории сниженными оказались показатели ГЛР и значения концентрации общего белка (см. таблицу). Что касается уровня продукции АФК, то достоверных различий по количеству гранул диформаза между акваториями выявлено не было (см. таблицу). В то же время наблюдалась значимая положительная корреляция ($R = 0,66$) между количеством гранул на клетку и площадью самих клеток, распластанных на стекле, а площади гемоцитов гребешков из Спортивной гавани были достоверно больше, чем у особей из зал. Восток, что подтверждается и данными проточной цитометрии (см. таблицу). Кроме того, значимые различия были обнаружены по содержанию интергранулярного диформаза: у особей из Спортивной гавани интенсивность фонового окрашивания цитоплазмы гемоцитов при проведении НСТ-теста оказалась выше (см. таблицу). Выборки характеризовались ненормальным распределением признаков, связанных с окислительной активностью гемоцитов. Наряду с особями с преобладанием мелких округлых гемоцитов и небольшим количеством НСТ-позитивных клеток (рис. 3, А, Г), встречались животные со средними показателями (рис. 3, Б, Д), а также особи с практически тотальной НСТ-активностью и крупными сильно распластанными фагоцитами с многочисленными гранулами и интенсивным диффузным окрашиванием периферических областей цитоплазмы (рис. 3, В, Е). И в зал. Восток, и в Спортивной гавани у некоторых животных в большом количестве обнаруживались клетки с экстремальными значениями содержания гранул, выбивавшимися за пределы пятого квартиля (более 200 гранул на клетку) (рис. 4).

**Цитологические, иммунологические
и биохимические параметры гемолимфы *Mizuhopecten yessoensis*
из зал. Восток и Спортивной гавани Амурского залива**

Параметры	Залив Восток	Спортивная гавань
Количество клеток в 1 мкл гемолимфы, шт.	10221,79 ± 1120,57*	1890,48 ± 384,80*
Содержание дебриса (клеточных фрагментов) в образцах гемолимфы, %	17,24 ± 2,02*	35,96 ± 3,41*
Содержание клеточных агрегатов в образцах гемолимфы, %	7,36 ± 0,37	9,07 ± 0,71
Размер клеток (FSC), усл. ед.	1109 ± 28*	1434 ± 27*
Гранулярность клеток (SSC), усл. ед.	337 ± 19*	460 ± 15*
Площадь распластывания клеток, усл. ед.	247 ± 7**	273 ± 11**
Фагоцитарная активность клеток, усл. ед.	134 ± 20*	85 ± 16*
Количество гранул диформаза на клетку, шт.	32,80 ± 0,96	37,25 ± 1,25
Количество дисперсного диформаза на клетку, усл. ед.	0,34 ± 0,02**	1,06 ± 0,02**
Гемолитическая активность клеток, %	19,71 ± 5,52**	12,83 ± 3,81**
Содержание общего белка в гемолимфе, г/мл	0,91 ± 0,07**	0,60 ± 0,08**

Примечание. Указаны средние арифметические значения со стандартными ошибками.

* Различия достоверны при $p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента (указаны для выборок, соответствующих нормальному распределению);

** Различия достоверны при $p < 0,05$ по U -критерию Манна-Уитни (указаны для выборок, не соответствующих нормальному распределению).

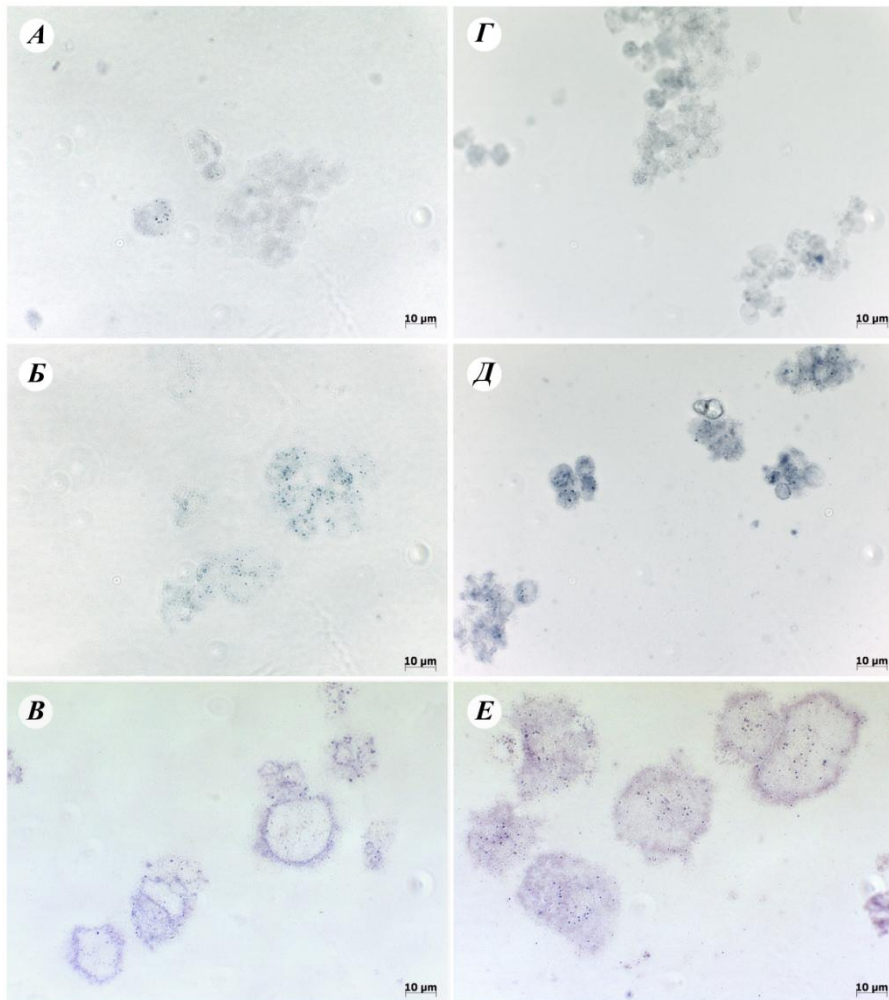


Рис. 3. Выявление АФК в гемоцитах *Mizuhopecten yessoensis* из зал. Восток (А–В) и Спортивной гавани Амурского залива (Г–Е) с помощью НСТ-теста по присутствию в клетках гранулярного и интергранулярного диформаза.

Таким образом, иммунологические показатели приморского гребешка также дифференцировали фоновую и импактную акватории. Известно, что различные виды загрязнений вызывают закономерные ответы и изменяют иммунный статус двустворчатых моллюсков, однако характер этих изменений зависит от типа загрязнителя, его дозы и времени воздействия. Низкий уровень загрязнения обычно производит иммуностимулирующий эффект, в то время как высокие концентрации загрязнителей оказывают противоположное действие, угнетая и истощая защитные функции организма (Cheng, Sullivan, 1984; Coles et al., 1995; Pipe, Coles, 1995; Dyrynda et al., 1998, 2000; Pipe et al., 1999; Matozzo et al., 2001; Gagnaire et al., 2007; Hannam et al., 2010). Так, экспозиция *Crassostrea virginica* с кобальтом (1 ppm), хромом (5 ppm), медью (5 ppm), железом (1 и 5 ppm), ртутью (0.1 ppm) и селеном (5 ppm) приводила к увеличению фагоцитарной актив-

ности гемоцитов, при этом ртуть в концентрации от 0.5 до 5 ppm подавляла фагоцитоз, а кадмий (1 и 5 ppm) не оказывал никакого эффекта (Cheng, Sullivan, 1984). Содержание *Mytilus edulis* в присутствии низких концентраций меди стимулировало выработку гемоцитами АФК, а в больших дозах этот же металл ингибировал высвобождение свободных радикалов, снижая устойчивость моллюсков к бактериальным инфекциям (Pipe, Coles, 1995; Pipe et al., 1999). Влияние экспериментального нефтяного загрязнения на иммунный статус гребешка *Chlamys islandica* проявлялось в кратковременных и обратимых эффектах, таких как увеличение числа циркулирующих гемоцитов (в течение 1–2 дней после экспозиции) и возрастание уровня фагоцитоза (на следующие сутки после экспозиции), при этом спустя несколько дней (4 и 2 соответственно) значения обоих параметров падали ниже контрольных, что сопровождалось снижением стабильности клеточных мембран и признаками окислительного стресса (Hannam et al., 2010).

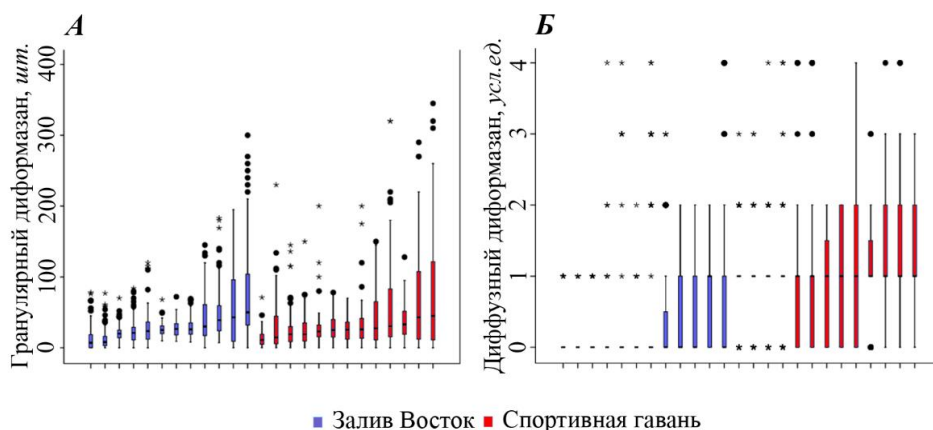


Рис. 4. Разброс индивидуальных значений продукции АФК гемоцитами *Mizuhopecten yessoensis* из зал. Восток и Спортивной гавани Амурского залива. Представлены графики типа «ящик с усами», медианы, квартильные размахи, лимиты и экстремальные выбросы. А – количество гранул диформазана на одну клетку; Б – интенсивность фонового окрашивания цитоплазмы, выраженная в условных ранговых величинах.

Исходя из наших данных и вышеизложенных тенденций, снижение фагоцитарной и литической активностей гемоцитов *Mizuhopecten yessoensis* в Спортивной гавани Амурского залива свидетельствует о выраженном хроническом загрязнении вод этой акватории. Это полностью согласуется с многочисленными данными по экологическому состоянию Амурского залива, которое постепенно ухудшалось в течение последних десятилетий (Ковековдова, Симоконь, 2004; Наумов, 2006; Черняев и др.,

2006; Нигматулина, 2007; Коршенко и др., 2010; Маркина, Айздайчер, 2011). Негативное влияние антропогенного стресса было показано и в отношении других физиологических показателей приморского гребешка, обитающего в импактных районах зал. Петра Великого. В частности, отклонения от нормальной физиологии *M. yessoensis* проявлялись в замедлении гаметогенеза, автолизисе и фагоцитозе половых клеток (ооцитов и сперматозоидов), появлении гермафродитизма (Vashchenko et al., 1997). В Амурском заливе изменения состояния гонад были отмечены и у ряда брюхоногих моллюсков (Сяпина, Щеблыкина, 2007), а также у морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* (см. Ващенко и др., 2005). Кроме того, в районах, характеризующихся наличием тяжелых металлов (б. Алексеева Амурского залива: Hg, Cu, Zn, Mn, Pb, Cd, Ni, Co, Cr), у приморского гребешка были обнаружены гистопатологии внутренних органов, мускула-аддуктора и жабр (Vashchenko et al., 2000). Учитывая, что тот же спектр поллютантов так или иначе присутствует и в водах Амурского залива, прилежащих к Владивостоку, включая Спортивную гавань, есть основания полагать, что состояние внутренних органов моллюсков в данной акватории также изменено. Таким образом, сдвиг иммунологических параметров *M. yessoensis* в сторону ослабления основных функций неспецифического иммунитета коррелирует с рядом других системных нарушений и является одним из маркеров измененного физиологического статуса.

Исследуя гемоциты приморского гребешка, мы не выявили ожидаемой корреляции между фагоцитарной активностью и уровнем производства АФК, хотя оба процесса в норме взаимосвязаны. Более того, у моллюсков из импактной акватории на фоне сниженного фагоцитоза наблюдалась тенденция к увеличению содержания супероксид-ионов в цитоплазме гемоцитов. Снижение фагоцитарной активности происходило при резком уменьшении числа клеток в циркуляторном русле. Учитывая высокий уровень продукции АФК и большое количество клеточных фрагментов в образцах гемолимфы гребешков из Спортивной гавани, мы можем связать снижение концентрации гемоцитов с их массовой гибелью. Положительная взаимосвязь между продукцией свободных радикалов клетками гемолимфы и гибелью самих гемоцитов была отмечена во многих исследованиях на двустворчатых моллюсках при моделировании стрессовых условий. В частности, такие эффекты наблюдались в экспериментах с отклонением температуры воды от оптимальных значений в обе стороны. Актив-

вация окислительного взрыва в сочетании с увеличением числа мертвых клеток имела место как при экстремальном повышении температуры у *Crassostrea virginica* (см. Hégarret et al., 2003, 2004), так и при ее снижении у *Mercenaria mercenaria* (см. Perrigault et al., 2011); в обоих случаях такие изменения сопровождались снижением фагоцитарной активности гемоцитов. Аналогичное действие на клетки гемолимфы *C. virginica* вызывало экспериментальное голодание (Hégarret et al., 2004). Таким образом, связь между фагоцитарной активностью и продукцией АФК может носить разный характер (быть как положительной, так и отрицательной) и интерпретируется неоднозначно. Что касается влияния загрязнений на жизнеспособность гемоцитов, то здесь выявляется вполне определенная взаимосвязь. Высокую гибель клеток наблюдали у *Mya arenaria* после 28 дней инкубации с соединениями ртути (Fournier et al., 2001). У *Ostrea edulis* при столь же длительном (30 дней) воздействии ртути в гемоцитах был выявлен ряд патологических изменений, предшествующих распаду клеток – конденсация хроматина, лизис цитоплазмы и нарушение целостности клеточных мембран; кроме того, было отмечено накопление гранул в цитоплазме гиалиноцитов и небольших гранулоцитов (Bigas et al., 2006). С этим последним фактом согласуются и наши данные о возрастании уровня гранулярности клеток гемолимфы приморского гребешка (наряду с увеличением их размеров) в условиях импактной акватории.

Анализ содержания ДНК в ядрах гемоцитов, окрашенных йодистым пропидием, методом проточной цитометрии (с использованием сперматозоидов в качестве гаплоидного эталона) выявил массовую полиплоидизацию клеток гемолимфы у приморского гребешка из обоих исследованных районов. И в зал. Восток, и в Спортивной гавани характер распределения гемоцитов по массе ДНК имел индивидуальные особенности. В гемолимфе были обнаружены клетки разных уровней ploидности – от 2 до 7 $n(c)$, включая все промежуточные значения, как кратные размеру генома, так и анеуплоидные, но их частотные распределения заметно различались у разных особей (рис. 5). В большинстве случаев на гистограммах регистрировался один доминантный пик, соответствующий клеткам определенного класса ploидности в G_1 -периоде митотического цикла, и некоторое количество клеток с другими значениями содержания ДНК. У ряда особей распределение G_1 -клеток по массе ДНК было бимодальным: помимо основного класса ploидности на гистограммах присутствовал второй, достаточ-

но выраженный пик. Некоторая часть клеток (от 2 до 20%) имели содержание ДНК, вдвое превышавшее модальное значение G_1 -пика; эти клетки располагались в зоне, соответствующей дуплетам гемоцитов основного класса плоидности, и, по всей видимости, соответствовали G_2 -периоду и митозу.

Разброс значений массы ДНК в ядрах G_1 -клеток основного класса плоидности, отражающий стабильность генома, был достаточно высоким у всех исследованных особей. Довольно часто доминантный пик распадался на несколько пиков второго порядка, т.е. представлял собой некий анеуплоидный ряд. Коэффициент вариации содержания ДНК в пределах одномодального G_1 -пика варьировал от 20,32 до 47,11% для зал. Восток (среднее значение составило $35,21 \pm 1,01\%$) и от 11,72 до 31,33% для Спортивной гавани ($25,15 \pm 1,19\%$), что показывает статистически значимые различия между акваториями. Однако в обоих исследованных районах внутрииндивидуальная вариабельность размера генома была слишком высока и выходила за рамки допустимых значений (4–8%), что свидетельствует о нестабильности генома, подразумевает наличие хромосомных aberrаций и массовую анеуплоидию (Bihari et al., 2003).

Ввиду сложного индивидуального характера распределения G_1 -клеток по содержанию ДНК, мы усреднили значения от отдельных гемоцитов для каждой особи (с учетом процентного соотношения клеток разной плоидности). В результате мы получили для каждого животного интегральный ДНК-индекс, отражающий масштаб полиплоидизации в клеточной популяции гемоцитов. Несмотря на то что в зал. Восток чаще, чем в Спортивной гавани, встречались животные с ДНК-индексом, превышающим 4 *c*, средние значения по обеим выборкам статистически не отличались. Кроме того, мы провели анализ частотного распределения особей по модальным классам плоидности с использованием статистического критерия отношения правдоподобия, который также не выявил достоверных различий, хотя характер этого распределения в каждой акватории имел свои особенности. В зал. Восток модальные значения содержания ДНК формировали протяженный ряд от 2,5 до 7 *c* без выраженного преобладания определенных классов плоидности и с тенденцией к кратности содержания ДНК размеру генома, в то время как в Спортивной гавани наиболее часто встречались особи с анеуплоидным модальным значением 3,5 *c*.

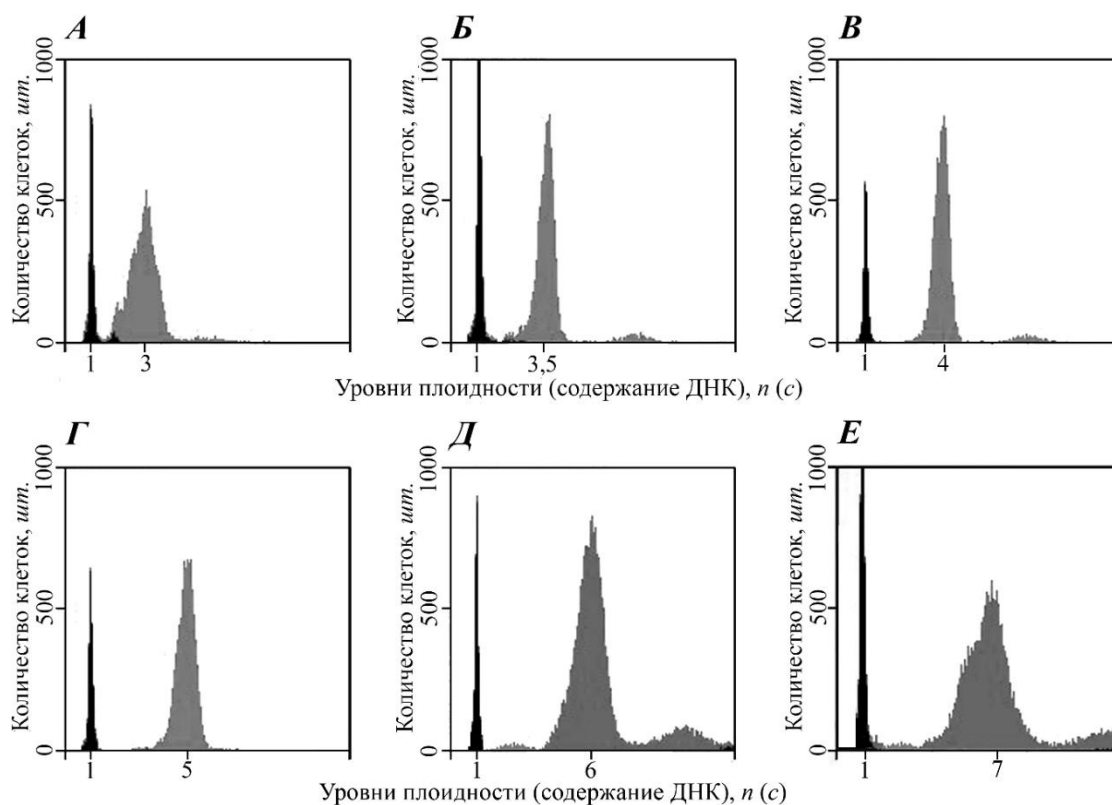


Рис. 5. Определение уровней плоидности (n) гемоцитов *Mizuhopecten yessoensis* по содержанию ДНК (c) относительно гаплоидного эталона (сперматозоиды *M. yessoensis*, $1n1c$). Проточная цитофлуорометрия. Окраска: йодистый пропидий.

Явление массовой полиплоидизации гемоцитов у двустворчатых моллюсков, как правило, рассматривается в свете проблемы гемопоэтической неоплазии – фатальной патологии, сходной с лейкемией позвоночных животных (Elston et al., 1990; Moore et al., 1991; Reno et al., 1994; Collins, 1998; Da Silva et al., 2005; Delaporte et al., 2008; Vassilenko, Baldwin, 2014; Carella et al., 2017). Гемопоэтическая неоплазия широко распространена среди *Bivalvia* по всему Мировому океану, ей подвержено не менее 15 видов (Elston et al., 1988, 1992; Peters, 1988; Barber, 2004; Carballal et al., 2015). Выявленные нами классы плоидности гемоцитов приморского гребешка представляют стандартный ряд значений, регистрируемых в неопластических клетках двустворчатых моллюсков разных видов. Так, образцы гемолимфы *Cerastoderma edule* из Испании содержали гипо- и гипердиплоидные гемоциты на ранней стадии заболевания и три- и пентаплоидные клетки на средней и поздней стадиях (Da Silva et al., 2005). В ирландской популяции того же вида, наряду с клетками 3 и 5 $n(c)$, было обнаружено небольшое количество тетраплоидных клеток (Collins, 1998).

Тетра- и гипотетраплоидные значения ДНК описаны для неопластических гемоцитов *Mya arenaria* (см. Reno et al., 1994; Delaporte et al., 2008). Два типа неоплазии, характеризующиеся наличием либо тетра-, либо пентаплоидных клеток, выявлено у *Mytilus edulis (trossulus)* из штата Вашингтон, США (Elston et al., 1990; Moore et al., 1991). В то же время тетра- и пентаплоидные неопластические клетки были редкостью у *M. trossulus* с тихоокеанского побережья Канады, зато на поздней стадии заболевания у этих животных обнаруживались многочисленные анеуплоидные пики от 1,4 до 5,5 n (Vassilenko, Baldwin, 2014). Полиплоидный статус неопластических клеток *M. galloprovincialis* из Неаполитанского залива также зависел от тяжести заболевания: на ранней стадии распределение клеток по уровням плоидности было бимодальным (6,2 и 10,7 n), на средней стадии наблюдался только один пик (7 n), а на поздней стадии модальному значению 7,8 n сопутствовал широкий пик на уровне 31 n (Carella et al., 2017).

Если обнаруженная нами полиплоидия (в сочетании с анеуплоидией) действительно сопряжена с неоплазией, то она должна сопровождаться изменением морфологии клеток, а также целым рядом функциональных последствий на клеточном уровне. Неопластические клетки *Bivalvia* характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, округлой формой, отсутствием псевдоподий (Elston et al., 1988, 1990, 1992; Peters, 1988; Moore et al., 1991; Barber, 2004; Ciocan, Sunila, 2005; Carella et al., 2017), деструктивной реорганизацией актинового цитоскелета (Moore et al., 1992; Díaz et al., 2011), потерей адгезивных свойств (Elston et al., 1988; Miosky et al., 1989; White et al., 1993), вследствие чего резко снижается способность клеток к фагоцитозу, возникает критический иммунодефицит, приводящий к летальному исходу (Kent et al., 1989; Beckmann et al., 1992; Galimany, Sunila, 2008; Díaz et al., 2011). Кроме того, при гемопоэтической неоплазии происходит неконтролируемая инвазия малигнизированных гемоцитов во все органы, что сопровождается очевидными проявлениями тканевой деструкции (Elston et al., 1988, 1990, 1992; Peters, 1988; Moore et al., 1991; Barber, 2004; Ciocan, Sunila, 2005; Carella et al., 2017). Однако проведенный нами микроскопический анализ гемоцитов приморского гребешка не обнаружил значительных морфологических изменений, присущих неопластическим клеткам. Несмотря на практически тотальную полиплоидизацию клеток в циркуляторном русле, многие гемоциты сохраняли псевдоподии и способность к адгезии, при этом почти

все НСТ-позитивные клетки характеризовались высокой степенью распластывания на стекле. Следует отметить, что значительной части гемоцитов были свойственны двуядерность и плеоморфизм ядра, что можно было бы истолковать как косвенный признак трансформации клеток. Впрочем, еще в работе Дзюбы и Романовой (1992) в гемолимфе *Mizuhopecten yessoensis* из экологически чистого района как вариант нормы отмечалось присутствие некоторой доли (до 6%) двуядерных клеток, а также клеток с измененной структурой ядра. Поскольку это наблюдение в основном касалось небольших агранулоцитов, данный феномен трактуется авторами как проявление нормальной митотической активности молодых клеток гемопоэтического ряда (Дзюба, Романова, 1992). Проведенный нами гистологический анализ различных органов, хоть и обнаружил небольшие очаги инфильтрации гемоцитами соединительной ткани жабр, края мантии, пищеварительной железы и почек, все же не выявил классических картин, соответствующих, по крайней мере, продвинутым стадиям гемопоэтической неоплазии. Таким образом, наших данных как минимум недостаточно, чтобы диагностировать данную патологию в исследованных популяциях приморского гребешка. Известно, что в некоторых тканях соматическая полиплоидия может развиваться как адаптация к повышенной функциональной нагрузке, в том числе возникающей в результате агрессивного воздействия среды: адаптивный эффект возникает за счет резервного копирования генома и увеличения дозы генов. Подобное явление массовой полиплоидизации гемоцитов наблюдали у прудовика *Lymnaea stagnalis* из популяции оз. Персток вблизи Чернобыля, что интерпретируется авторами как приспособление животных к экстремальным условиям высокой радиации (Конева, 2013). Полиплоидизация соматических клеток, сопряженная с увеличением их метаболического потенциала, довольно часто наблюдается в тканях с повышенной функциональной нагрузкой и описана, в частности, для гепатоцитов и кардиомиоцитов птиц и млекопитающих (Бродский, Урываева, 1981; Анацкая, Виноградов, 2004; Anatskaya et al., 1994, 2001; Vinogradov et al., 2001). Системная соматическая полиплоидия свойственна и многим тканям брюхоногих моллюсков; здесь она возникает на фоне конкуренции ауто- и гетеросинтезов и выступает как ведущий фактор гистогенеза, позволяющий совместить процессы репродукции и дифференцировки клеток в быстроразвивающихся клеточных популяциях (Anisimov, 2005). В связи с последним, а также учитывая

малую представленность типичных гранулоцитов в гемолимфе приморского гребешка, рискнем предположить, что гемопоэз у *M. yessoensis* протекает достаточно стремительно, и гемоциты включаются в работу уже на ранних стадиях дифференцировки, не успевая созреть в полноценные гранулоциты. В пользу этого предположения свидетельствуют и описания Дзюбы и Романовой (1992), которые наблюдали двуядерные клетки только среди агранулоцитов. Напомним, что агранулярные клетки двустворчатых моллюсков рассматривают как раннюю стадию дифференцировки, еще активную в отношении пролиферации (Дзюба, Романова, 1992; Мiх, 1976; Wootton et al., 2003), однако ввиду практически полного их преобладания в клеточной популяции гемоцитов приморского гребешка эти клетки должны сочетать митотическую активность со способностью к полноценному иммунному ответу. Возникающая при такой стратегии гистогенеза конкуренция между ауто- и гетеросинтезами могла бы служить причиной перехода части клеток на полиплоидизирующий митоз или эндомитоз, а в случае увеличения нагрузки на систему иммунитета доля таких клеток должна возрастать, вплоть до полного замещения диплоидных гемоцитов полиплоидными. Однако эта гипотеза требует серьезной проверки и пока носит характер предварительного умозаключения.

Несмотря на то что Спортивная гавань характеризуется гораздо более выраженным антропогенным воздействием, чем зал. Восток, мы не обнаружили прямой взаимосвязи между уровнем ploидности клеток в гемолимфе приморского гребешка и степенью загрязнения водной среды, хотя обращает на себя внимание преобладание анеуплоидных значений над истинно полиплоидными у особей из импактной акватории. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют об ухудшении экологической обстановки в обоих исследованных районах. Согласно нашим неопубликованным данным, массовая полиплоидизация гемоцитов до уровней 3–4–5 *n* произошла и у гребешков вида *Swiftopecten swiftii* (Bernardi, 1858) в зал. Восток в период с 2014 по 2016 г., что можно попытаться связать с усилением антропогенного пресса на эту акваторию, прежде считавшуюся фоновой (Христофорова и др., 2001; Журавель и др., 2012; Голозубова и др., 2017). С другой стороны, весьма вероятно, что гемоциты гребешков с легкостью переходят на полиплоидию даже в условиях незначительного стресса, что делает этот маркер очень чувствительным и пригодным для регистрации слабых неблагоприятных воздействий.

Заключение

Исследование гемолимфы приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* из двух акваторий с разным уровнем антропогенной нагрузки – фонового зал. Восток и импактной Спортивной гавани Амурского залива – показало, что ряд гематологических параметров закономерно изменяются в зависимости от условий обитания и могут использоваться в качестве индикаторов функционального состояния моллюсков и здоровья популяций. Диагностически значимым биомаркером показало себя общее количество клеток в циркуляторном русле, а также находящееся в обратной зависимости от него количество клеточных фрагментов: в условиях хронического стресса концентрация гемоцитов резко снижается, скорее всего – в результате массовой гибели клеток. Как достаточно надежный критерий состояния здоровья гребешков может рассматриваться и совокупность ключевых иммунологических показателей, таких как фагоцитарная и литическая активности гемоцитов, которые, судя по всему, снижаются при длительном неблагоприятном воздействии среды. Снижение этих параметров сопровождалось падением концентрации общего белка в гемолимфе гребешков из импактной акватории. Что касается уровня производства АФК, то интерпретация результатов НСТ-теста вызывает определенные затруднения. С одной стороны, этот параметр должен быть скоррелирован с активностью фагоцитоза, а с другой стороны, он может быть связан с клеточной гибелью. В нашем исследовании, скорее, прослеживалась вторая зависимость, но очень высокий разброс значений не позволяет сделать однозначные выводы. Неинформативными для дифференциации состояния гребешков из фоновой и импактной акваторий оказались такие маркеры, как агрегационная активность гемоцитов, количество ДНК в клеточных ядрах и степень внутрииндивидуальной вариабельности размера генома. В обоих исследованных районах, независимо от уровня антропогенной нагрузки, у приморского гребешка нами была отмечена массовая полиплоидизация гемоцитов вплоть до уровня $7n$, в сочетании с анеуплоидией, что само по себе представляет отдельный феномен и требует дальнейшего тщательного изучения.

Список литературы

Анацкая О.В., Виноградов А.Е. Полиплоидия: значение для функции кардиомиоцитов и потенциала работы сердца // Цитология. 2004. Т. 46. С. 105–113.

Анисимова А.А. Идентификация клеточных субпопуляций гемоцитов *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) (Bivalvia: Mytilidae) методами проточной цитометрии и световой микроскопии // Биол. моря. 2012. Т. 38, № 5. С. 400–408.

Анисимова А.А. Морфофункциональные параметры гемоцитов в оценке физиологического состояния двустворчатых моллюсков // Биол. моря. 2013. Т. 39, № 6. С. 389–399.

Анисимова А.А., Пономарёва А.Л., Гринченко А.В. и др. Состав и сезонная динамика клеточной популяции гемоцитов двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* Prime, 1864 из эстуария реки Киевка (бассейн Японского моря) // Биол. моря. 2017. Т. 43, № 2. С. 125–132.

Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука, 1981. 259 с.

Ващенко М.А., Альмяшова Т.Н., Жадан П.М. Многолетняя и сезонная динамика состояния гонад морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, обитающего в условиях антропогенного загрязнения (Амурский залив Японского моря) // Вестн. ДВО РАН. 2005. № 1. С. 32–42.

Голозубова Ю.С., Бузолева Л.С., Богатыренко Е.А. и др. Разнообразие культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных из поверхностных вод бухты Восток Японского моря // Самар. науч. вестн. 2017. Т. 6, № 4 (21). С. 32–35.

Дзюба С.М., Романова Л.Г. Морфология амебоцитов гемолимфы приморского гребешка // Цитология. 1992. Т. 34, № 10. С. 52–54.

Журавель Е.В., Христофорова Н.К., Дроздовская О.А., Токарчук Т.Н. Оценка состояния вод залива Восток (залив Петра Великого, Японское море) по гидрохимическим и микробиологическим показателям // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2012. Т. 14, № 1 (9). С. 2325–2329.

Ковековдова Л.Т., Симоконь М.Н. Тенденции изменения химико-экологической ситуации в прибрежных акваториях Приморья. Токсичные элементы в донных отложениях и гидробионтах // Изв. ТИНРО. 2004. Т. 137. С. 310–320.

Коршенко А.Н., Матвейчук И.Г., Плотникова Т.И., Кирьянов В.С., Крутов А.Н., Кочетков В.В. Ежегодник качества морских вод по гидрохимическим показателям (Японское море) за 2009 год. Владивосток: ПУГМС, 2010. 28 с.

Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. Оценка качества вод Амурского залива Японского моря на основе биотестирования с применением одноклеточной водоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin // Сибир. экол. журн. 2011. Т. 1. С. 99–105.

Наумов Ю.А. Антропогенез и экологическое состояние геосистемы прибрежно-шельфовой зоны залива Петра Великого Японского моря. Владивосток: Дальнаука, 2006. 300 с.

Нигматулина Л.В. Оценка антропогенной нагрузки береговых источников на Амурский залив (Японское море) // Вестн. ДВО РАН. 2007. № 1. С. 73–76.

Сяпина И.Г., Щёблыкина А.В. Морфофункциональная характеристика репродуктивной системы брюхоногих моллюсков *Littorina brevicula*, *L. mandshurica* и *Nucella heuseana* из незагрязненных и загрязненных районов залива Петра Великого Японского моря // Биол. моря. 2007. Т. 33, № 6. С. 440–445.

Христофорова Н.К., Журавель Е.В., Григорьева Н.И. Оценка качества вод залива Восток Японского моря // Проблемы региональной экологии. 2001. № 2. С. 59–69.

Черняев А.П., Лукьянова О.Н., Черкашин С.А. Распределение нефтяных углеводородов и оценка состояния биоты в Амурском заливе (Японское море) // Экологическая химия. 2006. Т. 15, № 1. С. 28–38.

Allam B., Ashton-Alcox K.A., Ford S.E. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs // Fish Shellfish Immunol. 2002. Vol. 13. P. 141–158.

Allam B., Paillard C., Howard A., Le Pennec M. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, cultured in England // Dis. Aquat. Org. 2000. Vol. 41, N 2. P. 105–113.

Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Kudryavtsev B.N. Hepatocyte polyploidy and metabolism / life history traits: hypothesis testing // J. Theor. Biol. 1994. Vol. 168. P. 191–199.

Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Kudryavtsev B.N. Cardiomyocyte ploidy level in birds with different growth rates // J. Exp. Zool. 2001. Vol. 289. P. 48–58.

Anisimov A.P. Endopolyploidy as a morphogenetic factor of development // Cell Biol. Int. 2005. Vol. 29. P. 993–1004.

Auffret M. Bivalve hemocyte morphology // *Am. Fish. Soc. Spec. Pub.* 1988. Vol. 18. P. 169–177.

Auffret M. Bivalves as models for marine immunotoxicology // *Investigative immunotoxicology*. Boca Raton: CRC Press, 2005. P. 29–48.

Barber B.J. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves // *Aquat. Living Resour.* 2004. Vol. 17. P. 449–466.

Beckmann N., Morse M.P., Moore C.M. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria* // *J. Invertebr. Pathol.* 1992. Vol. 59. P. 124–132.

Bigas M., Durfort M., Poquet M. Cytological response of hemocytes in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, experimentally exposed to mercury // *BioMetals*. 2006. Vol. 19. P. 659–673.

Bihari N., Mičić M., Batel R. et al. Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia // *Aquat. Toxicol.* 2003. Vol. 64. P. 121–129.

Cajaraville M.P., Pal S.G. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment // *Cell Struct. Funct.* 1995. Vol. 20. P. 355–367.

Canesi L., Gallo G., Gavioli M. et al. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves // *MRT*. 2002. Vol. 57. P. 469–476.

Canesi L., Betti M., Ciacci C. et al. Cell signalling in the immune response of mussel hemocytes // *ISJ*. 2006. Vol. 3. P. 40–49.

Carballal M.J., Barber B.J., Iglesias D. et al. Neoplastic diseases of marine bivalves // *J. Invertebr. Pathol.* 2015. Vol. 131. P. 83–106.

Carballal M.J., Villalba A., López C. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis* // *J. Invertebr. Pathol.* 1998. Vol. 72. P. 304–312.

Carella F., De Vico G., Landini G. Nuclear morphometry and ploidy of normal and neoplastic haemocytes in mussels // *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, N 3. 0173219.

Chagot D.J. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hemocytes d'*Osrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). Thèse du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Université de Montpellier, France, 1989. 142 p.

Cheng T.C. Bivalves // Invertebrate blood cells. Vol. II. London: Acad. Press, 1981. P. 233–300.

Cheng T.C., Sullivan J.T. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes // Mar. Environ. Res. 1984. Vol. 14. P. 305–315.

Chu F.L.E. Defense mechanisms of marine bivalves // Recent advances in marine biotechnology. Immunobiology and pathology. Enfield, New Hampshire, USA: Science Publishers, 2000. P. 1–42.

Ciocan C., Sunila I. Disseminated neoplasia in blue mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the Black Sea, Romania // Mar. Pollut Bull. 2005. Vol. 50, N 11. P. 1335–1339.

Coles J.A., Farley S.R., Pipe R.K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium // Dis. Aquat. Org. 1995. Vol. 22. P. 59–65.

Collins C. Studies on a neoplasm of the cockle *Cerastoderma edule* (Linnaeus): PhD dissertation. Cork: National University of Ireland, 1998. 155 p.

Da Silva P.M., Hégarret H., Lambert C. et al. Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions // Toxicon. 2008. Vol. 51. P. 563–573.

Da Silva P.M., Soudant P., Carballal M.J. et al. Flow cytometric DNA content analysis of neoplastic cells in haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule* // Dis. Aquat. Org. 2005. Vol. 67. P. 133–139.

Delaporte M., Soudant P., Lambert C. et al. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle // Aquaculture. 2006. Vol. 254, N 1 (4). P. 571–582.

Delaporte M., McKenna P., Siah A. et al. Immunophenotyping of *Mya arenaria* neoplastic hemocytes using propidium iodide and a specific monoclonal antibody by flow cytometry // J. Invertebr. Pathol. 2008. Vol. 99, N 1. P. 120–122.

Díaz S., Renault T., Villalba A. et al. Disseminated neoplasia in cockles *Cerastoderma edule*: Ultrastructural characterisation and effects on haemolymph cell parameters // Dis. Aquat. Org. 2011. Vol. 96, N 2. P. 157–167.

Donaghy L., Kim B.-K., Hong H.-K. et al. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis* // Fish Shellfish Immunol. 2009a. Vol. 27. P. 296–301.

Donaghy L., Lambert C., Choi K.-S. et al. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects // *Aquaculture*. 2009b. Vol. 297. P. 10–24.

Dyrynda E.A., Law R.J., Dyrynda P.E.J. et al. Changes in immune parameters of natural *Mytilus edulis* populations following a major oil spill (Sea Empress, Wales, UK) // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2000. Vol. 206. P. 155–170.

Dyrynda E.A., Pipe R.K., Burt G.R., Ratcliffe N.A. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK // *Aquat Toxicol.* 1998. Vol. 42. P. 169–185.

Elston R.A., Drum A.S., Allen S.K. Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hematopoietic neoplasia // *Dis. Aquat. Org.* 1990. Vol. 8. P. 51–59.

Elston R.A., Kent M.L., Drum A.S. Progression, lethality and remission of hematopoietic neoplasia in the bay mussel *Mytilus edulis* // *Dis. Aquat. Org.* 1988. Vol. 4. P. 135–142.

Elston R.A., Moore J.D., Brooks K. Disseminated neoplasia of bivalve mollusks // *Rev. Aquat. Sci.* 1992. Vol. 6. P. 405–466.

Estrada N., Velázquez E., Rodríguez-Jaramillo C., Ascencio F. Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* // *Immunobiology*. 2013. Vol. 218, N 8. P. 1093–1103.

Feng S.Y., Feng J.S., Burke C.N., Khairallah L.H. Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca : Pelecypoda) // *Z. Zellforsch. Mikrosk.* 1971. Vol. 120, N 2. P. 222–245.

Fisher W.S., Oliver L.M., Edwards P. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida // *J. Shellfish Res.* 1996. Vol. 15. P. 555–564.

Foley D.A., Cheng T.C. Morphology, hematologic parameters, and behavior of hemolymph cells of the quahaug clam, *Mercenaria mercenaria* // *Biol. Bull.* 1974. Vol. 146. P. 343–356.

Fournier M., Pellerin J., Clermont Y. et al. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes // *Toxicology*. 2001. Vol. 161. P. 201–211.

Gagnaire B., Gay M., Huvet A. et al. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *in vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) // *Aquat. Toxicol.* 2007. Vol. 84. P. 92–102.

Galimany E., Place A.R., Ramón M. et al. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis* // Harmful Algae. 2008. Vol. 7, N 1. P. 91–98.

Galimany E., Sunila I. Several cases of disseminated neoplasia in mussels *Mytilus edulis* (L.) in western Long Island Sound // J. Shellfish Res. 2008. Vol. 27. P. 1201–1207.

Garcia-Garcia E., Prado-Alvarez M., Novoa B. et al. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families // Dev. Comp. Immunol. 2008. Vol. 32. P. 637–653.

Goedken M., DeGuise S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defense mechanisms // Fish Shellfish Immunol. 2004. Vol. 16. P. 539–552.

González M., Arenas G. Characterization of the immune response of the north scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca : Bivalvia) // Ciencias Marinas. 2002. Vol. 28, N 3. P. 247–255.

Hannam M.L., Bamber S.D., Moody A.J. et al. Immunotoxicity and oxidative stress in the Arctic scallop *Chlamys islandica*: Effects of acute oil exposure // Ecotox. Environ. Safe. 2010. Vol. 73. P. 1440–1448.

Hégaret H., da Silva P.M., Wikfors G.H. et al. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures // Aquat. Toxicol. 2007. Vol. 84. P. 469–479.

Hégaret H., Wikfors G.H., Soudant P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Hemocytes functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst // JEMBE. 2003. Vol. 293. P. 249–265.

Hégaret H., Wikfors G.H., Soudant P. et al. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation // Aquaculture. 2004. Vol. 234. P. 541–560.

Hine P.M. The inter-relationships of bivalve haemocytes // Fish Shellfish Immunol. 1999. Vol. 9. P. 367–385.

Huffman J.E., Tripp M.R. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes // J. Invertebr. Pathol. 1982. Vol. 40. P. 68–74.

Jing X., Wenbin Z. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*) // Fish Shelfish Immunol. 2005. Vol. 19, N 1. P. 17–25.

Kent M.L., Elston R.A., Wilkinson M.T. et al. Impaired defense mechanisms in bay mussels, *Mytilus edulis*, with hematopoietic neoplasia // J. Invertebr. Pathol. 1989. Vol. 53. P. 378–386.

Koneva A.Yu. Interpopulation differences in hemocyte DNA-comet parameters of snail *Lymnaea stagnalis* from regions with different environmental loads // Cell Tissue Biol. 2013. Vol. 7, N 5. P. 472–478.

Liu J., Pan L.Q., Zhang L. et al. Immune responses, ROS generation and the haemocyte damage of scallop *Chlamys farreri* exposed to Aroclor 1254 // Fish Shellfish Immunol. 2009. Vol. 26, N 3. P. 422–428.

Matozzo V., Ballarin L., Pampanin D.M., Marin M.G. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum* // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2001. Vol. 41. P. 163–170.

Matozzo V., Ercolini C., Serracca L. et al. Assessing the health status of farmed mussels (*Mytilus galloprovincialis*) through histological, microbiological and biomarker analyses // J. Invertebr. Pathol. 2018. Vol. 153. P. 165–179.

Matozzo V., Gagné F. Immunotoxicology approaches in ecotoxicology: Lessons from mollusks // Lessons in immunity: from single-cell organisms to mammals / L. Ballarin, M. Cammarata (Eds). London: Acad. Press, Elsevier, 2016. P. 29–51.

Mayrand E., St-Jean S.D., Courtenay S.C. Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: Can the immune system recuperate? // Aquac. Res. 2005. Vol. 36. P. 962–971.

Miosky D.L., Smolowitz R.M., Reinisch C.L. Leukemia cell specific protein of the bivalve mollusc *Mya arenaria* // J. Invertebr. Pathol. 1989. Vol. 53. P. 32–40.

Mix M.C. A general model for leukocytes cell renewal in bivalve molluscs // Mar. Fish. Rev. 1976. Vol. 38, N 10. P. 37–41.

Monari M., Matozzo V., Foschi J. et al. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina* // Fish Shellfish Immunol. 2007. Vol. 22. P. 98–114.

Moore C.A., Beckmann N., Morse M.P. Cytoskeletal structure of diseased and normal hemocytes of *Mya arenaria* // J. Invertebr. Pathol. 1992. Vol. 60. P. 141–147.

Moore J.D., Elston R.A., Drum A.S. et al. Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusk *Mytilus* // J. Invertebr. Pathol. 1991. Vol. 58. P. 231–243.

Moschino V., Meneghetti F., da Ros L. Use of biomarkers to assess the welfare of the edible clam, *Ruditapes philippinarum*: May it be a tool for proving areas of origin? // Aquac. Int. 2010. Vol. 18. P. 327–337.

Oliver L.M., Fisher W.S. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers // Biomarkers. 1999. Vol. 4, N 6. P. 510–530.

Ottaviani E. Molluscan immunorecognition // ISJ. 2006. Vol. 3. P. 50–63.

Ottaviani E., Franchini A., Barbieri D. et al. Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Presence of two aging-related hemocyte stages // Ital. J. Zool. 1998. Vol. 65, N 4. P. 349–354.

Oubella R., Maes P., Paillard C., Auffret M. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia) // Dis. Aquat. Org. 1993. Vol. 15. P. 193–197.

Oubella R., Paillard C., Maes P., Auffret M. Changes in hemolymph parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge // J. Invertebr. Pathol. 1994. Vol. 64. P. 33–38.

Paillard C., Alcox K., Ford S.E. Changes in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the American oyster, *Crassostrea virginica* affected by the Juvenile oyster disease // Aquat. Living Resour. 1996. Vol. 9, N 2. P. 145–158.

Paillard C., Allam B., Oubella R. Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* // Dis. Aquat. Org. 2004. Vol. 59. P. 249–262.

Paillard C., Maes P., Oubella R. Brown ring disease in clams // Annu. Rev. Fish Dis. 1994. Vol. 4. P. 219–240.

Pellizzato M., Da Ros L. Clam farming quality as a management tool: a proposal based on recent studies in Northern Adriatic lagoons // Aquac. Int. 2005. Vol. 13. P. 57–66.

Perrigault M., Dahl S.F., Pales Espinosa E. et al. Effects of temperature on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) immunity and QPX (Quahog Parasite Unknown) disease development: II. Defense parameters // J. Invertebr. Pathol. 2011. Vol. 106. P. 322–332.

Peters E.C. Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve mollusks // Am. Fish. Soc. Spec. Publ. 1988. Vol. 18. P. 74–92.

Pipe R.K., Coles J.A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs // Fish Shellfish Immunol. 1995. Vol. 5. P. 581–595.

Pipe R.K., Coles J.A., Carissan F.M.M., Ramanathan K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis* // *Aquat Toxicol.* 1999. Vol. 46. P. 43–54.

Pipe R.K., Coles J.A., Thomas M.E. et al. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice lagoon // *Aquat Toxicol.* 1995. Vol. 32, N 1. P. 59–73.

Pipe R.K., Farley S.R., Coles J.A. The separation and characterization of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis* // *Cell Tissue Res.* 1997. Vol. 289. P. 537–545.

Pruzzo C., Gallo G., Canesi L. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components // *Envir. Microbiol.* 2005. Vol. 7, N 6. P. 761–772.

Rasmussen L.P.D., Hage E., Karlog O. An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis* // *J. Invertebr. Pathol.* 1985. Vol. 45. P. 158–167.

Reno P.W., House M., Illingworth A. Flow cytometric and chromosome analysis of softshell clams, *Mya arenaria*, with disseminated neoplasia // *J. Invertebr. Pathol.* 1994. Vol. 64. P. 163–172.

Renwrantz L. Internal defence system of *Mytilus edulis* // *Neurobiology of Mytilus edulis* / G.B. Stefano (Ed.). Manchester; New-York: Manchester University Press, 1990. P. 256–275.

Sminia T., van der Knaap W.P.W. Cells and molecules in molluscan immunology // *Dev. Comp. Immunol.* 1987. Vol. 11. P. 17–28.

Soares-da-Silva I.M., Ribeiro J., Valongo C. et al. Cytometric, morphologic and enzymatic characterization of haemocytes in *Anadonta cygnea* // *Comp. Biochem. Physiol.* 2002. Vol. 132. P. 541–553.

Soudant P., Paillard C., Choquet G. et al. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum* // *Aquaculture.* 2004. Vol. 229. P. 401–418.

Tiscar P.G., Mosca F. Defense mechanisms in farmed marine molluscs // *Vet. Res. Commun.* 2004. Vol. 28. P. 57–62.

Tkalin A.V., Belan T.A., Shapovalov E.N. The state of the marine environment near Vladivostok, Russia // *Mar. Pollut. Bull.* 1993. Vol. 26. P. 418–422.

Vashchenko M.A., Syasina I.G., Zhadan P.M., Medvedeva L.A. Reproductive function state of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* Jay from polluted ar-

eas of Peter the Great Bay, Sea of Japan // *Hydrobiologia*. 1997. Vol. 352. P. 231–240.

Vashchenko M.A., Luchsheva L.N., Bel'cheva N.N. et al. Assessment of the state of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* in Alekseeva Bight (Peter the Great Bay, Sea of Japan) based on morphological and biochemical parameters // *Russ. J. Mar. Biol.* 2000. Vol. 26, N 5. P. 342–349.

Vassilenko E., Baldwin S.A. Using flow cytometry to detect haemic neoplasia in mussels (*Mytilus trossulus*) from the Pacific coast of Southern British Columbia, Canada // *J. Invertebr. Pathol.* 2014. Vol. 117. P. 68–72.

Vinogradov A.E., Anatskaya O.V., Kudryavtsev B.N. Relationship of hepatocyte ploidy levels with body size and growth rate in mammals // *Genome*. 2001. Vol. 44. P. 350–360.

White M.K., Miosky D., Flessas D.A. et al. The expression of an adhesion-related protein by clam hemocytes // *J. Invertebr. Pathol.* 1993. Vol. 61. P. 253–259.

Wootton E.C., Dyrinda E.A., Ratcliffe N.A. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2003. Vol. 15. P. 195–210.

Xing J., Tang X., Ni Y. et al. Application of monoclonal antibody against granulocytes of scallop *Chlamys farreri* on granulocytes occurrence at different developmental stages and antigenic cross-reactivity of granulocytes in five other bivalve species // *Fish Shellfish Immunol.* 2014. Vol. 36, N 1. P. 315–319.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНАЛИЗА СООТНОШЕНИЙ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ И СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ТРОФОЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ МОРСКИХ СВОБОДНОЖИВУЩИХ НЕМАТОД

В.В. Мордухович^{1,2}, Н.П. Фадеева¹, С.И. Кияшко²

¹ *Дальневосточный федеральный университет,
Владивосток, 690091, Россия*

² *Национальный научный центр морской биологии
им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, 690091, Россия
E-mail: mordukhovich.vv@dyfu.ru*

STABLE ISOTOPIC AND FATTY ACIDS ANALYSIS IN THE STUDIES OF TROPHIC ECOLOGY OF FREE-LIVING MARINE NEMATODES

V.V. Mordukhovich^{1,2}, N.P. Fadeeva¹, S.I. Kiyashko²

¹ *Far Eastern Federal University, 8 Sukhanova St.,
Vladivostok, 690950, Russia*

² *National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch
of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041, Russia
E-mail: mordukhovich.vv@dyfu.ru*

Нематоды – одна из наиболее разнообразных и самая обильная таксономическая группа многоклеточных организмов в морских донных сообществах. Для оценки состояния морских экосистем все шире используются данные о функциональных показателях нематоценов. В последние годы значительного успеха в изучении трофического статуса отдельных организмов и трофических сетей в сообществах удалось добиться с помощью анализа

соотношения стабильных изотопов (SIRA) и состава жирных кислот (FAA). На основании литературных и собственных данных проведен анализ текущих результатов использования SIRA и FAA, перспектив и ограничений применения этих методов в трофоэкологических исследованиях морских нематод.

Nematodes are one of the most diverse and the most abundant group of metazoan organisms in the marine ben-

thic communities. To assess the state of the marine ecosystems, data on the functional indicators of nematode communities are increasingly being used. In recent years, significant success in studying the trophic status of individual organisms and trophic nets in communities has been achieved by analyzing the ratio

of stable isotopes (SIRA) and fatty acid composition (FAA). Based on the literature and our own data, an analysis of the current results of the use of SIRA and FAA in studies of trophic ecology of marine nematodes, the prospects and limitations of the use of these methods was carried out.

Введение

Нематоды – одна из наиболее распространенных групп многоклеточных организмов, характеризующаяся высоким видовым богатством и обилием. В морских бентосных сообществах нематоды являются самыми многочисленными многоклеточными, которые встречаются практически во всех местообитаниях. Высокое обилие и разнообразие, широкое распространение, малое время генерации и высокая скорость метаболизма делают нематод важным звеном в трофических взаимоотношениях и переносе вещества и энергии между всеми размерными блоками пищевых сетей в морских экосистемах (Woodward, 2010; Schratzberger, Ingels, 2018). В течение полуторавекового изучения этой группы накоплен обширный фактический материал, показывающий большие возможности для использования нематод в современных подходах для мониторинга морских экосистем, в том числе при проведении экспресс-оценки изменений донных сообществ локальных акваторий, районов добычи минеральных или биологических ресурсов (Coull, Chandler, 1992; Bongers, Ferris, 1999; Austen, Widdicombe, 2006; Fleege, Carman, 2011; Balsamo et al., 2012). Это особенно актуально с учетом роста антропогенного давления на Мировой океан и происходящих в морских экосистемах изменений, когда все большую востребованность приобретают методы быстрого получения научно обоснованных, точных оценок текущего состояния и прогнозов возможного развития ситуации. Однако несмотря на прогресс, достигнутый в исследованиях нематод, знания об их экологии и количественные оценки их вклада в функционирование экосистем имеют значительные пробелы. Это касается в том числе и такой важной информации, как сведения о роли свободноживущих нематод в пищевых сетях.

Набор объектов, служащих нематодам пищей, очень широк – они питаются бактериями, цианобактериями, зелеными и диатомовыми микроводорослями, мицелием грибов, инфузориями, трупами других организмов, другими нематодами, олигохетами, детритом и растворенным органическим веществом. Для выявления положения нематод в трофических сетях применяют широкий арсенал подходов и инструментальных методов: использование меток, в том числе радиоактивных (Chia, Warwick, 1969; Montagna, 1984; Olafsson et al., 1999; и др.), флуоресцентных (Epstein, Shiaris, 1992; Borchardt, Bott, 1995; Epstein, 1997), коллоидного железа (Kim, Shirayama, 2010); анализ пищеварительных ферментов (Jennings, Colam 1970; Jennings, Deutsch, 1975); изучение содержимого кишечника (Perkins, 1958; Fonseca, Galucci, 2008; Tchesunov, 2015; и др.); молекулярно-генетические методы анализа (Musat et al., 2007); эксперименты с приманками (Meyers, Hopper, 1966; Gerlach, 1977); исследование тонкого строения пищеварительной системы (Deutsch, 1978); наблюдение за поведением живых организмов (Jensen, 1982; Bouwman et al., 1984; Moens, Vincx, 1997; Riemann, Helmke, 2002) или микроскопирование быстро замороженных образцов грунта (Kennedy, 1994).

В последние десятилетия при изучении трофических взаимоотношений нематод активно используются методы природных биомаркеров, основанные на анализе соотношений стабильных изотопов биогенных элементов (stable isotope ratio analyses – SIRA) или состава жирных кислот (fatty acids analyses – FAA) в тканях организмов. Цель настоящей работы – провести критический анализ использования этих методов для дальнейшей разработки единых протоколов их использования и прозрачных принципов интерпретации.

Общие принципы использования методов

Основы анализа природных соотношений стабильных изотопов биогенных элементов хорошо разработаны и описаны (например, Поток вещества и энергии..., 2014; Fry, 2006; Ben-David, Flaherty, 2012). Метод широко используется при проведении экологических исследований разнообразных таксономических групп организмов – от прокариот до гоминид. В качестве экологических изотопных маркеров обычно анализируются соотношения изотопов водорода ($D/{}^1H$), кислорода (${}^{18}O/{}^{16}O$), серы (${}^{34}S/{}^{32}S$), углерода (${}^{13}C/{}^{12}C$) и азота (${}^{15}N/{}^{14}N$). Использование двух последних элемен-

тов – наиболее широко распространенный вариант в настоящее время при исследовании трофических связей организмов в морских экосистемах. Обобщенно стандартная процедура заключается в высушивании образцов органического вещества (тканей организмов) при температуре 50–60°C в течение 24–72 ч, последующей гомогенизации и сжигании образца в элементном анализаторе до образования N₂ и CO₂, которые и анализируются на изотопном масс-спектрометре (например, O'Reilly et al., 2002; Martinez del Rio et al., 2009; Middelburg, 2014).

Результаты изотопного анализа принято определять в виде относительного отклонения δ (в ‰) отношений тяжелых/легких изотопов образца и общепринятого международного стандарта. В общем случае формулу можно представить следующим образом:

$$\delta R [‰] = [R_{\text{образец}} / R_{\text{стандарт}} - 1] \times 10^3, \quad (1)$$

где R – отношение массы тяжелого изотопа и легкого (например, ¹³C/¹²C или ¹⁵N/¹⁴N); δR – относительное отклонение (например, $\delta^{13}\text{C}$ или $\delta^{15}\text{N}$) образца от общепринятого международного стандарта (для углерода «венский» эквивалент ископаемого белемнита из формации PeeDee, VPDB; для азота – N₂ атмосферного воздуха) (Fry, 2006). Знаки «+» и «-» будут указывать на большее или меньшее содержание тяжелого изотопа по сравнению с таковым стандарта.

Данные часто представляют в виде двумерных диаграмм с осями, отражающими изотопный состав элементов (например, углерода и азота), и интерпретируют с позиций концепции трофической ниши. При этом предполагается, что изменения изотопных показателей организмов связаны с поступлением или потерей вещества. Соответственно, изотопный состав тканей консументов в общем отражает интегрированный во времени изотопный состав пищи с некоторыми закономерными изменениями, так называемым трофическим обогащением – слабо выраженным накоплением тяжелого углерода (¹³C) и существенным накоплением тяжелого азота (¹⁵N) в тканях консумента (Тиунов, 2014; Fry, 2006). На первой ступени фиксирования молекул CO₂ продуцентами-фотосинтетиками происходит основная дискриминация тяжелого изотопа ¹³C, что приводит к обеднению органического вещества биосферы изотопом ¹³C по сравнению с неорганическим углеродом и выражается в отрицательных значениях $\delta^{13}\text{C}$ (Park, Epstein, 1960). Последующие биохимические преобразования продуктов

фотосинтеза, за исключением синтеза липидов, сопровождаются незначительными изотопными эффектами.

Наземные C_3 растения, преобладающие в настоящее время в умеренных широтах, имеют $\delta^{13}C$ значения около -28‰ , и детрит наземного происхождения в большинстве изученных водных экосистем умеренных широт также имеет среднее значение $\delta^{13}C$ -28‰ , в диапазоне от -34‰ до -22‰ (Cole et al., 2002; Finlay, 2001, 2004). Высшие растения с C_4 - и САМ-типом фотосинтеза, в основном тропические травы и суккуленты, имеют значения $\delta^{13}C$ около -13‰ (от -10‰ до -19‰) (Smith, Epstein, 1971; Peterson, Fry, 1987).

Автохтонное органическое вещество, синтезируемое первичными продуцентами (микроводорослями и макрофитами), морских экосистем умеренных широт значительно отличается по значениям $\delta^{13}C$ от наземной растительности (Тарасов и др., 2007; Gladyshev, 2009; Wada, 2009). Для продуцентов морских сообществ, в сравнении с пресноводными, характерно обогащение тяжелым изотопом ^{13}C . Наземные растения (преимущественно C_3 -типа) еще более обеднены тяжелым углеродом. Описанная тенденция увеличения значений $\delta^{13}C$ органического вещества от пресных к морским водам многократно подтверждалась наблюдениями в природе (Canuel et al., 1995; Barnard et al., 2006; Van Den Meersche et al., 2009). В частности, было показано, что значения $\delta^{13}C$ РОВ в эстуариях последовательно увеличивались по градиенту солености и достоверно с ней коррелировали (Canuel et al., 1995).

Наблюдаются значительные различия соотношений стабильных изотопов углерода и для различных таксонов и жизненных форм морских продуцентов, хотя причины этих различий еще до конца не выяснены. Для морских микроводорослей характерно варьирование значений $\delta^{13}C$ в широких пределах от -11‰ до -20‰ (Fry, Arnold, 1982; Shwingchamer, 1983). Значения $\delta^{13}C$ морских трав варьируют в диапазоне от -23‰ до -3‰ , обычно наблюдаются значения порядка -10‰ (McMillan et al., 1980; Hemminga, Mateo, 1996).

Значения для фитопланктона из морских вод умеренных широт Северного полушария составляют в среднем -21‰ (Deuser, 1970). Для морских бентосных микроводорослей большинство значений попадает в интервал от -11‰ до -20‰ (Fry, Sherr, 1984).

В отличие от углерода изменчивость $\delta^{15}N$ для автотрофов менее выражена. Для макрофитов, согласно литературным данным, диапазон $\delta^{15}N$ составляет от $-11,2\text{‰}$ для пресноводной харовой *Najas marina* (Piola et al.,

2008) до 12,3‰ для морских трав (Fourqurean et al., 1997). Петерсон (Peterson, 1999) указывает среднее значение $\delta^{15}\text{N}$ для наземных растений C_3 -типа на уровне 0,4‰, для морского планктона 8,6‰.

Необходимо отметить еще один источник органического углерода в морских экосистемах – хемосинтез. Соотношения стабильных изотопов в тканях гидробионтов, связанных с хемоавтотрофными прокариотами, изменяются в широком диапазоне. На значения $\delta^{13}\text{C}$ оказывают влияние в том числе тип используемой хемотрофии, источник растворенного неорганического углерода, особенности путей фиксации углекислого газа хемоавтотрофами (в частности, формы RubisCo (Scott et al., 2004)) и другие факторы. Так, в пределах одного гидротермального поля для двустворчатых моллюсков (калиптогены, митилиды) $\delta^{13}\text{C}$ может варьировать от -32‰ до $-33,6\text{‰}$, а для сосуществующих с ними вестиментифер и полихет от $-10,8\text{‰}$ до $-11,2\text{‰}$ (Кияшко, 1987). Организмы с симбионтными хемоавтотрофами, фиксирующими CO_2 с энзимом I RubisCO, часто имеют уровень $\delta^{13}\text{C}$ между -27‰ и -37‰ , при альтернативном варианте с II RubisCO возможно увеличение доли тяжелого углерода ($\delta^{13}\text{C}$ от -9‰ до -16‰) (Levin, Michener, 2002; Scott et al., 2004). Для организмов, чье питание связано с метанотрофными бактериями или археями, характерны аномально низкие значения $\delta^{13}\text{C}$, так как углерод биогенного метана из морских осадков может иметь значения $\delta^{13}\text{C}$ от -60‰ до -70‰ и менее (Whalen, 1993; Whiticar, 1999).

Проведенные опыты по выращиванию различных групп многоклеточных животных (от нематод до млекопитающих) на пище с постоянным изотопным составом углерода, а также полевые исследования по изотопному составу углерода животных с точно установленной диетой $\delta^{13}\text{C}$ пищи показали, что усвоение и переработка органического вещества консументами происходит с минимальными изотопными эффектами (Fry, 2006). Эти изменения редко превышают $+1\text{‰}$ (DeNiro, Epstein, 1978; Fry, Sherr, 1984). В связи с этим на основании данных о $\delta^{13}\text{C}$ в тканях гетеротрофов можно оценить вклад углерода различных первичных продуцентов (например, бентосные/пелагические фотосинтетика) в питании консументов различных трофических уровней в пищевых сетях.

Наряду с исследованиями источников и потоков органического вещества в морских экосистемах анализ соотношений стабильных изотопов широко применяется для изучения трофической структуры сообществ морских организмов (например, Hobson et al., 2002; Gorbatenko et al., 2013; Kiyashko

et al., 2014; и др.). В такого рода исследованиях проводят анализ соотношений стабильных изотопов как углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), так и азота ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). Азот животных существенно обогащается тяжелым изотопом относительно азота усвоенной пищи, что приводит к увеличению содержания ^{15}N на каждом трофическом уровне (Minagawa, Wada, 1984; Vander Zanden, Rasmussen, 2001). Таким образом, хищные животные верхних уровней трофических сетей показывают закономерно более высокое содержание ^{15}N , а всеядные виды обогащаются изотопом ^{15}N по мере включения все большей доли гетеротрофных организмов в пищу. Это позволяет определять трофический статус отдельных видов консументов при сравнительном изучении изотопного состава азота организмов сообщества (Wada et al., 1987). Недавние обзоры показывают, что характерные уровни обогащения составляют порядка $0,05 \pm 0,63\text{‰}$ для $\delta^{13}\text{C}$ и $3,49 \pm 0,23\text{‰}$ для $\delta^{15}\text{N}$ для различных регионов, эти значения сходны с часто используемыми средними уровнями трофического фракционирования (Δ): 1‰ для $\delta^{13}\text{C}$ и $3,4\text{‰}$ для $\delta^{15}\text{N}$ (Wada et al., 1993; Post, 2002; Fry, 2006; West et al., 2006).

Одним из важнейших шагов в развитии использования SIRA стало появление на основе уравнения материального баланса модели смешивания. При наличии в экосистеме двух альтернативных источников органического вещества модель позволяет оценить вклад каждого из них на основании данных о соотношении изотопов одного элемента. В общем случае она выглядит следующим образом:

$$\delta'X = p\delta_1X + (1 - p)\delta_2X, \quad (2)$$

$$\text{тогда } p = 100\% * (\delta'X - \delta_2X) / (\delta_1X - \delta_2X), \quad (3)$$

где $\delta'X$ – соотношение изотопов (изотопная подпись) элемента X в тканях консумента, p – доля в потреблении пищи источника 1, δ_1X и δ_2X – соотношения изотопов элемента X в источнике 1 и 2 соответственно. При расчете вклада источников $C_{\text{орг}}$ в углероде животных следует учитывать величину Δ – изменение изотопного состава углерода в ходе ассимиляции консументом, величина трофического обогащения (Voecklen et al., 2011):

$$p = 100\% * (\delta'X - \delta_2X - \Delta) / (\delta_1X - \delta_2X). \quad (4)$$

Модели подобного типа полностью определены, т.к. количество уравнений равно числу неизвестных. Широко используется и линейная модель с двумя изотопами и тремя источниками пищи (Middelburg, 2014).

Чем больше различия в изотопном составе источников, тем надежнее количественная оценка их вклада. Как правило, изотопный состав источни-

ков может претерпевать существенные сезонные и пространственные изменения, и точность определения средних величин $\delta^{13}\text{C}$ для альтернативных источников, используемых в расчетах, обуславливает реалистичность количественных оценок их вклада (Тарасов и др., 2007).

При трех и более возможных источниках пищи и наличии данных по изотопам только двух элементов модели оказываются неопределенными. В этом случае они могут недооценивать вклад наиболее используемого ресурса и переоценивать менее используемые (Phillips, 2001). Для разрешения проблемы применяются две основных стратегии: комбинирование источников и модели смешивания (Phillips, Gregg, 2003). Первой такой моделью стала IsoSource, в силу различных причин долгое время оставшаяся «рабочей лошадкой» при использовании SIRA в исследовании трофических сетей (Bocklen et al., 2011). На основании оценки всех возможных вкладов каждого источника и их комбинаций, при которых консумент будет иметь соответствующие измерения значения изотопических отношений, модель позволяет сгенерировать частотное распределение доли каждого источника в питании консумента. Были разработаны различные адаптации модели IsoSource, в целом она позволяет получать хорошие результаты, однако, безусловно, подобный подход не решает всех проблем, связанных с неопределенностью системы уравнений. В последнее десятилетие наблюдается активное развитие моделей на основе байесовской теории, например «SIAR» (Parnell et al., 2010) и «MixSIR» (Moore, Semmens, 2008; Jackson et al., 2009; Semmens et al., 2009). Сторонники этого подхода считают, что такие модели дают более адекватные результаты в условиях неопределенности трофического обогащения, изменчивости изотопных показателей консументов и источников пищи, а также изменчивости внешних факторов, влияющих на изотопные показатели (Ogle et al., 2004; Moreno et al., 2010). Модель «SIAR» первоначально была разработана для статистической среды «R», модель «MixSIR» – для статистической среды «MATLAB». Созданные в последние годы программные средства, например MixSiar (Stock et al., 2018), позволяют гибко использовать модели.

SIRA и FAA в практике морских нематологических исследований

Использование SIRA при изучении трофических взаимодействий морских свободноживущих нематод началось относительно недавно, первая работа вышла в 1989 г. (Couch, 1989). Всего в реферативных базах

данных Scopus и WoS нами выявлена 71 публикация с данными SIRA для различных таксономических групп и жизненных форм нематод из разнообразных биотопов всех океанов. Накопленные данные позволяют сделать ряд обобщений.

Прежде всего необходимо отметить, что на результаты SIRA могут оказывать влияние особенности подготовки проб, фиксации, хранения (Кузнецова и др., 2014; Ponsard, Amlou, 1999; Sticht et al., 2006; Ventura, Jeppesen, 2009). Небольшие размеры тела морских свободноживущих нематод и их обитание внутри донных осадков на протяжении всего жизненного цикла определяют ряд особенностей в работе. Несмотря на отдельные разработки, позволяющие уменьшить необходимую для анализа минимальную биомассу до 2 мкг С (Carman, Fry, 2002) и даже 1 мкг С и 0,6 мкг N (Langel, Dickmans, 2014), в большинстве случаев минимум для анализа составляет порядка 5 мкг С и N, а рекомендуемые минимальные значения для получения результатов с высокой воспроизводимостью обычно в разы выше. Лишь для немногих видов нематод такая масса элементов может быть обеспечена несколькими (тем более одним) экземплярами. Обычно, особенно для анализа изотопов азота, требуется выбор десятков-сотен (а в случае, например, многих Desmoscolecidae – тысяч) особей, отбор которых непосредственно из донных осадков крайне трудоемок и времязатратен. При этом длительное нахождение нематод вне естественных условий может приводить к изменению изотопного состава, гибели и разложению, также влияющим на значения соотношений стабильных изотопов. В связи с этим для экстракции нематод часто прибегают к обработке проб методом флотации и/или центрифугированием с золями кремнезема (обычно используют торговые марки Ludox[®] и Levasil[®]), крайне редко в растворах сахарозы, с последующей промывкой на ситах с выбранным размером ячеек. Такая обработка позволяет отделить нематод от грунта, сконцентрировать их и затем выбрать необходимое число особей. При невозможности отбора живых нематод, что является стандартной ситуацией для полевых и экспедиционных работ, пробы грунта обычно замораживают, реже фиксируют в 4% формальдегиде или 96% этиловом спирте, а в последующем обрабатывают в лабораторных условиях. Можно выделить следующие основные варианты отбора особей: 1) живые из грунта либо после флотации, без использования каких-либо реактивов / живые после центрифугирования с коллоидными растворами силикатов;

2) после размораживания без использования реактивов / после размораживания и последующего центрифугирования с коллоидными растворами; 3) из фиксированных проб без / с использованием коллоидных растворов. Очевидно, что дополнительная обработка, тем более использование содержащих углерод и азот реактивов, может повлиять на конечные результаты и предпочтительной является работа с живым материалом.

Проведенные на литорали эстуария р. Шельда исследования нематод (Moens et al., 2002) не выявили значимого влияния использования коллоидных растворов силикатов, заморозки и фиксации формальдегидом на результаты SIRA. При этом наблюдалась отчетливая тенденция обогащения тяжелым изотопом углерода фиксированных формальдегидом образцов. Для образцов *Adoncholaimus fuscus* (Bastian, 1865), выделенных из грунта живыми, средние значения $\delta^{13}\text{C}$ составили $-18,5\text{‰}$, для фиксированных в формальдегиде $-16,5\text{‰}$. Образцы нематод (сообщество в целом) имели средние значения $\delta^{13}\text{C}$ $-14,7\text{‰}$ и $-13,4\text{‰}$ соответственно для выделенных живыми и фиксированных. Наши данные для глубоководной *Platonova magna* Mordukhovich et al., 2019 с западного склона Курило-Камчатского желоба свидетельствуют о значимом ($p=0,03$) влиянии фиксации 4% формальдегидом на значения $\delta^{13}\text{C}$. При этом фиксированные образцы оказались легче в среднем на $1,55\text{‰}$ ($-17,18\text{‰}$ vs $-18,73\text{‰}$, соответственно для отобранных живыми и фиксированных). Сходные с нашими данные о значимом влиянии фиксации на $\delta^{13}\text{C}$ и увеличении при этом содержания легкого изотопа были получены в экспериментальных исследованиях на большом числе разнообразных таксонов (головоногие, рыбы, креветки, насекомые, птицы) (например, Ruiz-Cooley et al., 2011). В ряде случаев, однако, показано и значимое обогащение образцов тяжелыми изотопами как углерода, так и азота при фиксации формальдегидом или этиловым спиртом, а также изменение изотопных показателей при заморозке (Feuchtmaur, Grey, 2003). В целом можно констатировать, что для морских свободноживущих нематод заморозка и центрифугирование с растворами силикатов представляются удобными и эффективными методами, позволяющими получать корректные, сопоставимые результаты SIRA. Фиксированные формалином/спиртом материалы также могут быть использованы для анализа, однако преимущественно в пределах одной работы, выполненной в рамках однотипных измерений, тогда результаты будут адекватно отражать трофические взаимодействия, но корректный

сравнительный анализ данных, выполненный по различным методикам, будет уже не всегда возможен.

Важно отметить, что использование в анализе всего тела нематод, вместе с содержимым кишечника, определяет возможность отражения в значениях изотопных показателей как усвоенного, так и только поглощенного вещества. В таких случаях общей рекомендацией к подготовке проб для SIRA является выдерживание организмов в голодной среде для очистки кишечника. К сожалению, такая процедура для морских нематод не всегда возможна, кроме того, у нематод отмечается задержка дефекации при голодании, что может сделать выдерживание в голодной среде не эффективным (Moens et al., 2005).

В большинстве проанализированных работ после отбора нематоды промывались в очищенной воде (обычно в системах очистки Milli-Q) и помещались в контейнеры из фольги (обычно оловянной) для элементного анализа, далее высушивались при 60°C в течение 3–24 ч, после чего использовались для анализа.

Определенное влияние на значения изотопических подписей может оказывать состав тканей исследуемых организмов. Известно, в частности, что липиды, синтезируемые в организме, обеднены ^{13}C из-за кинетических изотопных эффектов, которые возникают при превращении пирувата в ацетил-КоА (DeNiro, Epstein, 1977, 1978). В связи с этим изменчивость содержания липидов в тканях может отражаться в изменчивости значений $\delta^{13}\text{C}$ и ошибочно интерпретироваться как изменение рациона питания или среды обитания (Focken, Becker, 1998; Post et al., 2007). Пост с соавторами (Post et al., 2007) показали, что при анализе соотношений стабильных изотопов углерода для гидробионтов содержание липидов важно учитывать при их доле в сухой массе более 5% (соотношение C/N > 3,5) либо при существенных колебаниях их содержания в анализируемых материалах.

Данные о содержании липидов в морских нематодах немногочисленны. В восточной части Средиземного моря относительное содержание липидов в сухой массе нематод составляло в среднем 11% и 17% на глубинах 1 м и 950 м соответственно (Danovaro et al., 1999). В то же время для глубоководья Южного океана (>1990 м) указывается среднее значение 2%, при значительной пространственной изменчивости (Guilini et al., 2013). Известно, что для водных животных с высокой точностью судить о содержании липидов можно по отношению C/N (Post et al., 2007). Однако и

этот показатель приводится лишь в трех работах из 71 проанализированной, диапазон значений C/N нематод составил 4,0–6,1 (Leduc et al., 2009, 2015; Stratmann et al., 2018). Только в одной работе значения указаны на уровне вида (Leduc et al., 2015), в остальных – в целом для нематод. Нами для глубоководных нематод из Охотского и Берингова морей на основании 114 проб получен диапазон значений C/N 3,6–8,6, со средним арифметическим и медианой 5,3. В пределах одного вида значения изменялись от 3,6 до 7,7. Таким образом, на основании литературных и собственных данных можно утверждать о высоком содержании липидов в тканях нематод (>5%, C/N>3,5), значительной изменчивости этого содержания и, следовательно, обязательной необходимости учета липидов при оценке $\delta^{13}\text{C}$. Между тем в выявленных нами работах данные о результатах SIRA для морских нематод с поправкой на содержание липидов представлены единожды (Limen et al., 2007). Отсутствие информации о содержании липидов, или отношении C/N, часто затрудняет сравнение результатов SIRA из различных работ.

Для корректной экологической интерпретации результатов в ряде случаев рекомендуют удалять липиды перед изотопным анализом. Предложено несколько методов экстракции липидов из материалов, например неполярными растворителями, такими как гексан или 1:1 метанол:хлороформ (Beaudoin et al., 1999; Logan et al., 2008; Mateo et al., 2008). При этом разработанные методы имеют собственные недостатки, в частности могут влиять на получаемые значения $\delta^{15}\text{N}$ (Sotiropoulos et al., 2004). Для предупреждения появления возможных артефактов были предложены математические методы корректировки, или нормализации, содержания липидов после получения данных о содержании изотопов и C/N (Logan et al., 2008; Post et al., 2007). Проведенные исследования с использованием тех или иных методов экстракции и/или корректировки содержания липидов дают различающиеся результаты и в настоящее время единого мнения, единой методики, по этому вопросу нет (Voecklen et al., 2011; Mateo et al., 2008). Для нематод такие исследования не проводились, в качестве одного из рабочих вариантов можно задействовать часто применяемую для гидробионтов формулу $\delta^{13}\text{C}_{\text{нормализованный}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{необработанный}} - 3,32 + 0,99 \times \text{C/N}$ (Post et al., 2007).

На результаты анализа соотношений изотопов углерода могут повлиять кальцинированные покровы беспозвоночных, существенно обогащенные ^{13}C (Maraun et al., 2011). При наличии таких покровов образцы рекомендуют ацидифицировать раствором HCl (например, Kanaya et al., 2009;

Persaud et al., 2009). Однако подобная процедура может значительно увеличить ошибку измерений за счет вымывания ^{15}N из мягких тканей (Mateo et al., 2008; Vafeiadou et al., 2013). Так как кутикула нематод не содержит карбонатов, то ацидификация обычно не требуется.

Как отмечалось выше, при интерпретации результатов SIRA возможность прослеживания потоков органического вещества в трофических сетях определяется низким средним уровнем обогащения консументов тяжелым углеродом ($\Delta\delta^{13}\text{C} < 1\text{‰}$), в то время как оценка трофической позиции определяется стабильно высоким средним $\Delta\delta^{15}\text{N} \approx 3,4\text{‰}$. Хотя многие полевые исследования подтвердили эти средние значения (например, Fry, 1988; Keough et al., 1996; Vander Zanden, Rasmussen, 2001; Finlay, 2004; Ramirez et al., 2009), было и достаточно исключений. Результаты исследований показали, что фракционирование изотопов азота определенными видами консументов может зависеть от особенностей экскреции азота, диеты и изменяться при голодании (Fantle et al., 1999; Schmidt et al., 1999; Vanderklift, Ponsard, 2003; Goedkoop et al., 2006; Larsen et al., 2009). Отсутствие достаточного источника аминокислот в питании приводит к более высокой оборачиваемости азота у консументов и, следовательно, более высокой изотопной дискриминации (Ventura, Catalan, 2008). Вандерклифт и Понсард (Vanderklift, Ponsard, 2003) указывают в качестве среднего уровня обогащения консументов тяжелым азотом значение $\Delta\delta^{15}\text{N} \approx 2,54\text{‰}$, а для водных беспозвоночных, выделяющих в основном аммиак (к числу которых относятся и нематоды (Perry, Wright, 1998)), значение $\Delta\delta^{15}\text{N} \approx 2,00\text{‰}$. Таким образом, в определении трофического уровня, занимаемого нематодами, на основании данных SIRA требуется определенная осторожность.

Как уже отмечалось выше, в настоящее время исследования морских нематод с использованием SIRA охватывают разнообразные сообщества из всех океанов (луга морских трав, литоральные пляжи, абиссальные равнины, гидротермы, холодные высачивания и т.д.). Большинство работ (43, или 61% от общего числа) приходится на изучение нематод Атлантического океана, 16 (22%) – Тихого, 8 (11%) – Южного, 3 (4%) – Северного Ледовитого и 1 (1%) – Индийского. Диапазон охваченных глубин составляет от 0 м (литораль) до 5300 м, на изучение нематод литорали приходится 43% всех работ, 25% – сообщества на глубинах до 500 м и 32% – глубины более 500 м. Такая пространственная структура применения SIRA при изучении морских свободноживущих нематод, очевидно, определяется в первую очередь более интенсивным исследованием мейобен-

тосных сообществ Атлантики и прибрежных экосистем. Значения $\delta^{13}\text{C}$ в проанализированных публикациях варьировали от $-9,40\text{‰}$ (*Spilophorella* sp., литораль, о. Гонконг) до $-54,6\text{‰}$ (*Nematoda* sp., глубоководные холодные высачивания в Мексиканском заливе), значения $\delta^{15}\text{N}$ менялись от $-6,5\text{‰}$ (*Nematoda* sp., глубоководные холодные высачивания в Мексиканском заливе) до более 20‰ (*Enoplus brevis* Bastian, 1865, соленые марши в эстуарии р. Шельда). Диапазоны значений изотопических отношений свидетельствуют о широком спектре используемых нематодами пищевых ресурсов, так же как и о эффективности SIRA в трофоэкологических исследованиях морских нематод, чувствительности при отслеживании потоков органического вещества и анализе трофической структуры сообществ нематод, интерпретируемости результатов SIRA в контексте пищевых взаимодействий.

Разнообразие пищевых стратегий и используемых нематодами источников органического вещества (часть из которых не имеет выраженных изотопических различий либо характеризуется сильно перекрывающимися диапазонами изотопических подписей (Mutchler et al., 2004)), а также характерное для многих нематод смешанное питание определяют сложности интерпретации и ограничения использования SIRA. Существенно увеличить точность результатов исследований можно при использовании SIRA совместно с другими маркерами, в частности, эффективным для морских нематод оказалось использование анализа состава жирных кислот, позволившего получить дополнительную информацию (Leduc, 2009; Leduc, Probert, 2009; Van Gaever et al., 2009; Guilini et al., 2013; Braeckman et al., 2015; Leduc et al., 2015; Van Campenhout, Vanreusel, 2016; Mordukhovich et al., 2018; Wu et al., 2019). Многие потенциальные источники пищи имеют специфический состав жирных кислот (ЖК), по которому их можно идентифицировать и проследить их присутствие в составе липидов консументов (Kharlamenko et al., 2001; Dalsgaard et al., 2003; Kelly, Scheibling, 2012). Тем не менее совместное использование SIRA и FAA в исследованиях морских нематод остается редким. Нужно отметить, что жирнокислотный анализ имеет свои ограничения использования. В частности, в донных осадках часто накапливается органическое вещество от различных источников, имеющих сходные маркерные кислоты (табл. 1). Кроме того, было показано, что нематоды обладают способностью синтезировать полиненасыщенные ЖК, которые отсутствуют в их источнике пищи (Rothstein, Gotz, 1968; Hutzell, Krusberg, 1982; Leduc, Probert, 2009;), условия окружающей среды могут влиять на состав ЖК

(Van Campenhout, Vanreusel, 2016). При этом единичные исследования, посвященные изучению особенностей синтеза и накопления ЖК морскими свободноживущими нематодами, не дают возможности полноценно оценить эти процессы и их влияние на состав ЖК. Но, пожалуй, одним из ключевых препятствий использования FAA, как и для SIRA, является требование к минимально необходимой для анализа биомассе. Необходимость отбора большого числа особей затрудняет проведение исследований на достаточном уровне таксономического разрешения. Всего из проанализированных нами работ лишь в 23 (32%) нематоды идентифицированы на уровне родов и видов, обычно данные представлены для нематод в целом.

Таблица 1

**Некоторые жирные кислоты и показатели,
используемые в качестве маркеров**

ЖК	Основной источник ЖК	Литературный источник
Σ iso-15:0, anteiso-15:0, 15:0	Бактерии, грамположительные бактерии	Findlay et al., 1990; Kaneda, 1991
16:1(n-7)	Диатомовые ¹ ; бактерий ²	¹ Ackman et al., 1968; ² Perry et al., 1979
16:1(n-9)	Морские бактерии из донных осадков ¹ и глубинных слоев воды ² , глубоководные рыбы ³	¹ Zhao et al., 2015; ² Choi et al., 2015; ³ Yano et al., 1997
16:1(n-5)	Аэробные бактерии ¹ , Desulfobacteraceae ² ; глубоководные бактерии из донных осадков ³ ; бурые водоросли Dictyotaceae ⁴	¹ Findlay et al., 1990; ² Elvert et al., 2003; ³ Wang et al., 2014; ⁴ Khotimchenko, 1995
Σ iso-17:0, anteiso-17:0, 17:0	Сульфатредуцирующие и другие анаэробные бактерии	Findlay et al., 1990
18:1(n-9)	Копеподы ¹ ; морская микрофауна ² ; сильно разложившееся органическое вещество животного происхождения ³ ; бурые водоросли, динофлагелляты ⁴	¹ Kattner, Hagen, 2009; ² Findlay et al., 1990; ³ Graeve et al., 2001; ⁴ Kelly, Scheibling, 2012
Σ 18:1(n-7), 20:1(n-7), 22:1(n-7)	Бактерии	Ben-Mlih et al., 1992

18:2(n-6)	Грибы, водоросли, простейшие, цианобактерии ¹ ; органическое вещество наземного происхождения ² ; зеленые водоросли, морские травы ³	¹ Findlay et al., 1990; ² Budge, Parrish, 1998; ³ Kelly, Scheibling, 2012
20:1(n-9) + 22:1(n-11)	Каляноиды	Sargent, Falk-Pettersen, 1988
20:4(n-6)	Красные и бурые водоросли ¹ ; простейшие ² ; фораминиферы ³	¹ Kelly, Scheibling, 2012; ² Sargent et al., 1987; ³ Larkin et al., 2014
20:5(n-3)	Диатомовые ¹ ; красные и бурые водоросли, динофлагелляты ² ; глубоководные бактерии ³	¹ Ackman et al., 1968; ² Kelly, Scheibling, 2012; ³ Yano et al., 1997
22:6(n-3)	динофлагелляты, зоопланктон ¹ ; глубоководные бактерии ²	¹ Dalsgaard et al., 2003; ² Yano et al., 1997
Σ22:4(n-8) и 22:5(n-5)	Глубоководные аглютинированные фораминиферы	Kharlamenko et al., 2017; Kharlamenko, 2018
Высокие значения отношений: 20:5(n-3)/22:6(n-3) 16:1(n-7)/16:0	Диатомовые	Nelson et al., 2001; Reuss, Poulsen, 2002

В морских акваториях России были изучены соотношения стабильных изотопов углерода и азота в тканях нематод из антропогенно модифицированных экосистем б. Золотой Рог (Kiyashko et al., 2001) и сообществ Курильской котловины и восточного склона Курильских островов (Mordukhovich et al., 2018).

Донные осадки б. Золотой Рог характеризуются экстремально высоким загрязнением с содержанием углеводородов до 11,39 мг/г в со, значительными концентрациями тяжелых металлов, ДДТ и их производных и других поллютантов (Мощенко и др., 2019). Весной-осенью 2000 г. среднее значение $\delta^{13}\text{C}$ для донных осадков составляло $-26,97\text{‰}$ (Kiyashko et al., 2001), а нематоды *Oncholaimus ramosum* (Smolyanko & Belogurov, 1987), доминирующий вид в сообществе, были существенно обеднены изотопом ^{13}C ($-21,7\text{‰}$) по сравнению с гидробионтами контрольной станции ($\leq -18,2\text{‰}$). Различие в изотопном составе гидробионтов авторы объяснили ассимиляцией животными из б. Золотой Рог изотопно легкого углерода аллохтонного органического вещества (в том числе нефтеуглеводородов), включаемого в пищевую цепь сообщества через бактерий.

Проведенные в 2017 г. повторные исследования также выявили обеднение органического вещества донных осадков изотопом ^{13}C на станциях в б. Золотой Рог относительно контрольной станции (табл. 2), свидетельствуя о высокой доле аллохтонного органического вещества в донных осадках бухты.

Таблица 2

Значения соотношений стабильных изотопов углерода и азота в донных осадках и тканях нематод (для *O. ramosum* среднее арифметическое \pm среднеквадратическое отклонение, $n=3$)

Станция	Образец, таксон	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	Донные осадки	4,0	-25,7
2	Донные осадки	3,5	-26,1
3	Донные осадки	10,2	-25,9
4	Донные осадки	5,0	-24,5
5	Донные осадки	3,8	-22,5
2	<i>O. ramosum</i>	8,0 \pm 0,5	-21,8 \pm 0,3
2	Chromadoridae	5,8	-22,4
3	<i>O. ramosum</i>	10,4 \pm 0,4	-21,0 \pm 0,3
4	<i>O. ramosum</i>	10,6 \pm 0,7	-21,3 \pm 0,1
4	Chromadoridae	8,4	-20,9

Наиболее обеднены тяжелыми изотопами углерода донные осадки на ст. 2 (рис. 1), по направлению к выходу из бухты наблюдается постепенное обогащение изотопом ^{13}C . Для нематод также отмечается существенное обеднение тяжелым изотопом по сравнению с внешними станциями. Нематоды *O. ramosum*, встречавшиеся на всей акватории б. Золотой Рог и составлявшие основу биомассы нематоценов, значимо ($p<0,05$) обеднены изотопами ^{13}C и ^{15}N на ст. 2 относительно станций 3 и 4, располагающихся ближе к выходу. Тенденция обогащения тяжелыми изотопами по направлению к выходу из бухты четко прослеживается и на примере хроматорид: 5,8 $\delta^{15}\text{N}$ и -22,4 $\delta^{13}\text{C}$ на ст. 2 относительно 8,4 $\delta^{15}\text{N}$ и -20,9 $\delta^{13}\text{C}$ на ст. 4. Таким образом, можно констатировать, что поступающее и накапливающееся в донных осадках бухты органическое вещество аллохтонного происхождения ассимилируется бактериями и включается в пищевые цепи. При этом нематоды, имеющие плотность поселения в бухте до 1,9 млн экз./м², играют одну из ключевых ролей в потоках вещества в бентосных сообществах.

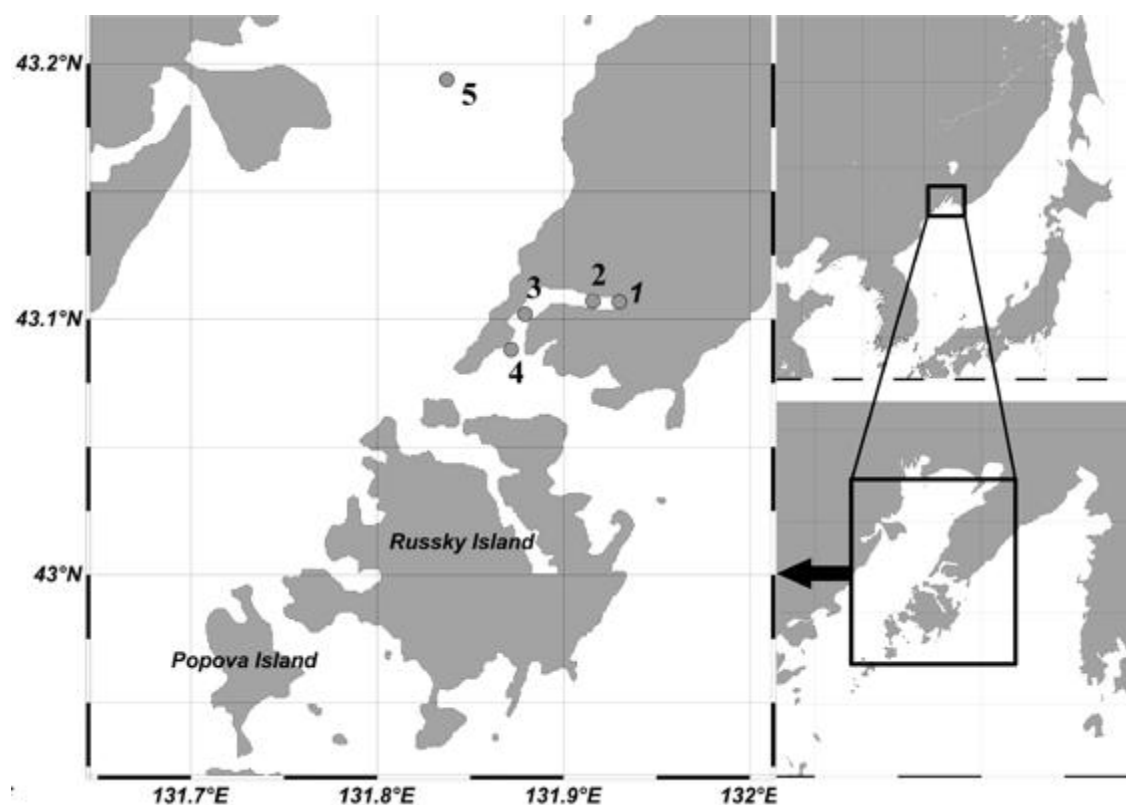


Рис. 1. Карта-схема отбора проб в б. Золотой Рог.

Необходимо отметить, что более 60% территории планеты занимают глубоководные донные сообщества Мирового океана (Ramirez-Lorda et al., 2010). Экосистемы морских глубин играют значительную роль в функционировании биосферы, вещественно-энергетических потоках и биогеохимических циклах отдельных элементов. Существенной особенностью донных сообществ на больших глубинах является доминирование среди многоклеточных организмов по численности представителей размерной группы мейобентоса, основу обилия которого (до 99%) составляют свободноживущие нематоды с плотностью поселения до миллионов экз./м² (Чесунов, 2006; Мокиевский, 2009; Rex et al., 2006; Giere, 2009). Полноценные количественные исследования сообществ нематод океанических глубин начались во второй половине XX столетия. Несмотря на накопленные за прошедшие десятилетия знания, информация о экологии глубоководных нематод, их роли в функционировании донных сообществ крайне ограничена. Во многом это связано со сложностью использования традиционных методов исследований. Использование SIRA позволило получить значительный объем новых данных (например, Van Gaever et al., 2009; Guilini et al., 2010; Ingels et al., 2011; Pape et al., 2011; Leduc et al., 2015).

В 2015 г. были начаты трофэкологические исследования глубоководных нематод северо-западной части Тихого океана (рис. 2) в ходе комплексной российско-германской экспедиции SokhoBio (Mordukhovich et al., 2018). Значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ для нематод и донных осадков представлены в табл. 3. Для изотопных показателей глубоководных донных осадков выявлена небольшая изменчивость: для Охотского моря средние значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ составляли $-21,9\text{‰}$ и $7,4\text{‰}$; для Тихого океана значения этих показателей были $-20,8\text{‰}$ и $5,7\text{‰}$, соответственно. Значения соотношений стабильных изотопов углерода и азота в тканях нематод имели диапазон от $-16,4\text{‰}$ до $-37,8\text{‰}$ для $\delta^{13}\text{C}$ и от $5,7\text{‰}$ до $19,2\text{‰}$ для $\delta^{15}\text{N}$. В целом, изотопные показатели нематод были значимо различны между регионами. Нематоды из Охотского моря характеризовались обеднением ^{13}C (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,006$) и ^{15}N (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,015$).

На станциях в Тихом океане все исследованные в 2015 г. нематоды были обогащены тяжелыми изотопами углерода и азота в сравнении с донными осадками. Различия в изотопических показателях между *Metaphanoderma* sp., Desmodorinae и двумя онхоляимидами (*Metoncholaimus* sp. и *Oncholaimus* sp.), имеющими разное строение ротовой полости и относимыми по морфологическим данным к трем различным трофическим группам, были сопоставимы по величине с изменчивостью для отдельных особей *Platonova magna*. В то же время третий вид онхоляимид (*Pontonema* sp.) был значительно обеднен ^{15}N ($>3\text{‰}$). Относительно низкие значения $\delta^{15}\text{N}$ для *Pontonema* sp. предполагают, что этот вид занимает более низкое трофическое положение по сравнению с *Metoncholaimus* sp. и *Oncholaimus* sp. Однако, как уже отмечалось, интерпретация значений $\delta^{15}\text{N}$ должна осуществляться с осторожностью. Изучение содержимого кишечника нескольких особей *Pontonema* sp. показало наличие остатков нематод, что указывает на хищный образ жизни. Ранее подобные данные по анализу содержимого кишечника понтонем были показаны для глубоководных акваторий Арктики (Fonseca, Gallucci, 2008). Более высокие значения $\delta^{15}\text{N}$ для *Metoncholaimus* sp. и *Oncholaimus* sp. могут указывать на увеличение в диете этих представителей «всеядных» нематод доли детритофагии. В целом эти результаты согласуются с исследованиями мелководных нематод, где было показано, что близкородственные виды/роды, принадлежащие к одной трофической группе, не обязательно используют одни и те же ресурсы, а морфологически сильно раз-

личные, с разным строением ротовой полости могут иметь очень сходные показатели изотопного состава (Moens et al., 2005, 2014; Vafeiadou et al., 2014; Wu et al., 2019).

Нематоды из Охотского моря (за исключением *Metoncholaimus* sp. на ст. 3) были значительно обеднены ^{13}C относительно органического вещества донных осадков. Такие низкие значения $\delta^{13}\text{C}$ ($<-30\text{‰}$) характерны для сообществ гидротерм и холодных высачиваний (Levin, Michener 2002; Levin, 2005), где органическое вещество хемотрофных бактерий может иметь значительную долю в питании гидробионтов, как через симбиотические взаимоотношения, так и за счет прямого выедания. Все три изученных в Охотском море вида имеют просторную и вооруженную стому и по классификации Визера (Wieser, 1953) относятся к одной трофической группе – всеядных хищников. Сканирующая электронная и световая микроскопия не выявили эктосимбионтов у изученных нематод. К сожалению, фиксация материала не позволяла провести исследования с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, как и осуществить молекулярно-генетический анализ для однозначного ответа о наличии эндосимбионтов. Однако имеющиеся данные позволяют с высокой уверенностью утверждать о смешанном питании изученных видов, включающем органическое вещество фитопланктонного происхождения и хемосинтетиков микробных сообществ донных осадков. Поскольку изотопный состав потенциальных источников углерода в ходе работы не был исследован по логистическим причинам, количественно оценить вклад в питание нематод органического вещества хемосинтетического происхождения не представляется возможным. Бактериальные маты или другие характерные проявления гидротерм и сипов в исследовании не были выявлены, однако известно о наличии в Курильской котловине акваторий с повышенными концентрациями метана (Шакиров и др., 2017). Необходимо отметить, что значения $\delta^{13}\text{C}$ для организмов макро- и мегабентоса (*Bivalvia*, *Echinoidea*, *Echiura*, *Holothuroidea*, *Ophiuroidea*, *Polychaeta*, *Sipuncula*) на исследуемых станциях варьировали от $-20,3\text{‰}$ до $-13,0\text{‰}$ для Охотского моря и от $-18,0\text{‰}$ до $-13,1\text{‰}$ для Тихого океана (Харламенко и Кияшко, неопубликованные данные). Эти данные соответствуют предположению, что макробентос и нематоды могут иметь различные основные источники углерода (van Oevelen et al., 2009; Maria et al., 2012; Braeckman et al., 2015). Кроме того, особенности изотопного состава нематод из Охотского моря мо-

гут свидетельствовать о сильно недооцененной роли хемосинтеза в бентосных трофических сетях.

Таблица 3

Значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в донных осадках и нематодах из Курильской котловины (Охотское море) и склона Курило-Камчатского желоба (Тихий океан)

Образец, таксон	Станция	Регион	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
<i>Metoncholaimus</i> sp.	2	Охотское море	-32,1	9,3
Донные осадки	2	Охотское море	-22,1	7,2
<i>Metoncholaimus</i> sp.	3	Охотское море	-21,1	19,2
<i>Enoploides</i> sp.	3	Охотское море	-31,3	9,3
<i>Curvolaimus</i> sp.	3	Охотское море	-37,8	5,7
Донные осадки	3	Охотское море	-22,0	7,2
<i>Curvolaimus</i> sp.	4	Охотское море	-36,0	8,4
<i>Metoncholaimus</i> sp.	4	Охотское море	-32,0	8,4
Донные осадки	4	Охотское море	-21,6	7,1
<i>Metaphanoderma</i> sp.	9	Тихий океан	-17,9	13,9
<i>Oncholaimus</i> sp.	9	Тихий океан	-20,5	13,8
<i>Platonova magna</i>	9	Тихий океан	-17,1	15,1
<i>Platonova magna</i>	9	Тихий океан	-19,3	13,6
<i>Platonova magna</i>	9	Тихий океан	-17,1	15,4
<i>Platonova magna</i>	9	Тихий океан	-16,5	15,9
<i>Platonova magna</i>	9	Тихий океан	-16,6	14,8
<i>Platonova magna</i>	9	Тихий океан	-16,4	14,7
Донные осадки	9	Тихий океан	-20,7	5,8
<i>Oncholaimus</i> sp.	10	Тихий океан	-19,3	13,3
<i>Metoncholaimus</i> sp.	10	Тихий океан	-20,5	14,7
<i>Pontonema</i> sp.	10	Тихий океан	-17,6	9,0
Desmodorinae	10	Тихий океан	-19,4	12,2
Донные осадки	10	Тихий океан	-20,9	5,7

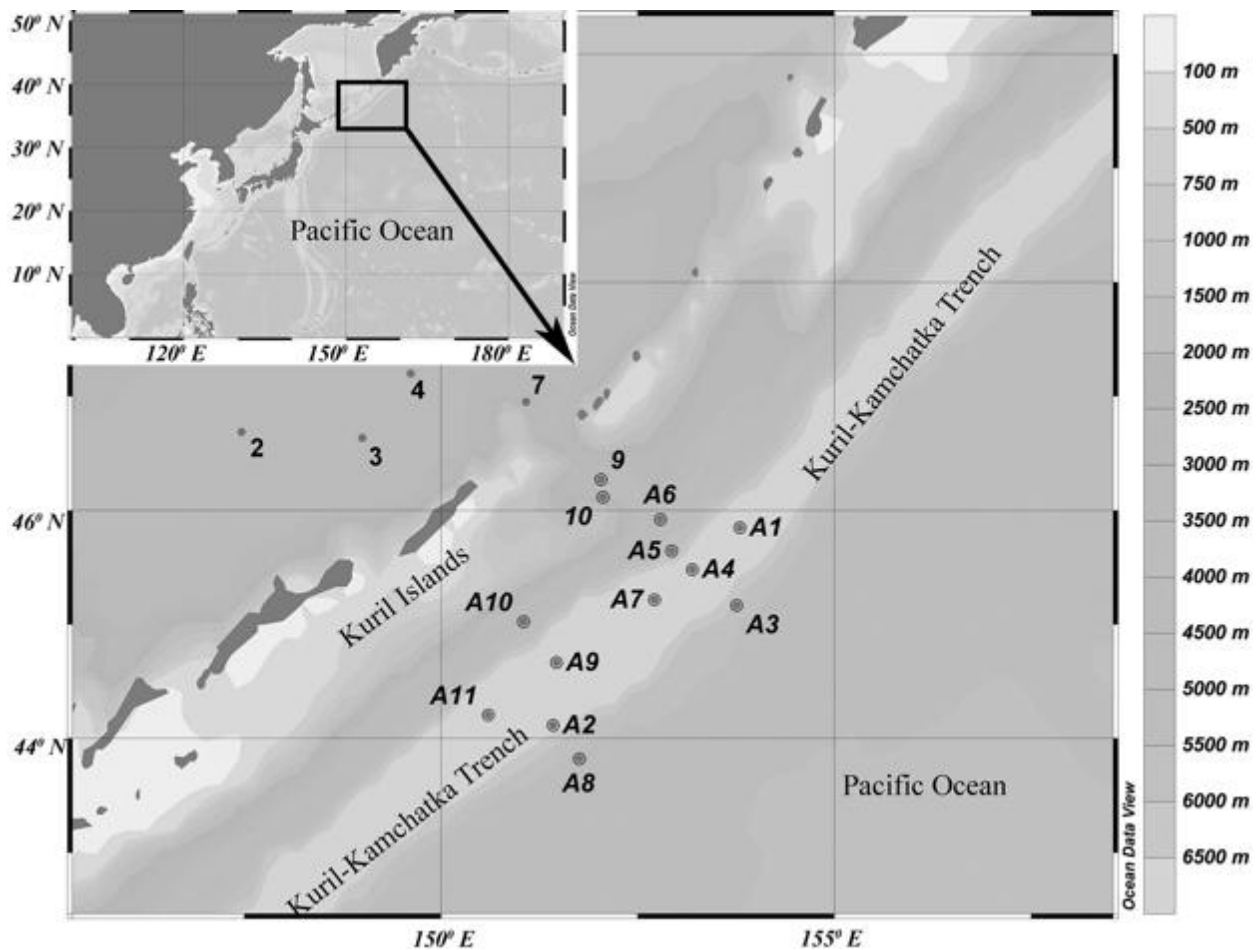


Рис. 2. Карта-схема отбора проб для анализа соотношений стабильных изотопов в тканях нематод в ходе экспедиций SokhoBio в 2015 г. (2–4, 7, 9, 10) и KuramBioII в 2016 г. (A1–A11).

Для уточнения результатов SIRA в трофэкологических исследованиях глубоководных нематод северо-западной части Тихого океана был проведен анализ состава жирных кислот (табл. 4) (Mordukhovich et al., 2018). Полученные данные демонстрируют значительные различия в профилях жирных кислот изученных видов, что предполагает использование ими различных источников пищи. В составе ЖК всех изученных видов преобладали кислоты планктонного происхождения. Тем не менее бактериальные ЖК также были многочисленными, а 18:1(n-7) имели самую высокую концентрацию. По-видимому, органическое вещество из микробных пищевых сетей играет важную роль в питании *Metaphanoderma* sp., *Oncholaimus* sp. и *P. magna*.

**Состав жирных кислот (% от общего) нематод Курильской котловины и склона Курило-Камчатского желоба.
Пять наиболее обильных ЖК выделены шрифтом**

ЖК	Станция					
	10	10	9	9	7	2
	<i>Metaphanoderma</i>	<i>Oncholaimus</i>		<i>Platonova magna</i>	<i>Metoncholaimus</i>	
14:0	2,6	2,1	3,4	1,0	3,0	0,3
<i>iso</i> -15:0	0,0	0,8	1,4	0,2	1,1	0,0
<i>anteiso</i> -15:0	0,0	0,7	0,9	0,2	0,6	0,6
15:0	0,4	0,7	0,8	0,4	1,5	2,2
<i>iso</i> -16:0	0,6	0,9	1,0	0,5	1,4	1,1
16:0	13,1	10,7	9,1	5,2	18,3	20,5
16:1(n-7)	6,8	4,9	4,4	5,0	3,9	7,9
<i>iso</i> -17:0	1,1	0,9	0,8	1,2	1,0	1,1
<i>anteiso</i> -17:0	0,6	1,0	1,1	1,1	1,0	1,0
Phytanic acid	0,7	0,8	0,0	0,2	1,2	0,4
17:0	0,5	0,8	0,7	1,1	0,7	1,6
<i>iso</i> -18:0	2,8	0,9	0,9	0,5	1,0	1,3
18:0	10,3	7,5	5,8	3,7	8,4	9,2
18:1(n-9)	27,8	8,0	4,9	13,1	5,3	6,4
18:1(n-7)	5,3	10,4	10,4	9,6	12,5	10,1
18:1(n-5)	0,3	1,4	0,8	1,5	0,0	0,5
18:2(n-6)	2,2	1,3	0,0	0,7	1,5	1,9
20:1(n-11)	0,0	5,7	4,1	2,0	1,0	1,6
20:1(n-9)	1,2	3,2	3,2	2,0	1,1	1,5
20:1(n-7)	1,6	2,6	2,5	4,0	2,9	7,9
20:4(n-6)	9,2	4,0	6,1	4,9	13,1	5,8
20:5(n-3)	5,8	9,2	11,7	17,2	6,2	4,0
22:1(n-11)+(n-13)	1,0	7,6	7,1	2,5	2,8	2,3
22:1(n-9)	0,0	2,1	1,5	1,9	0,9	1,1
22:1(n-7)	1,0	0,7	1,4	0,7	0,8	1,1
22:5(n-3)	0,4	1,3	2,3	6,8	0,7	1,4
22:6(n-3)	1,1	8,0	10,5	11,7	3,1	3,1
Не определены	3,1	1,6	2,9	1,1	5,0	4,1

На ст. 2 *Metoncholaimus* sp. был значительно обеднен тяжелым углеродом ($\delta^{13}\text{C}$ составляло $-32,1\text{‰}$), что свидетельствует о вкладе в рацион продукции хемосинтеза. Для этого вида отмечены самые высокие концентрации бактериальных ЖК. Кроме того, *Metoncholaimus* sp. характеризуется по сравнению с другими таксонами низким обилием 20:5(n-3) и 22:6(n-3), высокой долей 20:1(n-7) и наличием 22:1(n-7). В глубоководных местообитаниях высокие уровни n-7 мононенасыщенных жирных кислот были обнаружены у беспозвоночных с бактериальными симбионтами (Kelly, Scheibling, 2012), а также у питающихся хемотрофными бактериями нематод и копепод (Van Gaever et al., 2009). Таким образом, анализ ЖК подтверждает результаты SIRA.

На тихоокеанских станциях для *Oncholaimus* sp. отмечены относительно высокие концентрации длинноцепочечных мононенасыщенных жирных кислот (20:1(n-11), 20:1(n-9), 22:1(n-11), 22:1(n-9)) – до 19%. Эти ЖК характерны для планктонных ракообразных (Falk-Petersen et al., 1987; Sargent, Falk-Petersen, 1988), которые, по всей видимости, имеют большое значение как источник пищи для *Oncholaimus* sp.

Состав ЖК *Metaphanoderma* sp. и *P. magna* имеет самые высокие концентрации олеиновой кислоты 18:1(n-9) (28% и 13% соответственно) и самые высокие отношения 18:1(n-9)/18:1(n-7) (соответственно 5,2 и 1,4), что характерно для плотоядных организмов (Graeve et al., 1997; Nyssen et al., 2005; Kiyashko et al., 2014). Однако высокие концентрации олеиновой кислоты могут быть связаны с разложением организмов в донных осадках (Søreide et al., 2008; Kiyashko et al., 2014; Leduc et al., 2015). Было показано увеличение концентраций 18:1(n-9) и величины отношения 18:1(n-9)/18:1(n-7) для сейстонофагов и детритофагов (Legeżyńska et al., 2014), а также нематод бактериофагов (Van Campenhout, Vanreusel, 2016). Таким образом высокие значения $\delta^{15}\text{N}$ для *Metaphanoderma* sp. и *P. magna* могут быть связаны с их высоким положением в микробной пищевой сети.

В 2016 г. трофоэкологические исследования глубоководных нематод были продолжены на основании сборов в Курило-Камчатском желобе в ходе совместной германо-российской экспедиции KuramBioII (рис. 2).

Впервые для нематод были получены данные о индивидуальной изменчивости соотношений стабильных изотопов в пределах одного вида (*Platonova verecunda* Mordukhovich et al., 2019) на обширном материале (n=24) в диапазоне глубин 5146–9293 м. Значения изотопных показателей

P. verecunda варьировали от $-14,9\text{‰}$ до $-18,0\text{‰}$ для $\delta^{13}\text{C}$ и от $13,6\text{‰}$ до $18,9\text{‰}$ для $\delta^{15}\text{N}$. Значимой корреляции между $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ выявлено не было. Достоверных гендерных различий в изотопном составе нематод не обнаружено.

Изменчивость значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ отдельных особей в пределах одной станции составила $2,2\text{‰}$ и $2,3\text{‰}$, соответственно. На основании строения стомы и ее вооружения очень крупные ($>1,5$ см) *P. verecunda* отнесены к хищным-всеядным нематодам. Однако высокие значения $\delta^{15}\text{N}$ могут свидетельствовать не о высоком трофическом уровне (хищничестве) *P. verecunda*, а о степени бактериальной переработки доступной пищи и значительной роли «микробной петли». На это указывают и выявленные закономерности изменений изотопного состава нематод с увеличением глубины – увеличение значений $\delta^{15}\text{N}$, без значимых изменений $\delta^{13}\text{C}$ (рис. 3). В целом проведенные исследования демонстрируют высокую индивидуальную и пространственную изменчивость значений $\delta^{15}\text{N}$ и $\delta^{13}\text{C}$ глубоководных нематод, которая должна учитываться при проведении исследований.

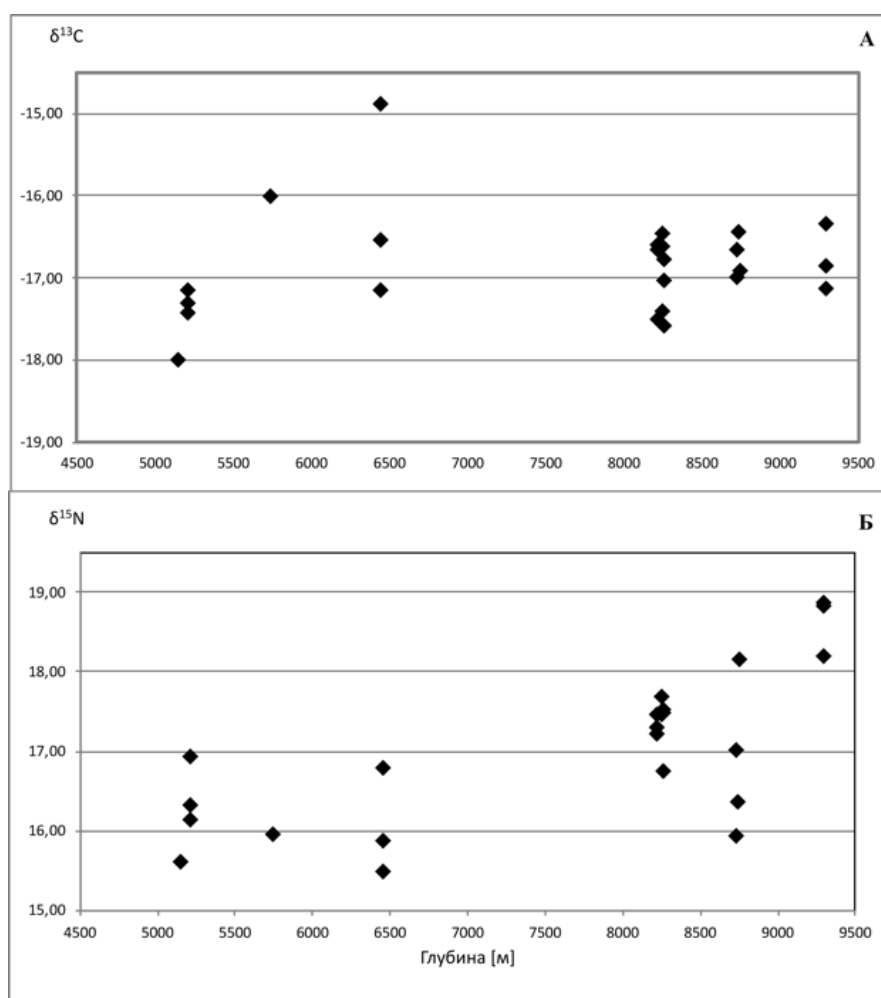


Рис. 3. Изменение изотопных показателей $\delta^{13}\text{C}$ (А) и $\delta^{15}\text{N}$ (Б) у нематоды *Platonova verecunda* вдоль батиметрического градиента.

Заключение

Анализ имеющихся в опубликованных работах данных демонстрирует широкий спектр пищевых ресурсов, используемых морскими нематодами, что делает этот таксон потенциально удобным объектом в отслеживании потоков органического вещества в бентосных сообществах, оценке включения органики различного происхождения в пищевые сети, мониторинге изменений, в том числе антропогенно обусловленных. Кроме того, результаты подчеркивают наличие нескольких трофических уровней в сообществах нематод, дифференциацию пищевых ресурсов между видами, в том числе близкородственными и/или относимыми к одной трофической гильдии на основании морфологических данных. В то же время для ряда видов показана гибкость пищевого поведения, возможность расширения/сужения трофической ниши в зависимости от внешних факторов. Важно отметить и наличие серьезных ограничений при использовании биогеохимических маркеров. К ключевым можно отнести ограниченную разрешающую способность маркеров, не всегда способных однозначно разграничить используемые источники и оценить их вклад в диету, слабую изученность изменчивости принимаемых значений и роли факторов, не связанных с источником пищи, необходимость набора значительного числа особей для успешного анализа. Однако в целом имеющиеся результаты свидетельствуют о эффективности использования методов SIRA и FAA при исследовании экологии свободноживущих морских нематод, значимости получаемых результатов и, безусловно, высокой перспективности дальнейшего их комплексного использования, особенно при сочетании с другими методами.

Благодарности

Авторы выражают огромную признательность редакторам за помощь в подготовке текста и колоссальное терпение. Реализация этого проекта была бы невозможной без помощи Владимира Ивановича Харламенко (1950–2019 гг.), чьи советы и активное участие трудно переоценить.

Список литературы

Кияшко С.И. Изучение потоков углерода в морских экосистемах по природным соотношениям стабильных изотопов // Биол. моря. 1987. № 5. С. 3–12.

Кузнецова Н.А., Семенова Е.Э., Короткевич А.Ю. и др. Изотопные методы и структурно-функциональный подход в экологии сообществ: новая жизнь старой методологии (на примере таксоценоза коллембол) // Чтения памяти академика В.Н. Сукачева. XXIII. Потoki вещества и энергии в трофических сетях: современные методы изучения / Отв. ред. В.В. Рожнов. М.: Т-во научных изданий КМК, 2014. С. 57–85.

Мокиевский В.О. Экология морского мейобентоса. М.: Т-во научных изданий КМК, 2009. 286 с.

Мощенко А.В., Белан Т.А., Борисов Б.М. и др. Современное загрязнение донных отложений и экологическое состояние макрозообентоса в прибрежной зоне Владивостока (залив Петра Великого Японского моря) // Изв. ТИНРО. 2019. Т. 196. С. 155–181.

Потоки вещества и энергии в трофических сетях: современные методы изучения. Чтения памяти академика В.Н. Сукачева. XXIII / Отв. ред. В.В. Рожнов. М.: Т-во научных изданий КМК, 2014. 94 с.

Тарасов В.Г., Кияшко С.И., Адрианов А.В. Проблемы оценки влияния антропогенного загрязнения на функционирование прибрежных морских экосистем // Динамика морских экосистем и современные проблемы сохранения биологического потенциала морей России / Отв. ред. В.Г. Тарасов. Владивосток: Дальнаука, 2007. С. 239–276.

Тиунов А.В. Стабильные изотопы, ДНК и жирные кислоты: новые методы в трофической экологии // Чтения памяти академика В.Н. Сукачева. XXIII. Потoki вещества и энергии в трофических сетях: современные методы изучения / Отв. ред. В.В. Рожнов. М.: Т-во научных изданий КМК, 2014. С. 10–20.

Чесунов А.В. Биология морских нематод. М.: Т-во научных изданий КМК, 2006. 367 с.

Шакиров Р.Б., Обжиров А.И., Шакирова М.В. Газогеохимические поля Охотоморского и Япономорского регионов // Технические проблемы освоения Мирового океана. 2017. Т. 7. С. 257–261.

Ackman R.G., Tocher C.S., McLachlan J. Marine phytoplankter fatty acids // J. Fish. Res. Board Can. 1968. Vol. 25. P. 1603–1620.

Austen M.C., Widdicombe S. Comparison of the response of meio- and macrobenthos to disturbance and organic enrichment // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2006. Vol. 330. P. 96–104.

Balsamo M., Semprucci F., Frontalini F. et al. Meiofauna as a Tool for Marine Ecosystem Biomonitoring // Marine Ecosystems / Ed. Antonio Cruzado, InTech. 2012. P. 77–104.

Barnard C., Martineau C., Frenette J.-J. et al. Trophic position of zebra mussel veligers and their use of dissolved organic carbon // Limnol. Oceanogr. 2006. Vol. 51. P. 1473–1484.

Beaudoin C.P., Tonn W.M., Prepas E.E. et al. Individual specialization and trophic adaptability of northern pike (*Esox lucius*): an isotope and dietary analysis // Oecologia. 1999. Vol. 120. P. 386–396.

Ben-David M., Flaherty E.A. Stable isotopes in mammalian research: a beginner's guide // J. Mammal. 2012. V. 93. P. 312–328.

Ben-Mlih F., Marty J.-C., Fiala-Médioni A. Fatty acid composition in deep hydrothermal vent symbiotic bivalves // J. Lipid Res. 1992. Vol. 33. P. 1797–1806.

Boecklen W.J., Yarnes C.T., Cook B.A. et al. On the use of stable isotopes in trophic ecology // Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2011. Vol. 42. P. 411–440.

Bongers T., Ferris H. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring // Trends Ecol. Evol. 1999. Vol. 14. P. 224–228.

Borchardt M.A., Bott T.L. Meiofaunal grazing on bacteria and algae in a Piedmont stream // J. N. Am. Benth. Soc. 1995. Vol. 14. P. 278–298.

Bouwman L.A., Romeyn K., Kremer D.R. et al. Occurrence and feeding biology of some nematode species in estuarine aufwuchs communities // Cah. Biol. Mar. 1984. Vol. 25. P. 287–303.

Braeckman U., Provoost P., Sabbe K. et al. Temporal dynamics in a shallow coastal benthic food web: Insights from fatty acid biomarkers and their stable isotopes // Mar. Environ. Res. 2015. Vol. 108. P. 55–68.

Budge S.M., Parrish C.C. Lipid biogeochemistry of plankton, settling matter and sediments in Trinity Bay, Newfoundland. II. Fatty acids // Org. Geochem. 1998. Vol. 29. P. 1547–1559.

Canuel E.A., Cloern J.E., Ringelberg D.B. et al. Molecular and isotopic tracers used to examine sources of organic matter and its incorporation into the food webs of San Francisco Bay // Limnol. Oceanogr. 1995. Vol. 40. P. 67–81.

Carman K.R., Fry B. Small-sample methods for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis of the diets of marsh meiofaunal species using natural-abundance and tracer-addition isotope techniques // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2002. Vol. 240. P. 85–92.

Chia F.S., Warwick R.M. Assimilation of labelled glucose from sea water by marine nematodes // *Nature*. 1969. Vol. 224. P. 720–721.

Choi A., Song J., Joung Y. et al. *Lentisphaera profundus* sp. nov., isolated from deep-sea water // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. Vol. 65. P. 4186–4190.

Cole J.J., Carpenter S.R., Kitchell J.F. et al. Pathways of organic carbon utilization in small lakes: Results from a whole-lake ¹³C addition and coupled model // *Limnol. Oceanogr.* 2002. Vol. 47. P. 1664–1675.

Couch C.A. Carbon and nitrogen stable isotopes of meiobenthos and their food resources // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 1989. Vol. 28(4). P. 433–441.

Coull B.C., Chandler G.T. Pollution and meiofauna: field, laboratory, and mesocosm studies // *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 1992. Vol. 30. P. 191–271.

Dalsgaard J., John St.M., Kattner G. et al. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment // *Adv. Mar. Biol.* 2003. Vol. 46. P. 225–340.

Danovaro R., Dell'Anno A., Martorano D. et al. Seasonal variation in the biochemical composition of deep-sea nematodes: Bioenergetic and methodological considerations // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1999. Vol. 179. P. 273–283.

DeNiro M.J., Epstein S. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis // *Science*. 1977. Vol. 197. P. 261–263.

DeNiro M.J., Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1978. Vol. 42(5). P. 495–506.

Deuser W. Isotopic evidence for diminishing supply of available carbon during diatom bloom in the Black Sea // *Nature*. 1970. Vol. 225(5237). P. 1069–1071.

Deutsch A. Gut structure and digestive physiology of the free-living marine nematodes, *Chromadorina germanica* (Buetschli, 1874) and *Diplolaimella* sp. // *Biol. Bull.* 1978. Vol. 155. P. 317–335.

Elvert M., Boetius A., Knittel K. et al. Characterization of specific membrane fatty acids as chemotaxonomic markers for sulfate-reducing bacteria involved in anaerobic oxidation of methane // *Geomicrobiol. J.* 2003. Vol. 20. P. 403–419.

Epstein S.S. Microbial food webs in marine sediments. I. Trophic interactions and grazing rates in two tidal flat communities // *Microb. Ecol.* 1997. Vol. 34. P. 188–198.

Epstein S.S., Shiaris M.P. Rates of microbenthic and meiobenthic bacterivory in a temperate muddy tidal flat community // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. Vol. 58. P. 2426–2431.

Falk-Petersen S., Sargent J.R., Henderson J. et al. Lipids and fatty acids in ice algae and phytoplankton from the Marginal Ice Zone in the Barents Sea // *Polar Biol.* 1998. Vol. 20. P. 41–47.

Fantle M.S., Dittel A.I., Schwalm S.M. et al. A food web analysis of the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids // *Oecologia.* 1999. Vol. 120. P. 416–426.

Feuchtmayr H., Grey J. Effect of preparation and preservation procedures on carbon and nitrogen stable isotope determinations from zooplankton // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 17. P. 2605–2610.

Findlay R.H., Trexler M.B., Guckert J.B. et al. Laboratory study of disturbance in marine sediments: response of a microbial community // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1990. Vol. 62. P. 121–133.

Finlay J.C. Stable-carbon-isotope ratios of river biota: implications for energy flow in lotic food webs // *Ecology.* 2001. Vol. 82. P. 1052–1064.

Finlay J.C. Patterns and controls of lotic algal stable carbon isotope ratios // *Limnol. Oceanogr.* 2004. Vol. 49. P. 850–861.

Fleeger J.W., Carman K.R. Experimental and genetic studies of meiofauna assess environmental quality and reveal mechanisms of pollution fate and effects // *Vie et Milieu.* 2011. Vol. 61. P. 1–26.

Focken U., Becker K. Metabolic fractionation of stable carbon isotopes: implications of different proximate compositions for studies of the aquatic food webs using $\delta^{13}\text{C}$ data // *Oecologia.* 1998. Vol. 115. P. 337–343.

Fonseca G., Gallucci F. Direct evidence of predation in deep-sea nematodes: the case of *Pontonema* sp. // *Cah. Biol. Mar.* 2008. Vol. 49. P. 295–297.

Fourqurean J.W., Moore T.O., Fry B. et al. Spatial and temporal variation in C:N:P ratios, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{13}\text{C}$ of eelgrass *Zostera marina* as indicators of ecosystem processes, Tomales Bay, California, USA // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1997. Vol. 157. P. 147–157.

Fry B. Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions // *Limnol. Oceanogr.*, 1988. Vol. 33. P. 1182–1190.

Fry B. Stable isotope ecology. New York: Springer-Verlag, 2006. 308 p.

Fry B., Arnold C. Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*Penacus aztecus*) // *Oecologia.* 1982. Vol. 54(2). P. 200–204.

Fry B., Sherr E. ^{13}C measurements as indicators of carbon flow in marine freshwater ecosystems // *Contribs. Mar. Sci.* 1984. Vol. 27. P. 13–47.

Gerlach S.A. Attraction to decaying organisms as a possible cause for patchy distribution of nematodes in a Bermuda beach // *Ophelia*. 1977. Vol. 16 (2). P. 151–162.

Giere O. Meiobenthology: The microscopic motile fauna of aquatic sediments. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. 527 p.

Gladyshev M.I. Stable isotope analyses in aquatic ecology (a review) // *J. Siberian Federal Univ. Biology*. 2009. Vol. 2(4). P. 381–402.

Goedkoop W., Akerblom N., Demandt M.H. Trophic fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in *Chironomus riparius* reared on food of aquatic and terrestrial origin // *Freshwater Biol.* 2006. Vol. 51. P. 878–886.

Gorbatenko K.M., Melnikov I.V., Kiyashko S.I. et al. The population characteristics and trophic status of herring in the pelagic layer of the northern Okhotsk Sea // *Russ. J. Mar. Biol.* 2013. Vol. 39(7). P. 474–485.

Graeve M., Dauby P., Scailteur Y. Combined lipid, fatty acid and digestive tract content analyses: a penetrating approach to estimate feeding modes of Antarctic amphipods // *Polar Biol.* 2001. Vol. 24. P. 853–862.

Graeve M., Kattner G., Piepenburg D. Lipids in Arctic benthos: does the fatty acid and alcohol composition reflect feeding and trophic interactions? // *Polar Biol.* 1997. Vol. 18. P. 53–61.

Guilini K., Van Oevelen D., Soetaert K. et al. Nutritional importance of benthic bacteria for deep-sea nematodes from the Arctic ice margin: Results of an isotope tracer experiment // *Limnol. Oceanogr.* 2010. Vol. 55(5). P. 1977–1989.

Guilini K., Veit-Köhler G., De Troch M. et al. Latitudinal and temporal variability in the community structure and fatty acid composition of deep-sea nematodes in the Southern Ocean // *Prog. Oceanogr.* 2013. Vol. 110. P. 80–92.

Hemminga M.A., Mateo M.A. Stable carbon isotopes in seagrasses: variability in ratios and use in ecological studies // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1996. Vol. 140. P. 285–298.

Hobson K.A., Fisk A., Karnovsky N. et al. A stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants // *Deep-Sea Res. Part II*. 2002. Vol. 49(22-23). P. 5131-5150.

Hutzell P.A., Krusberg L.R. Fatty acid composition of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae* // *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 1982. Vol. 73. P. 517–520.

Ingels J., Billett D.S.M., Van Gaever S. et al. An insight into the feeding ecology of deep-sea canyon nematodes – results from field observations and the first in-situ ¹³C feeding experiment in the Nazaré Canyon // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2011. Vol. 396. P. 185–193.

Jackson A.L., Inger R., Bearhop S. et al. Erroneous behaviour of MixSIR, a recently published Bayesian isotope mixing model: a discussion of Moore & Semmens (2008) // *Ecol. Lett.* 2009. Vol. 12. P. E1–E5.

Jennings J.B., Colam J.B. Gut structure, digestive physiology and food storage in *Pontonema vulgare* (Nematoda: Enoplida) // *J. Zool. Lond.* 1970. Vol. 161. P. 211–221.

Jennings J.B., Deutsch A. Occurrence and possible adaptive significance of glucuronidase and arylamidase (leucine aminopeptidase) in two species of marine nematodes // *Comp. Biochem. Physiol.* 1975. Vol. 52 (A). P. 611–614.

Jensen P. Diatom-feeding behaviour of the free-living marine nematode *Chromadorita tenuis* // *Nematologica.* 1982. Vol. 28. P. 71–76.

Kanaya G., Yadrenkina E.N., Zuykova E.I. et al. Contribution of organic matter sources to cyprinid fishes in the Chany Lake – Kargat River estuary, western Siberia // *Mar. Freshwater Res.* 2009. Vol. 60. P. 510–518.

Kaneda T. Iso- and anteiso- fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance // *Microbiol. Rev.* 1991. Vol. 55. P. 288–302.

Kattner G., Hagen W. Lipids in marine copepods: latitudinal characteristics and perspective to global warming // *Lipids in Aquatic Ecosystems / Eds. Arts M.T., Brett M.T., Kainz M.J.* London: Springer,. 2009. P. 257–280.

Kelly J.R., Scheibling R.E. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2012. Vol. 446. P. 1–22.

Kennedy A.D. Predation within meiofaunal communities: Description and results of a rapid-freezing method of investigation // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1994. Vol. 114(1–2). P. 71–79.

Keough J.R., Sierszen M.E., Hagley C.A. Analysis of a Lake Superior coastal food web with stable isotope techniques // *Limnol. Oceanogr.* 1996. Vol. 41. P. 136–146.

Kharlamenko V.I. Abyssal foraminifera as the main source of rare and new polyunsaturated fatty acids in deep-sea ecosystems // *Deep-Sea Res. Part II.* 2018. Vol. 154. P. 358–364.

Kharlamenko V.I., Kiyashko S.I., Imbs A.B. et al. Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using

carbon and sulfur stable isotope ratio and fatty acid analyses // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2001. Vol. 220. P. 103–117.

Kharlamenko V.I., Svetashev V.I., Tarasova T.S. New and uncommon fatty acids in lipids of deep-sea foraminifera // Lipids. 2017. Vol. 52. P. 345–352.

Khotimchenko S.V. Uncommon 16:1(n-5) acid from *Dictyota dichotoma* and fatty acids of some brown algae of Dictyotaceae // Phytochemistry. 1995. Vol. 38. P. 1411–1415.

Kim D., Shirayama Y. Use of colloidal iron as a tracer to measure the ingestion rates of free-living marine nematodes // J. Oceanogr. 2010. Vol. 66. P. 299–305.

Kiyashko S.I., Fadeeva N.P., Fadeev V.I. Petroleum hydrocarbons as a source of organic carbon for the benthic macrofauna of polluted marine habitats as assayed by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio analysis // Dokl. Biol. Sci. 2001. Vol. 381(2). P. 535–537.

Kiyashko S.I., Kharlamenko V.I., Sanamyan K. et al. Trophic structure of the abyssal benthic community in the Sea of Japan inferred from stable isotope and fatty acid analyses // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2014. Vol. 500. P. 121–137.

Langel R., Dyckmans J. Combined ^{13}C and ^{15}N isotope analysis on small samples using a near-conventional elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer setup // Rapid Commun. Mass Spectr. 2014. Vol. 28. P. 1019–1022.

Larkin K.E., Gooday A.J., Woulds C. et al. Uptake of algal carbon and the likely synthesis of an "essential" fatty acid by *Uvigerina* ex. gr. *semiornata* (Foraminifera) within the Pakistan margin oxygen minimum zone: evidence from fatty acid biomarker and ^{13}C tracer experiments // Biogeosciences. 2014. Vol. 11. P. 3729–3738.

Larsen T., Taylor D.L., Leigh M.B. et al. Stable isotope fingerprinting: a novel method for identifying plant, fungal, or bacterial origins of amino acids // Ecology. 2009. Vol. 90. P. 3526–3535.

Leduc D. Description of *Oncholaimus moanae* sp. nov. (Nematoda: Oncholaimidae), with notes on feeding ecology based on isotopic and fatty acid composition // J. Mar. Biol. Assoc. UK. 2009. Vol. 89(2). P. 337–344.

Leduc D., Brown J.C.S., Bury S.J. et al. High intraspecific variability in the diet of a deep-sea nematode: Stable isotope and fatty acid analyses of *Deontostoma tridentum* on Chatham Rise, Southwest Pacific // Deep-Sea Res. Part I. 2015. Vol. 97. P. 10–18.

Leduc D., Probert P.K. The effect of bacterivorous nematodes on detritus incorporation by macrofaunal detritivores: A study using stable isotope and fatty acid analyses // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2009. Vol. 371. P. 130–139.

Leduc D., Probert P.K., Duncan A. A multi-method approach for identifying meiofaunal trophic connections // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2009. Vol. 383. P. 95–111.

Legeżyńska J., Kędra M., Walkusz W. Identifying trophic relationships within the high Arctic benthic community: How much can fatty acids tell? // *Mar. Biol.* 2014. Vol. 161. P. 821–836.

Levin L.A. Ecology of cold seep sediments: interactions of fauna with flow, chemistry and microbes // *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 2005. Vol. 43. P. 1–46.

Levin L.A., Michener R.H. Isotopic evidence for chemosynthesis-based nutrition of macrobenthos: The lightness of being at Pacific methane seeps // *Limnol. Oceanogr.* 2002. Vol. 47(5). P. 1336–1345.

Limén H., Levesque C., Kim J.S. POM in macro-/meiofaunal food webs associated with three flow regimes at deep-sea hydrothermal vents on Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge // *Mar. Biol.* 2007. Vol. 153(2). P. 129–139.

Logan J.M., Jardine T.D., Miller T.J. et al. Lipid corrections in carbon and nitrogen stable isotope analyses: comparison of chemical extraction and modeling methods // *J. Anim. Ecol.* 2008. Vol. 77. P. 838–46.

Logan J.M., Lutcavage M.E. A comparison of carbon and nitrogen stable isotope ratios of fish tissues following lipid extractions with non-polar and traditional chloroform/methanol solvent systems // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008. Vol. 22. P. 1081–86.

Maraun M., Erdmann G., Fischer B.M. et al. Stable isotopes revisited: their use and limits for oribatid mite trophic ecology // *Soil Biol. Biochem.* 2011. Vol. 43. P. 877–882.

Maria T.F., Vanaverbeke J., Esteves A.M. et al. The importance of biological interactions for the vertical distribution of nematodes in a temperate ultra-dissipative sandy beach // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2012. Vol. 97. P. 114–126.

Martinez del Rio C., Wolf N., Carleton S.A. et al. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments // *Biol. Rev.* 2009. V. 84. P. 91–111.

Mateo M.A., Serrano O., Serrano L. et al. Effects of sample preparation on stable isotope ratios of carbon and nitrogen in marine invertebrates: implications for food web studies using stable isotopes // *Oecologia.* 2008. Vol. 157. P. 105–115.

McMillan S., Parker P.L., Fry B. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in seagrasses // *Aquat. Bot.* 1980. Vol. 9(3). P. 237–249.

Meyers S.P., Hopper B.E. Attraction of the marine nematode, *Metoncholaimus* sp., to fungal substrates // *Bull. Mar. Sci.* 1966. Vol. 16 (1). P. 142–150.

Middelburg J.J. Stable isotopes dissect aquatic food webs from the top to the bottom // *Biogeosciences*. 2014. Vol. 11. P. 2357–2371.

Minagava M., Wada E. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1984. Vol. 48(5). P. 1135–1140.

Moens T., Vincx M. Observations on the feeding ecology of estuarine nematodes // *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 1997. Vol. 77. P. 211–227.

Moens T., Luyten C., Middelburg J.J. et al. Tracing organic matter sources of estuarine tidal flat nematodes with stable carbon isotopes // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2002. Vol. 234. P. 127–137.

Moens T., Bouillon S., Gallucci F. Dual stable isotope abundances unravel trophic position of estuarine nematodes // *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 2005. Vol. 85(6). P. 1401–1407.

Moens T., Vafeiadou A.-M., De Geyter E. et al. Diatom feeding across trophic guilds in tidal flat nematodes, and the importance of diatom cell size // *J. Sea Res.* 2014. Vol. 92. P. 125–133.

Montagna P.A. In situ measurement of meiobenthic grazing rates on sediment bacteria and edaphic diatoms // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1984. Vol. 18. P. 119–130.

Moore J.W., Semmens B.X. Incorporating uncertainty and prior information into stable isotope mixing models // *Ecol. Lett.* 2008. Vol. 11. P. 470–480.

Mordukhovich V., Kiyashko S., Kharlamenko V. et al. Determination of food sources for nematodes in the Kurile Basin and eastern slope of the Kuril Islands by stable isotopes and fatty acid analyses // *Deep-Sea Res. Part II.* 2018. Vol. 154. P. 365–373.

Moreno R., Jover L., Munilla I. et al. A three-isotope approach to disentangling the diet of a generalist consumer: the yellow-legged gull in northwest Spain // *Mar. Biol.* 2010. Vol. 157. P. 545–553.

Musat N., Giere O., Gieseke A. et al. Molecular and morphological characterization of the association between bacterial endosymbionts and the marine

nematode *Astomonema* sp. from the Bahamas // *Environ. Microbiol.* 2007. Vol. 9. P. 1345–1353.

Mutchler T., Sullivan M.J., Fry B. Potential of ^{14}N isotope enrichment to resolve ambiguities in coastal trophic relationships // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2004. Vol. 266. P. 27–33.

Nelson M.M., Mooney B., Nichols J.D. et al. Lipids of Antarctic Ocean amphipods: food chain interactions and the occurrence of novel biomarkers // *Mar. Chem.* 2001. Vol. 73. P. 53–64.

Nyssen F., Brey T., Dauby P. et al. Trophic position of Antarctic amphipods-enhanced analysis by a 2-dimensional biomarker assay // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2005. Vol. 300. P. 135–145.

O'Reilly C.M., Hecky R.E., Cohen A.S. et al. Interpreting stable isotopes in food webs: Recognizing the role of time averaging at different trophic levels // *Limnol. Oceanogr.* 2002. Vol. 47. P. 306–309.

Ogle K., Wolpert R.L., Reynolds J.F. Reconstructing plant root area and water uptake profiles // *Ecology.* 2004. Vol. 85. P. 1967–1978.

Olafsson E., Modig H., van de Bund W.J. Species specific uptake of radio-labelled phytodetritus by benthic meiofauna from the Baltic Sea // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1999. Vol. 177. P. 63–72.

Pape E., Bezerra T.N., Vanneste H. et al. Community structure and feeding preference of nematodes associated with methane seepage at the Darwin mud volcano (Gulf of Cádiz) // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2011. Vol. 438. P. 71–83.

Park R., Epstein S. Carbon isotope fractionation during photosynthesis // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1960. Vol. 27. P. 110–126.

Parnell A.C., Inger R., Bearhop S. et al. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation // *PLoS One.* 2010. Vol. 5. P. e9672.

Perkins E.S. The food relationships of the microbenthos with particular reference to the found at Whitstable Kent // *Ann. Mag. Nat. Hist.* 1958. Vol. 13(1). P. 64–77.

Perry G.J., Volkman J.K., Johns R.B. et al. Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1979. Vol. 43. P. 1715–1725.

Perry R.N., Wright D.J. The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. CABI International, Wallingford, Oxon (CABI), 1998. 438 p.

Persaud A.D., Dillon P.J., Lasenby D. et al. Stable isotope variability of mesozooplankton along a gradient of dissolved organic carbon // *Freshwater Biol.* 2009. Vol. 54. P. 1705–1719.

Peterson B.J. Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: a review // *Acta Oecol.* 1999. Vol. 20(4). P. 479–487.

Peterson B.J., Fry B. Stable isotopes in ecosystem studies // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1987. Vol. 18. P. 293–320.

Phillips D.L. Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique // *Oecologia.* 2001. Vol. 127. P. 166–70.

Phillips D.L., Gregg J.W. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources // *Oecologia.* 2003. Vol. 136. P. 261–269.

Piola R.F., Suthers I.M., Rissik D. Carbon and nitrogen stable isotope analysis indicates freshwater shrimp *Paratya australiensis* Kemp, 1917 (Atyidae) assimilate cyanobacterial accumulations // *Hydrobiologia.* 2008. Vol. 608. P. 121–132.

Ponsard S., Amlou M. Effects of several preservation methods on the isotopic content of *Drosophila* samples // *Anim. Biol.* 1999. Vol. 322. P. 35–41.

Post D.M. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions // *Ecology.* 2002. Vol. 83. P. 703–718.

Post D.M., Layman C.A., Arrington D.A. et al. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses // *Oecologia.* 2007. Vol. 152. P. 179–189.

Ramirez F., Jover L., Sanpera C. et al. Combined measurements of egg fatty acids and stable isotopes as indicators of feeding ecology in lake-dwelling birds // *Freshwater Biol.* 2009. Vol. 54. P. 1832–1842.

Ramirez-Llodra E., Brandt A., Danovaro R. et al. Deep, diverse and definitely different: unique attributes of the world's largest ecosystem // *Biogeosciences.* 2010. Vol. 7. P. 2851–2899.

Reuss N., Poulsen L.K. Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland // *Mar. Biol.* 2002. Vol. 141. P. 423–434.

Rex M.A., Etter R.J., Morris J.S. et al. Global bathymetric patterns of standing stock and body size in the deep-sea benthos // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2006. Vol. 317. P. 1–8.

Riemann F., Helmke E. Symbiotic relations of sediment agglutinating nematodes and bacteria in detrital habitats: the enzyme-sharing concept. PSZN I // Mar. Ecol. 2002. Vol. 23. P. 93–113.

Rothstein M., Gotz P. Biosynthesis of fatty acids in the free-living nematode *Turbatrix aceti* // Arch. Biochem. Biophys. 1968. Vol. 126 (1). P. 131–140.

Ruiz-Cooley R.I., Garcia K.Y., Hetherington E.D. Effects of lipid removal and preservatives on carbon and nitrogen stable isotope ratios of squid tissues: Implications for ecological studies // J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 2011. Vol. 407(1). P. 101–107.

Sargent J.R., Falk-Pettersen S. The lipid biochemistry of calanoid copepods // Hydrobiologia. 1988. Vol. 167. P. 101–114.

Sargent J.R., Parkes R.J., Mueller-Harvey I. et al. Lipid biomarkers in marine ecology // Microbes in the Sea. Chichester: Ellis Horwood., 1987. P. 119–138.

Schmidt O., Scrimgeour C.M., Curry J.P. Carbon and nitrogen stable isotope ratios in body tissue and mucus of feeding and fasting earthworms (*Lumbricus festivus*) // Oecologia. 1999. Vol. 118. P. 9–15.

Schratzberger M., Ingels J. Meiofauna matters: the roles of meiofauna in benthic ecosystems // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2018. Vol. 50. P. 12–25.

Schwinghamer P., Tan F.C., Gordon Jr.D.C. Stable carbon isotope studies on the Peck Cove mudflat ecosystem in the Cumberland Basin, Bay of Fundy // Can. J. Fish and Aquat. Scn. 1983. Vol. 40. P. 262–272.

Scott K.M., Schwedock J., Schrag D.P. et al. Influence of form IA RubisCO and environmental dissolved inorganic carbon on the $d^{13}C$ of the clam-chemoautotroph symbiosis *Solemya velum* // Environ. Microbiol. 2004. Vol. 6(12). P. 1210–1219.

Semmens B.X., Ward E.J., Moore J.W. et al. Quantifying inter- and intra-population niche variability using hierarchical bayesian stable isotope mixing models // PLoS One. 2009. Vol. 4: e6187.

Smith B.N., Epstein S. Two categories of $^{13}C/^{12}C$ ratios for higher plants // Plant Phisiol. 1971. Vol. 47(3). P. 380–384.

Søreide J.E., Falk-Petersen S., Hegseth E.N. et al. Seasonal feeding strategies of *Calanus* in the high-Arctic Svalbard region // Deep-Sea Res. Part II. 2008. Vol. 55. P. 2225–2244.

Sotiropoulos M.A., Tonn W.M., Wassenaar L.I. Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies // Ecol. Freshw. Fish, 2004. Vol. 13. P. 155–60.

Sticht C., Schrader S., Gieseemann A. Influence of chemical agents commonly used for soil fauna investigations on the stable C-isotopic signature of soil animals // *Eur. J. Soil Biol.*, 2006. Vol. 42. P. 326–330.

Stock B.C., Jackson A.L., Ward E.J. et al. Analyzing mixing systems using a new generation of Bayesian tracer mixing models // *Peer J.* 2018. Vol. 6: e5096.

Stratmann T., Mevenkamp L., Sweetman A.K. et al. Has phytodetritus processing by an abyssal soft-sediment community recovered 26 years after an experimental disturbance? // *Front. Mar. Sci.* 2018. Vol. 5: 59.

Tchesunov A.V. Free-living nematode species (Nematoda) dwelling in hydrothermal sites of the North Mid-Atlantic Ridge // *Helgol. Mar. Res.* 2015. Vol. 69. P. 343–384.

Vafeiadou A.M., Materatski P., Adão H. et al. Resource utilization and trophic position of nematodes and harpacticoid copepods in and adjacent to *Zostera noltii* beds // *Biogeosciences.* 2014. Vol. 11(14). P. 4001–4014.

Vafeiadou A.M., Adão H., De Troch M. et al. Sample acidification effects on carbon and nitrogen stable isotope ratios of macrofauna from a *Zostera noltii* bed // *Mar. Freshw. Res.* 2013. Vol. 64(8). P. 741–745.

Van Campenhout J., Vanreusel A. Closely related intertidal and deep-sea *Halomonhystera* species have distinct fatty acid compositions // *Helgol. Mar. Res.* 2016. Vol. 70: 8.

Van den Meersche K., Van Rijswijk P., Soetaert K. et al. Autochthonous and allochthonous contributions to mesozooplankton diet in a tidal river and estuary: Integrating carbon isotope and fatty acid constraints // *Limnol. Oceanogr.* 2009. Vol. 54. P. 62–74.

Van Gaever S., Moodley L., Pasotti F. et al. Trophic specialisation of metazoan meiofauna at the Håkon Mosby mud volcano: Fatty acid biomarker isotope evidence // *Mar. Biol.* 2009. Vol. 156. P. 1289–1296.

Van Oevelen D., Soetaert K., Franco M. et al. Organic matter input and processing in two contrasting North Sea sediments: Insights from stable isotope and biomass data // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2009. Vol. 380. P. 19–32.

Vander Zanden M.J., Rasmussen J.B. Variation in $d^{15}\text{N}$ and $d^{13}\text{C}$ trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies // *Limnol. Oceanogr.* 2001. Vol. 46(8). P. 2061–2066.

Vanderklift M.A., Ponsard S. Sources of variation in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis // *Oecologia.* 2003. Vol. 136. P. 169–182.

Ventura M., Catalan J. Incorporating life histories and diet quality in stable isotope interpretations of crustacean zooplankton // *Freshwater Biol.* 2008. Vol. 53. P. 1453–1469.

Ventura M., Jeppesen E. Effects of fixation on freshwater invertebrate carbon and nitrogen isotope composition and its arithmetic correction // *Hydrobiologia.* 2009. Vol. 632. P. 297–308.

Wada E. Stable $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ isotope ratios in aquatic ecosystems // *Proc. Jap. Acad. Ser. B.* 2009. Vol. 85. P. 98–107.

Wada E., Kabaya Y., Kurihara Y. Stable isotopic structure of aquatic ecosystems // *J. Biosci.* 1993. Vol. 18. P. 483–499.

Wada E., Terazaki M., Kabaya Y. et al. ^{15}N and ^{13}C abundances in the Antarctic Ocean with emphasis on the biogeochemical structure of the food web // *Deep-Sea Res. Part I.* 1987. Vol. 34. P. 829–841.

Wang J.N., Li J.T., Dasgupta S. et al. Alterations in membrane phospholipid fatty acids of gram-positive piezotolerant bacterium *Sporosarcina* sp. DSK25 in response to growth pressure // *Lipids.* 2014. Vol. 49. P. 347–356.

West J.B., Bowen G.J., Cerling T.E. et al. Stable isotopes as one of nature's ecological recorders // *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 21 (7). P. 408–414.

Whalen M. The global methane cycle // *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 1993. Vol. 21. P. 407–426.

Whiticar M.J. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // *Chem. Geol.* 1999. Vol. 161(1–3). P. 291–314.

Wieser W. Die Beziehung zwischen Mundhöhlengestalt, Ernährungsweise und Vorkommen bei freilebenden marinen Nematoden // *Eine Sk.-Morphol. Stud. Ark. Zool.* 1953. Vol. 4. P. 439–484.

Woodward G., Blanchard J., Lauridsen R.B. et al. Individual-based food webs: species identity, body size and sampling effects // *Adv. Ecol. Res.* 2010. Vol. 43. P. 211–266.

Wu X., Bezerra T.C., Van Gansbeke D. et al. Natural stable isotope ratios and fatty acid profiles of estuarine tidal flat nematodes reveal very limited niche overlap among co-occurring species // *PeerJ.* 2019. Vol. 7:e7864

Yano Y., Nakayama A., Yoshida K. Distribution of polyunsaturated fatty acids in bacteria present in intestines of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63. P. 2572–2577.

Zhao J.X., Liu Q.O., Zhou Y.X. et al. *Alkalimarinus sediminis* gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. Vol. 65. P. 3511–3516.

**РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ
РАВНОНОГИХ РАКООБРАЗНЫХ
(CRUSTACEA: ISOPODA) В ГЛУБОКОВОДНЫХ
РАЙОНАХ СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ПАЦИФИКИ
ПО ДАННЫМ ЭКСПЕДИЦИЙ SOJABIO,
KURAMBIO, SOKHOBIO И KURAMBIO II**

М.В. Малютина, О.А. Головань

*Национальный научный центр морской биологии
им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской
академии наук, ул. Пальчевского 17, Владивосток 690041
E-mails: m_malyutina@mail.ru; golovan_olga@mail.ru*

**DIVERSITY AND DISTRIBUTION OF ISOPODS
(CRUSTACEA: ISOPODA) IN THE DEEP-SEA AREAS
OF THE NORTHWESTERN PACIFIC ACCORDING
TO DATA OF THE EXPEDITIONS SOJABIO,
KURAMBIO, SOKHOBIO AND KURAMBIO II**

M.V. Malyutina, O.A. Golovan

*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology,
Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Palchevskogo Str, 17, Vladivostok, 690041
E-mails: m_malyutina@mail.ru; golovan_olga@mail.ru*

Глубоководный бентос нескольких сопредельных районов северо-западной Пацифики (котловин Японского и Охотского морей, пролива Буссоль, Курило-Камчатского желоба и прилегающей океанической абиссали, глубины от 455 до 9584 м) исследовался в ходе четырех совместных российско-немецких экспедиций: SoJaBio (2010), KuramBio (2012), SokhoBio (2015) и KuramBio II (2016). Во всех исследованных районах од-

ним из доминирующих таксонов макробентоса оказались высшие ракообразные надотряда Peracarida, среди которых преобладал отряд Isopoda (40–60% экз. всех перакарид, >330 видов из 75 родов и 21 семейства). Изоподы на 98% были представлены первично-глубоководными семействами подотряда Asellota, с преобладанием Munnopsidae (~50% экз. изопод) и Desmosomatidae (~30% экз.). Самая богатая фауна обнаружена в открытой

океанической абиссали, прилегающей к Курило-Камчатскому желобу (ККЖ): 255 морфовидов из 69 родов и 17 семейств (в том числе 100 видов из 28 родов Munnopsidae и 65 видов из 11 родов Desmosomatidae). В ультраабиссали желоба видовое богатство оказалось значительно меньше, чем в абиссали: 41 вид из 15 родов муннопсид и 5 видов из 2 родов десмосоматид. Разнообразие резко уменьшалось с глубиной: из названного числа видов глубже 8000 м обнаружены лишь 24 вида муннопсид и 1 вид десмосоматид. Фауна абиссали Курильской котловины Охотского моря, связанной с Тихим океаном (ТО) глубокоководными проливами, выглядит как обедненная тихоокеанская абиссальная фауна (39 видов муннопсид и 17 видов десмосоматид, в том числе 27 видов муннопсид и 10 видов десмосоматид – общие с ТО). Фауна изолированной котловины Японского моря оказалась самой бедной по сравнению с остальными исследованными районами: 22 вида изопод зарегистрировано на глубинах 455–3666 м (в том числе 11 видов десмосоматид и 4 вида муннопсид), с единственным, но массовым видом в абиссали котловины – *Eurycope spinifrons* Gurjanova, 1936 (Munnopsidae). Распределение изопод в районах исследования определяется комплексом факторов, важнейшими из которых являются доступность пищевых ресурсов, обеспеченность кислородом и скорость придонных течений. Результаты наших исследо-

ваний существенно расширили известные данные по хорологии изопод СЗ Пацифики. Находки семейства Dendrotionidae, подсемейства Lipomerinae (Munnopsidae) с 5 родами, 9 родов муннопсид, а также 5 родов Desmosomatidae стали первыми их находками в северной Пацифике, а находки семейства Desmosomatidae и инфраотряда Epicaridea в ультраабиссали ККЖ – самыми глубокоководными в мире. Более 85% видов изопод оказались новыми для науки. Были описаны 11 новых для науки видов из семейств Munnopsidae, Desmosomatidae, Dendrotionidae, новый род из семейства Paramunnidae (подотряд Asellota), а также новый вид из семейства Arcuridae (подотряд Valvifera).

The deep-sea benthos of several adjacent areas of the northwest Pacific (basins of the Sea of Japan and the Sea of Okhotsk, the Bussol Strait, the Kuril-Kamchatka Trench and the adjacent oceanic abyssal, from 455 m to 9584 m depths) was studied during four joint Russian-German expeditions: SoJaBio (2010), KuramBio (2012), SokhoBio (2015) and KuramBio II (2016). In all the studied areas, the crustacean super-order Peracarida was one of the dominant macrobenthic taxa, among which the order Isopoda predominated (40–60% of all peracarids, > 330 species from 75 genera, 21 families, and 4 suborders). Almost all isopods (98%) were represented by the primary deep-water families of the suborder Asellota, with

the predominance of Munnopsidae (~50% of isopods ind.) and Desmosomatidae (~ 30%). The richest fauna was found in the open oceanic abyssal adjacent to the Kuril-Kamchatka Trench (KKT): 255 morphospecies from 69 genera and 17 families (including 100 species from 28 genera of Munnopsidae and 65 species from 11 genera of Desmosomatidae). In the ultra-abyssal of the KKT, the species richness turned out to be significantly less than in the abyssal: 41 species from 15 genera of munnopsids and 5 species from 2 genera of desmosomatids. Diversity sharply decreased with depth: deeper than 8000 m, only 24 species of munnopsids and 1 species of desmosomatids were found. The abyssal fauna of the Kuril Basin of the Sea of Okhotsk, connected with the Pacific Ocean (PO) by deep straits, looks like a reduced Pacific abyssal fauna (39 species of munnopsids and 17 species of desmosomatids, including 27 species of munnopsids and 10 species of desmosomatids in common with the PO). The fauna of the isolated basin of the Sea of Japan turned out to be the poorest compared to the rest of the studied areas: 22 species of isopods were

recorded at depths of 455–3666 m (including 11 species of desmosomatids and 4 species of munnopsids), with the only but abundant species in the abyssal basin – *Eurycope spinifrons* Gurjanova, 1936 (Munnopsidae). The distribution of isopods in the studied areas is determined by a complex of factors, the most important of which are the availability of food resources, oxygen supply and the velocity of bottom currents. The results of our research have significantly expanded the known data on the chorology of isopods of the northwest Pacific. The finds of the Dendrotionidae family, the Lipomerinae subfamily (Munnopsidae) with 5 genera, the 9 Munnopsidae genera of 4 subfamilies, and the 5 Desmosomatidae genera were their first finds in the North Pacific, and the finds of the Desmosomatidae and Epicaridea infraorder were the deepest world records. Over 85% of isopod species were new to science. Eleven new species from the families Munnopsidae, Desmosomatidae, Dendrotionidae, a new genus from the family Paramunnidae (suborder Asellota), and also a new species from the family Arcturidae (suborder Valvifera) were described.

Введение

Абиссаль Мирового океана (МО), на долю которой приходится более 70% площади его дна, занята самым протяженным биотопом на Земле, но одновременно и наименее изученным: до сих пор только 5% площади абиссального дна было охвачено исследованиями (Ramirez-Llodra *et al.*, 2010). Благодаря современным экспедициям в различные районы МО установлено, что жизнь на больших глубинах характеризуется чрезвычай-

ным богатством и разнообразием, выявлена высокая степень локального эндемизма глубоководной фауны. Оказалось, что она распределена очень неравномерно в разных бассейнах МО (Ramirez-Llodra *et al.*, 2010; Connolly *et al.*, 2014). Вопросы, касающиеся эволюции и функционирования глубоководных сообществ, связи между глубоководными и мелководными экосистемами, биогеографии, биологии, экологии и эволюции глубоководных видов изучены еще очень слабо. В этом отношении одним из самых интересных регионов МО является северо-западная (СЗ) Пацифика.

СЗ Пацифика – это обширный, высокопродуктивный регион МО со сложной системой связанных между собой глубоководных бассейнов, которые различаются по глубине, гидрологии, геологической истории и степени изоляции от океанической абиссали. Регион включает в себя часть огромной СЗ котловины Тихого океана (ТО) с глубинами ~ 5000–6000 м, ограниченной с северо-запада Курило-Камчатским желобом (ККЖ) (Зенкевич, 1963). ККЖ является одним из самых глубоких желобов МО с максимальной глубиной ~ 9600 м, который тянется вдоль Курильских островов и восточного побережья Камчатки и является частью гигантской цепи разломов – Тихоокеанского огненного кольца (см.: Golovan *et al.*, 2019; Jennings *et al.*, 2019). ККЖ, с одной стороны, затрудняет расселение абиссальной фауны, так как наличие барьеров (подводных возвышенностей, желобов) на пути расселения глубоководных животных ограничивает поток генов и способствует разделению видов. С другой стороны, будучи звеном в цепи глубоководных разломов, опоясывающих ТО с запада и севера, желоб может потенциально служить трактом для распространения ультраабиссальных таксонов (см.: Golovan *et al.*, 2019; Jennings *et al.*, 2019). К западу от ККЖ и сопряженных островных дуг расположены две глубоководные котловины окраинных морей СЗ Пацифики (Охотского и Японского). Оба моря связаны проливами с ТО, но по-разному изолированы от его абиссали (Зенкевич, 1963). Котловина Японского моря (~3600 м) наиболее изолирована от ТО из-за мелководности проливов (до 73 м). В период между верхним плейстоценом (85–27 тыс. лет назад) и нижним голоценом (10–8 тыс. лет назад) в котловине моря глубже 400 м существовали бескислородные условия, что повлекло вымирание населявших ее видов (Oba *et al.*, 1991; Amano, 2004). После восстановления связи с ТО и возвращения кислорода в глубины моря в нижнем голоцене вымершая фауна была заменена мелководной фауной, происходящей из видов север-

ной части Тихого океана, путем адаптации к среде с низкими температурами и высоким давлением (Oba *et al.*, 1991; Tyler, 2002). Реколонизация тихоокеанской глубоководной фауны была невозможна из-за мелководных проливов. Таким образом, глубоководная котловина Японского моря находится на ранней стадии сукцессии (см.: Elsner *et al.*, 2013; Golovan *et al.*, 2013). В настоящее время на глубинах > 500 м котловина заполнена однородной водной массой, образованной из погруженной поверхностной воды в результате зимнего охлаждения и обогащенной кислородом (Дерюгин, 1939; Леонов, 1960; Лучин, Манько, 2003). Курильская котловина Охотского моря (~3300 м) связана с ТО проливами, имеющими батимальные глубины (~2300 м). Глубже 1350 м она занята глубинной ТО водой с горизонта ~2300 м, в соответствии с максимальной глубиной Курильских проливов (Морошкин, 1966). На глубине ~1000 м в Охотском море залегает бедный кислородом слой воды (10% насыщения) (Ушаков, 1953), который создает барьер для расселения тихоокеанской фауны. Благодаря такой сложной топографии и гидрологии исследованный регион СЗ Пацифики можно рассматривать как крупномасштабную модель для изучения биогеографии, распределения и путей расселения глубоководной фауны.

Интенсивные исследования донной фауны СЗ Пацифики в районе ККЖ проводились с середины прошлого века (1949–1966 гг.) российским НИС «Витязь» (Зенкевич и др., 1955; Беляев, 1989). В результате этих экспедиций район ККЖ оказался одним из наиболее изученных на тот момент глубоководных районов МО. Фауна, собранная в ходе шести экспедиций в 1949, 1953–1956, 1957–1958 и 1966 гг. на глубинах от верхней батии до ультраабиссали (9346 м), была описана во многих публикациях (например, в трудах Института океанологии им. П.П. Ширшова (1955, 1970, 1971) (Беляев, 1989). Высшие ракообразные надотряда Peracarida оказались одним из самых разнообразных и наиболее изученных таксонов из этих сборов. Особенно это касается отряда Isopoda: к концу прошлого века 118 глубоководных видов изопод, описанных из СЗ Пацифики, составляли ~80% от всех известных глубоководных изопод МО. Треть всех описанных из СЗ Пацифики глубоководных видов изопод (39 видов) принадлежали семейству Munnopsidae (Гурьянова, 1936; Бирштейн, 1957, 1963, 1970, 1971; Кусакин, 1999, 2003). По данным экспедиций на НИС «Витязь», а также других российских экспедиций прошлого века в СЗ Пацифике, в этом регионе было известно 11 видов десмосоматид, собранных

на глубинах от 15 до 6710 м, в том числе 8 видов – с шельфа и верхней батииали Охотского и Японского морей, и 3 вида – из абиссали и ультраабиссали ТО в районе ККЖ (Бирштейн, 1963, 1970; Кусакин, 1965, 1999; Головань, 2007; Головань, Малютина, 2010).

Несмотря на проведенные в прошлом веке исследования, картина богатства и разнообразия абиссальной и ультраабиссальной донной фауны региона, особенно ее мелкоразмерных фракций, оставалась неполной. Известно, что основным населением больших глубин является макробентос – мелкие организмы размером от 0,1 до 1 см. Оценить состав и особенности распределения этого населения сложно, поскольку для сбора мелких подвижных животных, живущих на поверхности и во взвеси донных осадков, традиционные крупноячеистые донные тралы и дночерпатели для инфауны не эффективны. Несмотря на большое количество тралений (28), выполненных во время шести экспедиций НИС «Витязь» в районе ККЖ, тралы Сигсби–Горбунова, использовавшиеся в то время (Беляев, 1989), и прежние методы позволяли отлавливать в основном крупных животных мегафауны, в то время как мелкие виды чаще всего вымывались при отлове или затем при выходах тралов на палубу сквозь километровые толщи воды. Так, среди изопод только 10 относительно крупных видов Munnopsidae (>1 см) были ранее описаны из ультраабиссальных глубин ККЖ: пять видов *Rectisura* Malyutina, 2003, два вида *Vanhoeffenura* Malyutina, 2003 и по одному виду в каждом из трех родов *Eurycope* Sars, 1864, *Betamorpha* Hessler & Tistle, 1975 и *Munnicope* Menzies & George, 1972, кроме того, были известны 9 видов Naploniscidae, 9 видов Ischnomesidae, 6 видов Macrostylidae, по одному виду Desmosomatidae и Nannoniscidae (см.: Бирштейн, 1957, 1963, 1970, 1971; Кусакин, 1999, 2003). Все глубоководные виды десмосоматид (*Mirabilicoxa coxalis* (Birstein, 1963), *M. tenuipes* (Birstein, 1970) и *Pseudomesus similis* Birstein, 1963) были собраны в ходе экспедиций НИС «Витязь» в ККЖ или к востоку от КК и Японского желобов и представлены 1–2 экземплярами каждый (Бирштейн, 1963, 1970, 1971). Как предполагали сами исследователи (см.: Бирштейн, 1963; Беляев, 1989), недооценка разнообразия была обусловлена отсутствием специализированных орудий для сбора макробентоса.

С начала текущего века в ряде глубоководных экспедиций, работавших в различных районах МО в рамках международного проекта CeDAMar (Census of the Diversity of Abyssal Marine Life), для сбора макробентоса начали применять стандартизированные методики с использова-

нием модифицированной модели салазочного трала – эпибентосного слэджа (EBS) (Brenke, 2005). Благодаря применению EBS были получены богатые пробы эпибентосной макрофауны, что позволило выявить более высокий уровень биоразнообразия, заметно превосходящий первоначальные оценки. Было показано, что значительную роль в донных сообществах, особенно в эпи- и супрабентали играют высшие ракообразные надотряда Peracarida, представляя вместе с классами многощетинковых червей Polychaeta и двустворчатых моллюсков Bivalvia основную долю глубоководного макробентоса (Brandt *et al.*, 2005, 2013, 2015a, 2018; Brandt, Berge, 2007). Среди перакарид в большинстве исследованных глубоководных районах МО преобладал отряд Isopoda, а среди изопод – первично-глубоководные семейства подотряда Asellota, в частности доминирующие семейства Munnopsidae и Desmosomatidae (Кусакин, 1999, 2003; Malyutina, Brandt, 2007, 2013; Golovan *et al.*, 2013; Brandt, Malyutina, 2015; Golovan, 2015b).

Начиная с 2010 г. глубоководные районы СЗ Пацифики исследовались в ходе четырех совместных российско-немецких комплексных экспедиций. Впервые в СЗ Пацифике был применен стандартный набор современных орудий лова для всех размерных групп бентоса, в том числе эпибентосный слэдж (оснащенная фото- и видеокамерами модификация С-EBS), специально сконструированный для сбора эпи- и супрабентосной макрофауны, главным образом активных ракообразных (Brandt *et al.*, 2013, 2015a, 2018). Благодаря эффективности таких сборов количество известных в этих районах видов глубоководного макробентоса было увеличено в несколько раз (Malyutina, Brandt, 2013; Brandt, Malyutina, 2015; Malyutina *et al.*, 2018a). Результаты этих экспедиций позволили дать более достоверную оценку состава глубоководной фауны СЗ Пацифики, где общее количество собранных видов живых организмов оказалось около 4500, что почти в 8 раз превысило число известных до этого. Было выяснено, что во всех изученных районах доминирующей группой макробентоса, как по численности, так и по видовому богатству, являются Peracarida, а среди них Isopoda. И несмотря на то что изоподы были одной из наиболее изученных групп бентоса в сборах НИС Витязь (Бирштейн 1957, 1963, 1970, 1971), полученные нами результаты показали, что богатство фауны и разнообразие изопод были значительно недоучтенными (Golovan *et al.*, 2013; Malyutina *et al.*, 2013; Malyutina, 2015; Malyutina, Brandt, 2015, 2018; Golovan, 2015a, 2018; Golovan *et al.*, 2018b, 2019; Golovan, Malyutina,

2019). Каждое из исследований значительно увеличивало число видов изопод, что позволило скорректировать данные о составе и биогеографии основных семейств в СЗ Пацифике. Впервые было изучено распределение глубоководной фауны равноногих ракообразных СЗ Пацифики в зависимости от условий среды обитания.

1. Материал и методы

Материалами для проведенных исследований послужили бентосные сборы четырех совместных российско-немецких экспедиций по изучению биоразнообразия глубоководной фауны СЗ Пацифики (рис. 1). Экспедиции проводились поочередно на российском и немецких судах. На борту российского НИС «Академик М.А. Лаврентьев» были проведены сборы глубоководного бентоса в полужакрытых абиссальных котловинах дальневосточных морей, Японского и Охотского. Во время экспедиции SoJaBio (Sea of Japan Biodiversity Studies) в 2010 г. в глубоководной котловине северо-западной части Японского моря сбор бентоса был выполнен на 19 станциях четырех трансект на глубинах 455–3666 м (Brandt *et al.*, 2013; Malyutina, Brandt, 2013). Экспедицией SokhoBio (Sea of Okhotsk Biodiversity Studies) в 2015 г. был исследован бентос в Курильской котловине Охотского моря, прол. Буссоль и на западном склоне ККЖ у выхода из пролива. Макробентос был собран на 21 станции С-EBS на 11 рабочих сайтах² на глубинах 1696–4798 м (Brandt *et al.*, 2018; Malyutina *et al.*, 2018a).

Две экспедиции на немецких НИС «Зонне» (RV Sonne), старом (2012) и новом (2016), были проведены в районе ККЖ. Экспедиция KuramBio (Kuril-Kamchatka Biodiversity Studies) в 2012 г. проводила исследования на абиссальной равнине СЗ котловины ТО в районе, прилегающем к ККЖ. Во время экспедиции сбор макробентоса осуществлялся на 21 станции С-EBS на 12 сайтах на глубинах от 4830 до 5780 м. Основные работы велись к востоку от ККЖ, но две станции были выполнены также и на западном склоне желоба (Brandt *et al.*, 2015a; Brandt, Malyutina, 2015). Последняя экспедиция KuramBio II в 2016 г. продолжила сбор бентоса в самом глубоководном районе СЗ Пацифики – в абиссали и ультраабиссали самого желоба, на 11 сайтах на глубинах от 5120 до 9584 м (Brandt *et al.*, 2019).

² Здесь и далее «сайт» (site) – совокупность нескольких станций с очень близкими координатами.

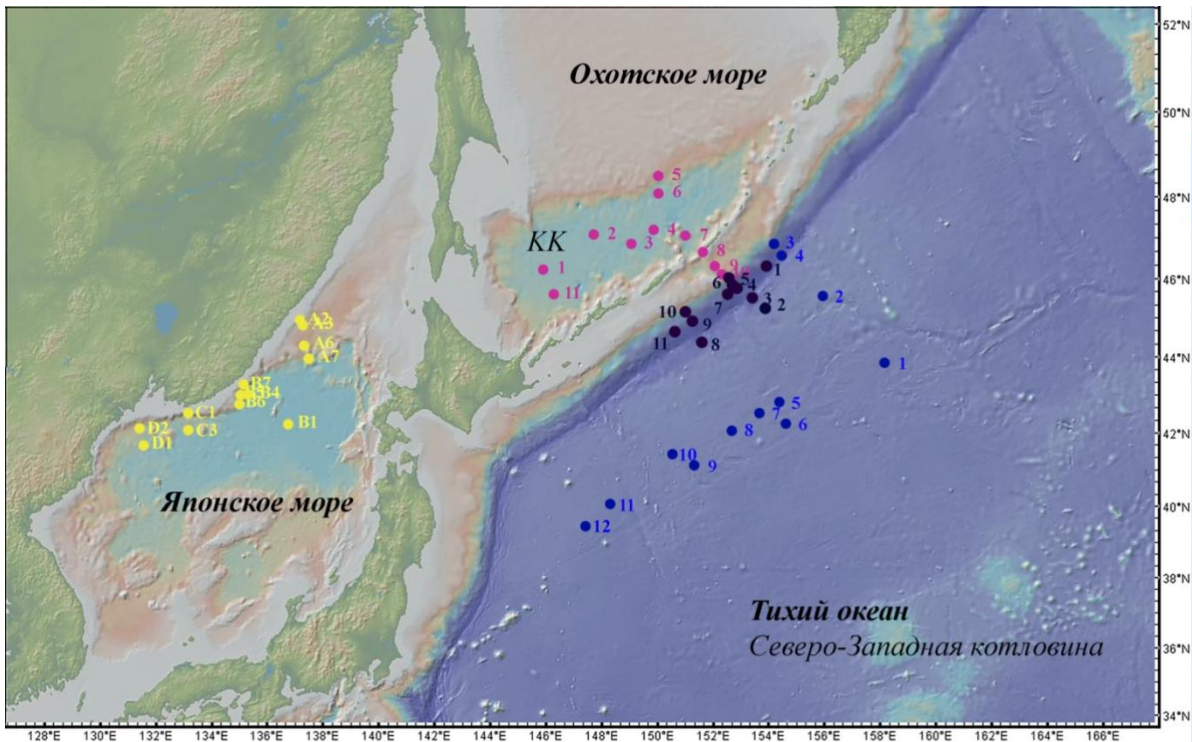


Рис. 1. Карта района работ четырех российско-немецких глубоководных экспедиций в СЗ Пацифике: желтым цветом показаны полигоны экспедиции SoJaBio (2010), розовым – SokhoBio (2015), синим – KuramBio (2012) и фиолетовым – KuramBio II (2016).

Впервые в СЗ Пацифике в ходе всех четырех экспедиций нами был применен стандартный набор современных орудий сбора, включая мультикорер (MUC) и коробчатый дночерпатель (BC) с площадью захвата 0,25 м² для отбора донных осадков для исследования грунта и донных животных инфауны, трал Агассица (AGT) и эпибентосные слэджи (С-EBS и EBS). Изоподы были собраны в основном при помощи слэджей. Это специально сконструированный салазочный трал для сбора эпи- и супрабентосной макрофауны (0,1–1 см), главным образом активных ракообразных (Brenke, 2005; Brandt *et al.*, 2013, 2018). Слэдж состоит из стальной рамы, в которую заключены супра- и эпибентосные камеры, снабженные планктонными сетями с пробоотборниками на концах (рис. 2). Соответственно расположению сетей: нижней – эпинета и верхней – супранета, каждое траление приносит разделенные пробы: эпибентосные (животных с поверхности грунта) и супрабентосные (животных из придонного слоя воды). На нижней стороне EBS расположен рычаг, который при касании прибора дна обеспечивает открытие крышек камер в начале траления и закрытие их в конце траления при отрыве днища от дна перед подъемом слэджа.

Такая конструкция препятствует попаданию планктонных организмов в сети при выходе прибора на палубу сквозь водную толщу.



Рис. 2. Эпибентосный слэдж С-EBS (по: Brandt *et al.*, 2013).

На каждом рабочем полигоне (за исключением отдельно оговоренных) было выполнено по две станции С-EBS или EBS. С каждого спуска были получены по две количественные (содержимое эпи- и супрапробоотборников) и две качественные пробы (содержимое планктонных сетей за пределами пробоотборников). На палубе пробы отмывались морской водой на ситах с ячейей 300 мкм. Затем пробы из первого траления фиксировались предварительно охлажденным 96% этанолом и помещались в морозильную камеру, где выдерживались 48 часов при температуре – 20°С для последующих генетических исследований. Пробы из повторного траления фиксировались 4% формальдегидом для морфологических исследований, выдерживались 48 часов, после чего промывались морской водой и переводились в 96% этанол.

Содержимое супрапроботборников из первого траления EBS на каждой станции (фиксированное этанолом) сортировалось в судовых лабораториях на таксоны высокого порядка. Пробы эпипроботборников сортировались уже в лабораториях российских и немецких научных центров. Разборка проб производилась с помощью стереомикроскопов. Сортировка проб, фиксированных этанолом, проводилась на льду, пробы хранились и транспортировались в охлажденных условиях (-20° – $+4^{\circ}\text{C}$).

Поскольку изоподы в каждой экспедиции были собраны однотипными слэджами с последующей стандартизированной обработкой проб и определением видов одними и теми же специалистами, для каждого из четырех исследованных районов нами были получены сопоставимые данные о составе и распределении фауны изопод.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Таксономический состав глубоководной фауны изопод СЗ Пацифики

В материалах четырех российско-немецких глубоководных экспедиций, исследовавших донную фауну нескольких сопредельных районов СЗ Пацифики в диапазоне глубин от 455 до 9584 м (океанической абиссали в районе ККЖ, самого желоба и котловин окраинных Японского и Охотского морей) изоподы оказались одной из самых многочисленных и разнообразных групп макробентоса (Golovan *et al.*, 2013, 2019; Brandt *et al.*, 2015a, 2018, 2019; Elsner *et al.*, 2015;). Обнаружена богатая фауна этих ракообразных, включающая на данный момент более 300 морфологических видов в составе 75 родов, 21 семейства и 4 подотрядов (Golovan *et al.*, 2013, 2018a, b; Malyutina *et al.*, 2013; Elsner *et al.*, 2015; Golovan, 2015a, 2018; Malyutina, Brandt, 2018; Golovan, Malyutina, 2019) (рис. 3). Нами впервые были получены сведения о глубоководной фауне изопод Охотского моря и существенно расширены имеющиеся сведения о фауне остальных районов. Имеющийся список видов будет со временем увеличен, так как часть материала находится в обработке. Обнаруженная нами фауна почти полностью состояла из представителей подотряда *Asellota* надсемейства *Janiroidea* (15 семейств, >250 видов, ~98% экз. изопод). Кроме того, в сборах присутствовали немногочисленные представители подотряда *Valvifera* (как минимум 9 видов из 4 родов сем. *Arcturidae*, *Antarcturidae* и *Idoteidae*),

Cymothoidea (1 вид из сем. Gnathiidae и как минимум 5 видов из паразитического инфраотряда Epcaridea) и Sphaeromatidea (1 вид из сем. Tecticipitidae).

Asellota были в основном представлены 12 первично-глубоководными семействами Janiroidea, среди которых преобладали Munnopsidae (54–94% экз. изопод, в зависимости от района исследования) и Desmosomatidae (5–29% экз. изопод). Глубоководные семейства азеллот (по принятой в настоящее время классификации таковых насчитывается 20) – это представители древней глубоководной фауны, радиация которых происходила в абиссали МО и привела к возникновению огромного разнообразия форм и морфологических адаптаций (Wilson, 1998; Raupach *et al.*, 2009; Riehl *et al.*, 2014). Колонизация азеллотами глубин МО происходила в несколько этапов и продолжается в настоящее время в связи со множественными проникновениями в глубоководные зоны МО представителей исходно мелководных семейств (Wilson, 1980; Raupach *et al.*, 2009; Golovan, Malyutina, 2019). В наших сборах кроме первично-глубоководных азеллот в небольшом количестве присутствовали также представители преимущественно мелководных семейств янироид – как минимум по одному виду Janiridae и Munnidae и два вида из двух родов Paramunnidae (Golovan *et al.*, 2013; Golovan, Malyutina, 2019). В том числе в абиссали ТО обнаружен новый для науки глубоководный род парамуннид *Reductogonium* Golovan & Malyutina, 2019. Более 80% собранных нами видов изопод оказались новыми для науки (Malyutina *et al.*, 2013; Golovan *et al.*, 2013, 2018a, b, 2019; Brandt *et al.* 2015b; Golovan, 2015a, b, 2018; Malyutina, 2015; Malyutina, Brandt, 2018; Jennings *et al.*, 2019). Двадцать пять родов изопод, подсемейство Lipomerinae и семейство Dendrotionidae впервые обнаружены в СЗ Пацифике (Brandt *et al.*, 2004; Malyutina, Brandt, 2015, 2018, in press; Golovan *et al.*, 2018b, 2019; Golovan, Malyutina, 2019). Не менее 137 видов (87%) Munnopsidae, собранных нашими экспедициями, оказались новыми для науки (Malyutina, Brandt, in press). Доля новых видов Desmosomatidae превышает 90% (Golovan, 2018; Golovan *et al.*, 2013, 2019; Jennings *et al.*, 2019). Это неудивительно, так как большинство видов, собранных EBS, были небольшого размера, а таких мелких плавающих ракообразных сложно отловить неспециализированными орудиями (тралами, дночерпателями), которые использовались во всех экспедициях НИС «Витязь».

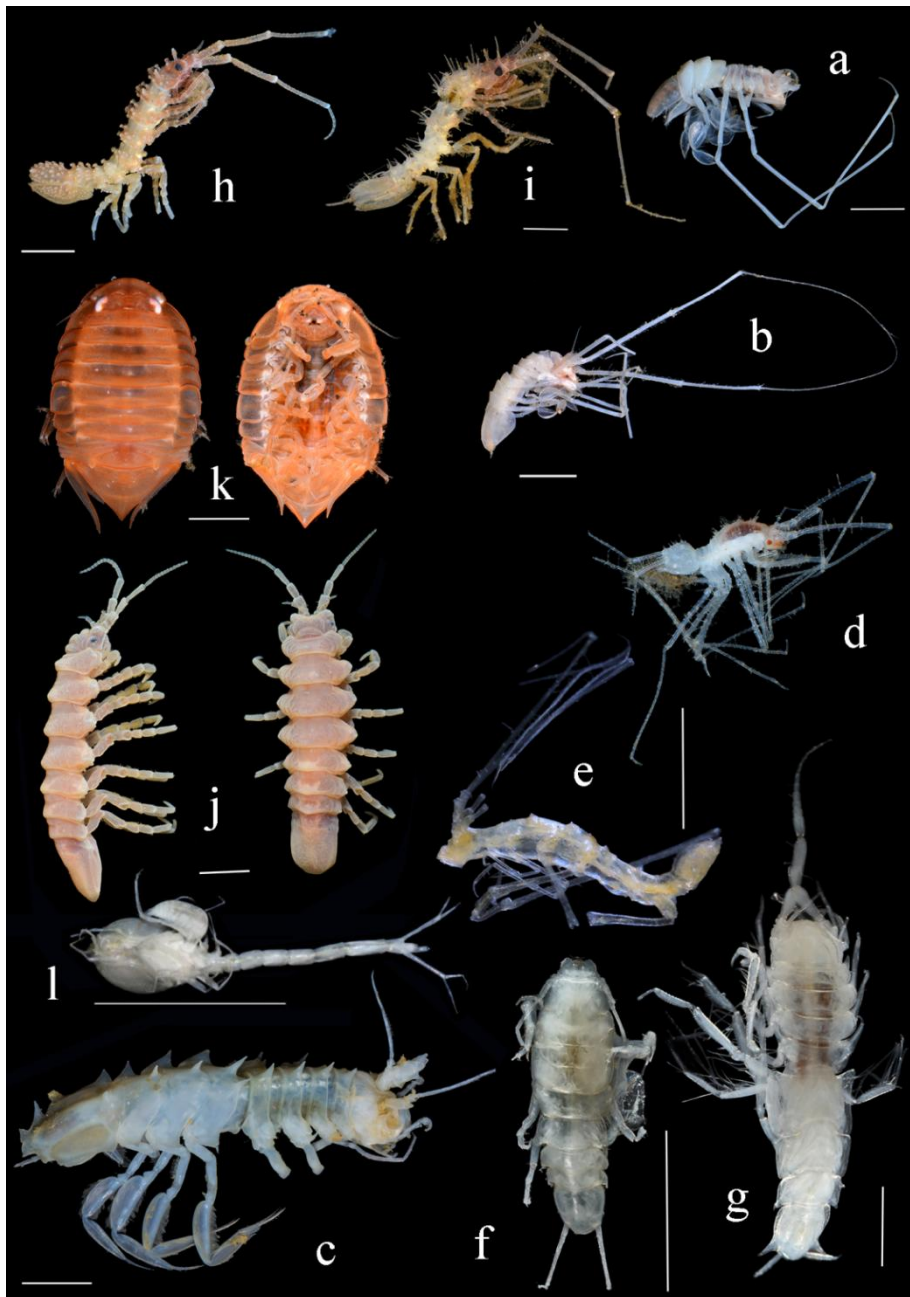


Рис. 3. Представители отряда Isopoda из глубоководных районов СЗ Пацифики. Подотряд Asellota: a – *Munnopsurus giganteus* (G.O. Sars) (SB 8-5 EBS), b – *Munneurycope* sp. (SB 8-5 EBS), c – *Rectisura herculae* (Birstein, 1957) (KB2) (Munnopsidae), d – Haplomunnidae (SB 7-11 AGT), e – *Dendromunna kurilensis* Golovan & Malyutina, 2018 (Dendrotionidae) (KB), f – *Macrostylis amaliae / sabinae* Bober *et al.*, 2018 (Macrostylidae) (KB2), g – *Mirabilicoxa* sp. (Desmosomatidae) (KB2); подотряд Valvifera: h – *Chaetarcturus pacificus* (Gurjanova, 1955) (SB 8-7 AGT), i – *Chaetarcturus* sp. (SB 1-11 AGT) (Antarcturidae), j – *Synidothea pulchra* Birstein, 1963 (SO 8-7 AGT) (Idoteidae); подотряд Sphaeromatidea: k – *Tecticeps leucophthalmus* Gurjanova, 1935 (SB 8-5 EBS); l – подотряд Cymothoidea: крипто-нисцидная личинка *Cryptoniscoidea* gen sp.1 на кумовом раке *Hemilamprops* sp. (KB2 85). Источники: c, e–g – по: Riehl *et al.*, in press; l – фото А.В. Лаврентьевой; остальные – по: Brandt *et al.*, 2018a. Обозначения: SB – SokhoBio; KB – KuramBio; KB2 – KuramBio II.

Полученные нами данные согласуются с результатами современных экспедиций в других глубоководных бассейнах МО, выполненных стандартизированными методами отбора проб с применением специализированных орудий сбора макрофауны, прежде всего – EBS для сбора подвижного эпибентоса (см.: Brandt *et al.*, 2004, 2005, 2007, 2014; Brökeland *et al.*, 2007). Так, в большинстве изученных ранее глубоководных районов изоподы были одной из доминирующих групп макробентоса по численности и разнообразию, в основном – за счет вклада первично-глубоководных семейств азеллот. Среди последних по разнообразию и численности преобладали муннопсиды, а десмосоматиды были на втором месте (Кусакин, 1965, 1999, 2003; Wolff, 1977; Svavarsson *et al.*, 1990; Brandt *et al.*, 2004, 2005, 2007; Brenke *et al.*, 2005; Brökeland *et al.*, 2007; Malyutina, Brandt, 2007; Wilson, 2008; Brix, Svavarsson, 2010; Lörz *et al.*, 2013; Meyer-Löbbecke *et al.*, 2014). Наши исследования вернули СЗ Пацифике статус одного из самых богатых и плотно населенных глубоководных районов МО, по крайней мере по фауне перакарид (Golovan *et al.*, 2013).

2.2. Состав фауны и особенности распределения изопод в исследованных глубоководных бассейнах СЗ Пацифики

Обладая разными особенностями гидрологии, геологической историей и степенью изоляции от абиссали МО, исследованные районы СЗ Пацифики существенно отличаются по разнообразию и таксономическому составу фауны, а также по процентному соотношению между представителями основных таксонов (Elsner *et al.*, 2013, 2015; Golovan *et al.*, 2013, 2018a, 2019; Malyutina, Brandt, 2015, 2018; Golovan, 2018).

2.2.1. Абиссаль ТО в районе ККЖ

Самая богатая и разнообразная фауна изопод обнаружена на открытой океанической абиссальной равнине в районе ККЖ, на глубинах 4830–5780 м. Изоподы, на долю которых приходилось 61.3% численности перакарид, были представлены как минимум 255 видами из 69 родов и 17 семейств из 3 подотрядов. Почти все эти таксоны (253 вида, 15 семейств, 99% численности изопод) принадлежали подотряду Asellota. Из них только 14 видов оказались известными ранее (Бирштейн, 1957, 1963, 1970, 1971; Кусакин, 1999, 2003), еще 16 видов были идентифицированы нами как “cf.” (Malyutina, Brandt, 2015, 2018; Golovan, 2018; Golovan *et al.*, 2019; Jennings *et al.*, 2019). Из 255 видов изопод 100 видов из 28 родов принадлежали

Munnopsidae и 65 видов из 11 родов – Desmosomatidae. На долю двух последних семейств приходилось 54 и 18% численности изопод соответственно. Большинство видов были представлены 1–2 экз. Только 31 вид изопод имел плотность поселения, превышающую 10 экз./1000 м². *Eurycope* sp. 1 (Munnopsidae) – единственный вид, который был встречен с относительно высокой численностью (223 экз./1000 м²) на западном склоне ККЖ. Шесть видов изопод (*Eurycope* sp. 1, *Betamorpha* cf. *fusiformis*, *Microcope* *ovata* (Birstein, 1970), *Mirabilicoxa* cf. *coxalis* (Birstein, 1963), *Macrostylis* sp. 2, *M. curticornis* Birstein, 1963) были собраны на каждом сайте экспедиции KuramBio (Golovan *et al.*, 2019).

Данные экспедиции KuramBio позволили установить, что распределение перакаррид, в том числе изопод, в районе исследования определяется комплексом факторов, важнейшим из которых является доступность пищевых ресурсов. В частности, высокое обилие и видовое богатство перакаррид в большинстве случаев наблюдалось на сайтах с высоким содержанием органического углерода в донных отложениях или с высокими показателями продуктивности поверхностных слоев воды (которая, в свою очередь, определяется особенностями гидрологии этого района). Выявлена положительная корреляция между численностью перакаррид и содержанием органического углерода (Сорг) в осадках (0.46) (Golovan *et al.*, 2019). На склоне желоба основную роль, по-видимому, играют процессы аккумуляции органики, приносимой по склону из более мелководных районов. Таким образом, наши исследования иллюстрируют зависимость глубоководной фауны от процессов, происходящих в поверхностных слоях воды и в соседних мелководных районах. Это должно учитываться при организации рационального природопользования в данном районе (Golovan *et al.*, 2019). Кроме того, была выявлена положительная корреляция между численностью перакаррид и концентрацией кислорода в придонном слое воды (коэффициент корреляции 0.66) (Golovan *et al.*, 2019). Содержание кислорода является одним из наиболее важных ограничивающих факторов для абиссального бентоса. Ввиду особенностей циркуляций на больших глубинах этот показатель почти полностью зависит от количества кислорода, растворенного в полярных областях. Вода в придонном слое может быть существенно обеднена кислородом из-за его потребления животными (см.: Kawabe, Fujio, 2010). Отрицательная корреляция наблюдалась между видовым богатством перакаррид и скоростью придонных течений (Golovan *et al.*, 2019).

2.2.2. ККЖ

В ходе экспедиции KuramBio II были выполнены сборы макробентоса в абиссали на границе с ККЖ и ультраабиссали желоба вплоть до максимальной глубины (9585 м). В материалах экспедиции (включая абиссальные станции) Isopoda составили 55% экз. всех перакарид. Однако с глубиной доля изопод снижалась, и на самых глубоководных станциях свыше 9000 м изоподы уступали по численности амфиподам (Brandt *et al.*, 2019). Для ряда крупных таксонов изопод (инфраотряд *Ericaridea*, сем. *Desmosomatidae*) сделаны самые глубоководные находки из известных в мире. Фауна изопод ультраабиссали ККЖ на уровне надвидовых таксонов выглядит как обедненная ТО абиссальная фауна и, очевидно, связана с нею происхождением. Это еще раз указывает на важность биоразнообразия абиссали, как «банка жизни» на нашей планете, и на необходимость его сохранения. Самыми многочисленными изоподами, собранными на всех станциях KuramBio II, оказались представители сем. *Munnopsidae* – 2185 экз. *Naplomiscidae* были вторым по численности семейством. *Desmosomatidae* встречены на сайтах 8, 10 (~5000 м), 5 (7100–7300 м) и 4 (~8700 м) с численностью более чем 20 экз., в то время как в других районах они присутствовали единично. *Nannoniscidae* и *Macrostylidae* были обнаружены до глубины ~8200 м. *Macrostylidae* были наиболее многочисленны на глубинах около 5000 м (8 и 10, в общей сложности 85 экз.). *Ischnomesidae* были найдены на всех станциях и на всех глубинах. *Naplomunnidae* отмечены только на абиссальных сайтах 8 и 10 с небольшой численностью. Представители подотряд *Valvifera* из семейства *Arcturidae* были найдены только на ст. 87 (сайт 10) (Brandt & shipboard scientific party, 2016; Riehl *et al.*, in press). Паразитические изоподы *Ericaridea* встречались единично до глубины 8700 м и были представлены двумя надсемействами *Vorygoidea* и *Cryptoniscoidea*.

Фауна муннопсид ультраабиссали ККЖ при сходном родовом составе оказалась беднее абиссальной (41 вид из 15 родов). Здесь не были обнаружены два подсемейства, *Acanthoscorinae* и *Lipomerinae*. В каждом из шести отмеченных в ультраабиссали подсемейств *Munnopsidae* число родов и видов уменьшалось по сравнению с абиссальной фауной. Так, вместо 5 родов и 34 видов *Euryscorinae* в абиссальной зоне в ультраабиссали были обнаружены только 2 рода и 20 видов. В абиссали были найдены 3 рода (13 видов) *Puargachninae*, в то время как в ультраабиссали был най-

ден только 1 род (3 вида). Три рода (6 видов) *Syneuryscopinae* встретились в абиссали и только 1 вид в ультраабиссали. *Munnopsinae* и *Storthingurinae* оказались менее других подсемейств обеднены в ультраабиссали: 4 рода (8 видов) *Munnopsinae* и 3 рода (7 видов) *Storthingurinae* найдены в абиссали, в то время как в ультраабиссали соответственно – 3 рода (4 вида) и 2 рода (6 видов). На глубине 6575 м в ККЖ был обнаружен только 1 экз. *Microscope ovata* (Birstein, 1970), второго по численности и встречаемости абиссального вида муннопсид,

85% ультраабиссальных видов *Munnopsidae* оказались новыми для науки. Обнаружено, что видовой и таксономический составы муннопсид на абиссальных и ультраабиссальных глубинах отличаются, но доминирует, как и всюду, подсемейство *Euryscopinae* (32% всех муннопсид), представленное 4 родами: *Euryscope*, *Disconectes*, *Tythoscope*, и *Munniscope*, за которым следует подсемейство *Betamorphinae* (27%) с 1 родом *Betamorpha* и 5 родов *incerta sedis* – 10%. Наиболее многочисленны и богаты видами были роды *Euryscope* с 15 видами (31% всех муннопсид) и *Betamorpha* (23%). На ультраабиссальных станциях в большом количестве были обнаружены такие виды, как *Rectisura vitjazi* (Birstein, 1957) (202 экз.), *R. kurilica* (Birstein, 1957) (167), *Euryscope* sp. 3 (304), *Betamorpha acuticoxalis* (Birstein, 1963) (208), *Ilyarachna* sp. (162 экз.).

Самым богатым районом KuramBio II по видовому богатству и численности *Munnopsidae* оказался самый мелководный полигон А8 с глубинами 5120 и 5150 м, где было собрано 372 экз. 17 видов на ст. 10, и 156 экз., 23 видов на станции 8. Следующими станциями были ст. 85 с 313 экз. и ст. 97 – 205 экз. Ультраабиссальная ст. 55 – следующая по численности муннопсид (140 экз.), но там они были представлены только тремя многочисленными видами родов *Euryscope*, *Betamorpha* и *Ilyarachna*. На самой глубоководной ст. 77 с глубиной 9584 м было обнаружено только 2 экз. вида *Euryscope* sp. 3. Число собранных видов *Munnopsidae* и их обилие на максимальных глубинах ККЖ меньше, чем в абиссальном районе ККЖ, исследованном экспедицией KuramBio (100 видов в диапазоне глубин 4882–5832 м). Среди 39 видов *Asellota*, ранее описанных с ультраабиссальных глубин ККЖ >6000 м (Бирштейн, 1970, 1971; Кусакин, 2003), к семейству *Munnopsidae* относятся лишь 9 видов. Мы собрали по крайней мере 6 из этих известных видов крупных размеров: *Rectisura vitjazi*, *R. herculea* (Birstein, 1957), *Vanhoeffenura chelata* (Birstein, 1957),

Munnicope magna (Birstein, 1963), *Betamorpha acuticoxalis* и *Eurycope curtirostris* Birstein, 1963.

В ультраабиссали ККЖ разнообразие десмосоматид с глубиной резко падает. Из представителей богатой абиссальной фауны лишь 4 вида родов *Mirabilicoxa* и *Eugerdella* были найдены в верхней части желоба на глубине ~6000–7000 м. Эти глубины отмечались ранее как переходный горизонт между абиссалью и ультраабиссалью, на котором происходят наиболее значимые фаунистические перестройки (Беляев, 1989). Вид *Mirabilicoxa tenuipes* (Birstein, 1970) известен из ККЖ с глубины 6675–6710 м. Однако, по-видимому, единственным истинным ультраабиссальным видом десмосоматид оказался *Eugerdella hadalis* Golovan & Brix, 2019, обнаруженный в ККЖ на глубинах от 7081 до 8745 м. В настоящее время это самая глубоководная находка представителя семейства в мире (Jennings *et al.*, 2019). В общей сложности десять морфологических видов десмосоматид были обнаружены в ходе экспедиций KuramBio, KuramBio II и SokhoBio по обе стороны ККЖ. Однако следует отметить, что исследования с применением методов молекулярного анализа выявили присутствие морфологически сходных видов в районе ККЖ (Jennings *et al.*, 2019).

2.2.3. Курильская котловина Охотского моря

До сих пор сведения о донном населении Курильской котловины ограничивались информацией о мегабентосе, данные об макро- и мейобентосе почти полностью отсутствовали (Савилов, 1961; Ушаков, 1953). В нижней батииали здесь было найдено по 1 экз. двух видов крупных изопод (>1 см, мегабентос) из подотрядов Valvifera и Sphaeromatidea (*Synidotea pulchra* Birstein, 1963 на ~2900 м, *Tecticeps leucophthalmus* Gurjanova, 1936 на 1366 м) (Гурьянова, 1936; Бирштейн, 1963; Кусакин, 1979, 1982). В абиссали Охотского моря перакариды не были известны. В материалах SokhoBio Peracarida оказались одним из самых многочисленных таксонов, составив 30% макробентоса в абиссали Курильской котловины (Brandt *et al.*, 2018). Доля изопод в абиссали Охотского моря (40% экз. перакарид) оказалась ниже, чем в районе ККЖ. Фауна равноногих абиссали Курильской котловины, связанной с ТО глубоководными проливами (до ~2200 м), также выглядит как обедненная тихоокеанская абиссальная фауна (более 100 видов, 17 семейств, более половины морфологических видов – общие с абиссалью ТО) (Golovan, 2018; Golovan *et al.*,

2018 a, b; Malyutina, Brandt, 2018). Здесь необходимо отметить, что применение молекулярных методов может в дальнейшем выявить существование морфологически мало отличимых видов в этих бассейнах (Jennings *et al.*, 2019). Пример близких, но определяемых морфологически видов – два очень сходных вида *Dendromunna* (сем. Dendrotonidae), которые были описаны нами из абиссали ТО в районе ККЖ и из Курильской котловины соответственно (Golovan *et al.*, 2018b).

Около 98% экз. изопод, собранных в абиссали Курильской котловины, принадлежали к 11 первично-глубоководным семействам подотряда Asellota, общим с КК абиссалью. Среди последних преобладали Munnopsidae и Desmosomatidae (41% и 29% экз. изопод соответственно). По разнообразию и видовому богатству (39 видов муннопсид, 17 видов десмосоматид) фауна занимает промежуточное положение между соседними абиссальными районами: открытой абиссалью ККЖ и значительно изолированной от океанической абиссали котловиной Японского моря (ЯМ). Кроме того, преимущественно мелководные семейства азеллот Munnidae и Paramunnidae были обнаружены на трех самых богатых станциях Охотского моря (ст. 2, 4 и 7). Оба семейства в исследуемом районе также известны на шельфе и в верхней батии (Кусакин, 1988; Кусакин, Васина, 1993). Кроме типичных для абиссали ТО таксонов в абиссали Курильской котловины найден род *Oecidiobranthus* (Desmosomatidae). Этот род известен от шельфа до абиссали в Арктике и Южной Пацифике (Hessler, 1970; Кусакин, 1999; Boyko *et al.*, 2008). В СЗ Пацифике *Oecidiobranthus* пока найден только в ОМ (Golovan, 2018).

Из 39 видов Munnopsidae, обнаруженных в Курильской котловине, ранее известными были только 5 видов, 87% видов оказались новыми для науки (Malyutina, Brandt, 2018). Описан один из новых видов, *Gurjanopsis kurilensis* Malyutina & Brandt, 2018, найденный в Курильской котловине. Это третий вид редкого рода *Gurjanopsis* Malyutina & Brandt, 2007, известного до нашей находки только из глубоководной Арктики и Антарктики, и первое упоминание рода для ТО. Род интересен уникальными для надсемейства плезиоморфными признаками: мужская крышечка у рода образована не как у всех в надсемействе оперкулярными плеоподами 1 и 2, а уменьшенными плеоподами 1 и 2 и увеличенными плеоподами 3, как у примитивных надсемейств Aselloidea и Stenotroidea. Новый вид рода *Baeonectes* из абиссали Курильской котловины (Malyutina, Brandt, 2018)

оказался самой глубоководной находкой рода, известного с шельфа и батииали бореальной зоны (Malyutina *et al.*, 2013). Все виды Desmosomatidae – новые для науки, или (*Eugerdella kurabyssalis* Golovan, 2015) описаны нами ранее из абиссали района ККЖ (Golovan, 2018). Описан доминантный вид *Mirabilicoxa biramosa* Golovan, 2018, на долю которого приходилось 27% экз. десмосоматид в абиссали Курильской котловины.

Распределение изопод в абиссали Курильской котловины было очень мозаично. Взаимосвязи между данными о составе изопод (на примере Desmosomatidae) и абиотическими параметрами в абиссальной зоне моря не было выявлено (Golovan, 2018). Барьером для распространения богатой абиссальной фауны в ОМ, очевидно, служит бедный кислородом слой воды на глубине 600–1350 м (Golovan, 2018; Ушаков, 1953). На единственном батииальном полигоне в Курильской котловине (~1700 м) был обнаружен только 1 экз. муннопсид, десмосоматиды отсутствовали (Golovan, 2018; Malyutina, Brandt, 2018). В траловых сборах здесь в массе присутствовал *Tecticeps leucophthalmus*. В прол. Буссоль (~2300 м) сильные придонные течения и отсутствие условий для осадконакопления, очевидно, затрудняют колонизацию азеллот. Так, на двух станциях в проливе были обнаружены всего 5 экз. двух видов муннопсид, десмосоматиды отсутствовали (Golovan, 2018; Malyutina, Brandt, 2018). Такие специфические условия требуют особенных адаптаций, как, например, у прикрепляющихся к ветвящемуся субстрату Arcturoidea (Valvifera) (Golovan *et al.*, 2018a).

Несмотря на то что Arcturoidea не являются массовой группой, можно сделать некоторые выводы об их распределении в исследуемой области. Абиссаль Охотского моря населена двумя видами арктуроид, *Neastacilla birsteini* Golovan & Malyutina, 2018 (сем. Arcturidae) и *Chaetarcturus* cf. *beddardi* (Antarcturidae) (Golovan *et al.*, 2018a). Ранее сообщалось, что *S.* cf. *beddardi* обитает в батииали Охотского моря и в батииали и абиссали ТО к востоку от Курильских островов (Кусакин, 1982), 2 экз. этого вида собраны нами на двух станциях SokhoBio. *N. birsteini* обнаружен в небольших количествах (1–3 экз. на станцию), на пяти станциях в абиссали Курильской котловины, и отсутствовал за ее пределами. *N. birsteini* весьма сходен с видом *N. anophthalma* (Birstein, 1963) из нижней батииали к востоку от Курильских островов. Второй неописанный вид рода *Neastacilla* был обнаружен на единственном батииальном полигоне SokhoBio на северном склоне Курильской котловины. В прол. Буссоль найдены три вида семейства

Antarcturidae (*Antarcturus* sp. 1, *Chaetarcturus pacificus* и *Chaetarcturus* sp. 3), здесь фауна арктуроид напоминает глубоководную фауну ТО. На абиссальной станции на западном склоне ККЖ были найдены два других вида, *Chaetarcturus* sp. 2 и *Neastacilla* sp.2. Вероятно, такие большие различия в видовом составе между прол. Буссоль и абиссалью ТО обусловлены различными условиями окружающей среды на этих участках (Golovan *et al.*, 2018a).

2.2.4. Котловина Японского моря

В котловине Японского моря, имеющего лишь мелководные проливы (в пределах шельфа), на глубинах 455–3666 м было обнаружено 22 вида изопод, относящихся к 14 родам, 7 семействам и 2 подотрядам, что составило 37% численности всех перакарид (Golovan *et al.*, 2013). Половина видов изопод (11) принадлежала Desmosomatidae, 8 видов из которых оказались новыми для науки. Из собранных 4 эндемичных видов Munnopsidae, 3 относятся к наиболее широко распространенным в МО родам: *Euryscope*, *Ilyarachna* Sars, 1870 и *Munnopsurus*. Только 1 вид, *Baeonectes brandtae* Maljutina *et al.*, 2013, оказался новым для науки. Кроме того, единично встречались представители преимущественно мелководных семейств азеллот Munnidae и Paramunnidae (по 1 виду), а также виды паразитических групп из подотряда Cymothoidea (*Caecognathia elongata* (Krøyer, 1847) из сем. Gnathiidae и 3 вида Epicaridea). Разнообразие и видовое богатство изопод, а также изобилие большинства видов были самыми высокими на самых мелководных станциях склона котловины (450–550 м) и уменьшались с глубиной. Напротив, численность *Euryscope spinifrons* Gurjanova, 1933 (Munnopsidae) значительно возрастала у подножья склона (2600–3300 м), где этот вид достигал огромной численности (до 2900 экз. на ~1000 м², 20557 экз. во всех пробах) в условиях изобилия пищевых ресурсов (рис. 4), составляя до 100% экз. всех изопод и до 70% экз. макробентоса (Elsner *et al.*, 2013; Golovan *et al.*, 2013; Maljutina *et al.*, 2013).

2.3. Анализ таксономического состава фауны сем. Munnopsidae и Desmosomatidae

Анализ списка из 157 видов Munnopsidae из всего региона СЗ Пацифики выявил наибольшее видовое богатство в абиссальной области ККЖ – 106 видов. Из 35 родов, отмеченных для всей СЗ Пацифики, только 6 родов не

были найдены в абиссальном районе. На глубинах >6000 м в ККЖ было зарегистрировано 46 видов 15 родов (21 род из общего списка родов не был обнаружен). В абиссали Курильской котловины было собрано 39 видов из 19 родов (не найдены 16 родов). В Японском море в батиали и абиссали были найдены только 4 вида муннопсид из 4 родов.

Несмотря на различия в видовом составе, соотношении подсемейств и родов муннопсид на океанической абиссальной равнине, в ультраабиссали и в абиссальных бассейнах окраинных морей, подсемейство Eurycorinae было доминирующим во всех районах как по видовому богатству, так и, за исключением Курильской котловины, по численности. В сборах KuramBio Eurycorinae составили 56%, род *Microcope* из группы *incertae sedis* – 16%, Pyarachninae – 10%, Betamorphinae – 4% и Munneurycope – 4% всех абиссальных муннопсид. В ультраабиссальной зоне подсемейство Eurycorinae также доминирует (42%), за ним следуют Betamorphinae (33%), Storthyngurinae (17%) и род *Microcope* (7%). Pyarachninae в ультраабиссали составляли всего 3% муннопсид, хотя в абиссальных пробах KuramBio II соотношение было другим: Eurycorinae – 30%, Pyarachninae – 22%, Betamorphinae – 17%, Storthyngurinae – 0,4%. В нижней батиали и абиссали Японского моря 99% всех муннопсид принадлежали Eurycorinae. Единственным из исследованных районов, где подсемейство Eurycorinae (27%) не было самым многочисленным таксоном, а следовало за Pyarachninae (39%), был абиссальный Курильская котловина, хотя там это было самое богатое видами подсемейство.

Подсемейство Acanthoscorinae с 18 описанными видами мировой фауны было зарегистрировано на глубинах 2456–5778 м (Malyutina *et al.*, 2018b). Все известные 16 видов подсемейства Lipomerinae были описаны из Атлантического и Южного океанов в диапазоне глубин 59–4957 м. Нашими данными подтверждено, что подсемейства Acanthoscorinae и Lipomerinae являются батиально-абиссальными таксонами, не заселившими ультраабиссаль. Единственный вид *Acanthoscope*, описанный из абиссального района ККЖ, *A. curticauda* Birstein, 1970, не был повторно найден во время наших экспедиций, но в каждом из исследованных районов, за исключением Японского моря, были собраны в общей сложности четыре абиссальных вида этого рода. Вид *A. galathea* Wolff, 1962, описанный с восточной тропической Пацифики, но широко распространенный в Атлантике, был в числе четырех найденных видов в сборах KuramBio и

SokhoBio, что расширило известный географический ареал этого вида (Malyutina *et al.*, 2018b; Malyutina, Brandt, 2018). Подсемейство и его четыре рода было впервые зарегистрировано в СЗ Пацифике. В сборах KuramBio в абиссальном районе ККЖ (4830–5429 м) были обнаружены шесть новых видов Lipomerinae (Malyutina, Brandt, 2015), а затем еще три новых вида трех родов были обнаружены во время экспедиции SokhoBio, один из этих родов, *Lionectes* был впервые отмечен для Тихого океана (Malyutina, Brandt, 2018). Во время экспедиции KuramBio II еще один новый вид, *Hapsidohedra* sp. был найден на абиссальной станции 85 на западном склоне ККЖ.



Рис. 4. Участок дна в котловине Японского моря на глубине ~ 3500 м (трансекта А, SoJaBio) с многочисленными *Eurycope spinifrons* Gurjanova, 1933 (по: Brandt *et al.*, 2013).

Сокращение численности фауны муннопсид и уменьшение числа подсемейств, родов и видов по сравнению с абиссалью наблюдалось не только в ультраабиссали, но также и в Курильской котловине (Malyutina, Brandt, 2018): там не были найдены три подсемейства, Vetamorphinae, Syneuryscopinae и Storthyngurinae. Но они были обнаружены в ультраабиссали ККЖ. Пять родов, встречающихся в Курильской котловине и вблизи

Курильских островов с тихоокеанской стороны, не были обнаружены на ультраабиссальных глубинах ККЖ.

На двух абиссальных тихоокеанских сайтах SokhoBio, расположенных близко друг к другу на западном склоне ККЖ, было собрано 36 видов муннопсид: 18 видов на сайте 9 на глубинах 3371–3389 м и 26 видов на сайте 10 на глубине 4681–4798 м. Только восемь из этих видов были общими для обоих районов. На сайте 9, расположенном ближе к Курильской котловине, были обнаружены виды относительно мелководных родов *Tythoscope* и *Echinozone*, встреченные также на сходных глубинах в котловине, но не найденные на более глубоком сайте 10 и на абиссальных станциях KuramBio и KuramBio II по обеим сторонам ККЖ. Напротив, виды *Storthingurinae* и *Syneurycopinae* и виды родов *Betamorpha* и *Acanthamunnopsis* не были найдены ни на сайте 9, ни в Курильской котловине. Виды этих таксонов, которые были обычны на абиссальных станциях KuramBio и KuramBio II с обеих сторон ККЖ, обнаружались в сборах SokhoBio только на более глубоком сайте 10. Полученные данные для близко расположенных полигонов подтверждают пятнистость в расселении изопод, в частности муннопсид.

Самой бедной оказалась фауна муннопсид в Японском море: там были найдены только четыре вида из четырех родов. Таким образом, полученные данные по биоразнообразию Munnopsidae в СЗ Пацифике иллюстрируют тенденцию обеднения фауны от открытой абиссали СЗ Пацифики к ультраабиссальным глубинам ККЖ, а также к полуизолированной абиссальной Курильской котловине Охотского моря и особенно к гораздо более изолированной абиссальной котловине Японского моря.

В глубоководной котловине Японского моря обитают только четыре эндемичных вида муннопсид. Для трех остальных районов и батиметрических зон: океанической абиссали, ультраабиссали ККЖ и абиссали Курильской котловины выявлено 10 общих видов. Кроме них, еще 13 видов, таких как наиболее массовые *Eurycope* sp. 1, *E.* sp. 3, *Betamorpha* sp., *Rectisura herculea* (Birstein, 1957), *Munneurycope* sp. 1., были встречены как в абиссали, так и на ультраабиссальных глубинах, а 39 видов были найдены на абиссали с обеих сторон ККЖ, но отсутствовали в ультраабиссали желоба (Malyutina, Brandt, 2020). Полученные результаты документально подтверждают, что наиболее многочисленные виды, роды и подсемейства Munnopsidae оказались и наиболее широко распространены

ными в регионе исследования как географически, так и батиметрически. Для многих муннопсид ультраабиссаль желоба не является барьером для расселения, так, 62 вида оказались общими для абиссальных глубин по обеим сторонам ККЖ.

Экологическая пластичность видов самых широко распространенных родов, в частности рода *Eurycope*, очевидно, позволяет им преодолевать различные изолирующие барьеры в абиссали и осваивать новые местообитания. Так, единственный вид изопод, *Eurycope spinifrons*, составляющий 100% всех изопод в абиссальных пробах SoJaBio (Elsner *et al.*, 2013; Golovan *et al.*, 2013; Malyutina *et al.*, 2013), очевидно, является одним из наиболее успешных колонизаторов молодой абиссали Японского моря. Из 5 наиболее распространенных видов муннопсид в ультраабиссали ККЖ 3 вида также принадлежат роду *Eurycope*. Один из этих самых многочисленных видов, *Eurycope* sp. 3, был единственным видом муннопсид, найденным на самой глубокой станции ККЖ (9584 м) (Malyutina, Brandt, 2020).

Самая богатая фауна десмосоматид обнаружена в абиссали ТО в районе ККЖ (62 морфологических вида, 11 родов) (Golovan *et al.*, 2019; Jennings *et al.*, 2019). Состав родов оказался типичен для открытой океанической абиссали. Самыми богатыми были роды *Eugerdella* (19 видов), *Mirabilicoxa* (17) и *Eugerdella* (7). Такая картина свойственна мировой фауне десмосоматид в целом (Boyko *et al.*, 2008). В самом желобе разнообразие десмосоматид с глубиной резко падает. Из представителей богатой абиссальной фауны лишь 4 вида родов *Mirabilicoxa* и *Eugerdella* были найдены в верхней части желоба на глубине ~6000–7000 м. Единственным истинным ультраабиссальным видом десмосоматид оказался *Eugerdella hadalis* Golovan & Brix, 2019, обнаруженный в ККЖ на глубинах от 7081 до 8745 м (Jennings *et al.*, 2019). Фауна абиссали Курильской котловины Охотского моря выглядит как обедненная тихоокеанская абиссальная фауна (17 морфологических видов, 8 родов; 10 видов и 7 родов – общие с абиссалью ТО) (Golovan, 2018). Роды *Pseudomesus*, *Torwolia*, *Disparella*, *Parvochelus*, обитающие в КК абиссали, не были найдены в Охотском море (Golovan, 2018; Golovan *et al.*, 2019). Однако здесь был найден эврибатный род *Oecidiobanchus*, известный из Арктики и Южной Пацифики, но не найденный в КК абиссали (Hessler, 1970; Кусакин, 1999; Boyko *et al.*, 2008; Golovan, 2018). Информация о шельфовой фауне десмосоматид Охотского моря очень неполная: 7 видов из 3 родов (*Desmosoma*, *Eugerdella*,

Paradesmosoma) известны из типовых местонахождений у берегов Западной Камчатки (Кусакин, 1965). Роды *Desmosoma* и *Eugerdia* – общие с абиссалью Охотского моря. Род *Paradesmosoma* известен только из зоны шельфа и верхней батииали.

В котловине Японского моря, имеющего лишь мелководные проливы (в пределах шельфа), обнаружено 12 видов из 5 родов десмосоматид (Кусакин, 1999; Головань, 2007; Головань, Малютина, 2010; Golovan *et al.*, 2013). Эти виды найдены на шельфе (*Paradesmosoma orientale* Kussakin, 1965) или в верхней батииали до глубины ~500 м. Видовое богатство резко уменьшается с глубиной. Четыре вида достигают глубины 1000 м (*Mirabilicoxa kussakini* Golovan, 2007), 1500 м (*Mirabilicoxa* sp.), 1900 м (*Eugerdia fragilis* (Kussakin, 1965)) и 3400 м (*Desmosoma lobipes* Kussakin, 1965). Три вида (*P. orientale*, *E. fragilis*, *D. lobipes*) оказались общими с шельфом Охотского моря.

Таким образом, фауна десмосоматид всех исследованных районов СЗ Пацифики связана на родовом уровне. Абиссальная фауна Охотского моря имеет тихоокеанское происхождение. Фауна котловины Японского моря очевидно связана с шельфовой фауной Охотского моря.

Наши новые данные расширили список видов изопод, которые были известны в обширном регионе ККЖ на глубинах от шельфа до 9346 м (Гурьянова, 1936; Бирштейн, 1957, 1963, 1970, 1971; Кусакин, 1965, 1979, 1982, 1988, 1999, 2003; Кусакин, Васина, 1993; Головань, Малютина, 2010; Golovan, 2013) с 118 до >330. Так, список видов Munnopsidae увеличен с 39 видов 14 родов до 157 видов 35 родов, Desmosomatidae с 11 видов из 5 родов до 85 видов из 13 родов. Было выяснено, что абиссальные и ультраабиссальные глубины ККЖ, а также глубоководные котловины Охотского и Японского морей существенно отличаются по процентному соотношению этих семейств и их родов.

Список литературы

- Беляев Г.М. Глубоководные океанические желоба и их фауна. М.: Наука. 1989. 255 с.
- Бирштейн Я.А. О некоторых особенностях ультраабиссальной фауны на примере рода *Storothyngura* // Зоологический журнал. 1957. Т. 36. С. 961–985.

Бириштейн Я.А. Глубоководные равноногие ракообразные северо-западной части Тихого океана / ред. Л. А. Зенкевич. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 213 с.

Бириштейн Я.А. Дополнения к фауне равноногих ракообразных (Crustacea, Isopoda) Курило-Камчатского желоба. Ч. 1. Фауна Курило-Камчатского желоба и условия его существования // Тр. Ин-та океанологии АН СССР. 1970. Т. 86. С. 292–337.

Бириштейн Я.А. Дополнения к фауне равноногих ракообразных (Crustacea, Isopoda) Курило-Камчатского желоба. Ч. 2. Asellota-2. Фауна Курило-Камчатского желоба // Тр. Ин-та океанологии АН СССР. 1971. Т. 92. С. 162–238.

Головань О.А. *Mirabilicoxa kussakini* sp. nov., новый вид азеллот глубоководного сем. Desmosomatidae (Crustacea, Isopoda, Asellota) из батииали Японского моря // Биол. моря. 2007. № 33. С. 408–416.

Головань О.А., Малютина М.В. Биота российских вод Японского моря. Т. 9.

Равноногие раки (Isopoda). Ч. 1 / ред. А. В. Чернышев, Владивосток: Дальнаука, 2010. 356 с.

Гурьянова Е.Ф. Равноногие дальневосточных морей Фауна СССР. Вып. 7. Ракообразные. 1936. 280 с.

Дерюгин К.М. Зоны и биоценозы залива Петра Великого (Японское море) // Сборник, посвященный научной деятельности Н.М. Книповича (1885–1939). М., 1939. С. 115–143.

Зенкевич Л.А. Биология морей СССР. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 740 с.

Зенкевич Л.А., Бириштейн Я.А., Беляев Г.М. Изучение фауны Курило-Камчатской впадины // Тр. Ин-та океанологии АН СССР. 1955. Т. 12. С. 61–74.

Кусакин О.Г. К фауне Desmosomatidae (Crustacea, Isopoda) дальневосточных морей СССР // Исслед. фауны морей. 1965. Т. 3. С. 115–144.

Кусакин О.Г. Морские и солоноватоводные равноногие ракообразные (Isopoda) холодных и умеренных вод Северного полушария. Т. I. Подотряд Flabellifera. Л.: Наука, 1979. 472 с. (Определители по фауне СССР, издаваемые ЗИН АН СССР; Вып. 122).

Кусакин О.Г. Морские и солоноватоводные равноногие ракообразные (Isopoda) холодных и умеренных вод Северного полушария. Т. II. Подотряды Anthuridea, Microcerberidea, Valvifera и Tyloidea. Л.: Наука,

1982. 463 с. (Определители по фауне СССР, издаваемые ЗИН АН СССР; Вып. 131).

Кусакин О.Г. Морские и солоноватоводные равноногие ракообразные (Isopoda) холодных и умеренных вод Северного полушария. Т. III. Подотряд Asellota. Ч. 1. Семейства Janiridae, Santidae, Dendrotionidae, Munnidae, Paramunnidae, Naplomunnidae, Mesosignidae, Naploniscidae. Л.: Наука, 1988. 502 с. (Определители по фауне СССР, издаваемые ЗИН АН СССР; Вып. 152).

Кусакин О.Г. Морские и солоноватоводные равноногие ракообразные (Isopoda) холодных и умеренных вод Северного полушария, Т. III. Подотряд Asellota. Ч. 2. Семейства Joeropsididae, Nannoniscidae, Desmosomatidae, Macrostylidae. СПб.: Наука, 1999. 385 с. (Определители по фауне СССР, издаваемые ЗИН РАН; Вып. 169).

Кусакин О.Г. Морские и солоноватоводные равноногие ракообразные (Isopoda) холодных и умеренных вод Северного полушария. Т. III. Подотряд Asellota. Ч. 3. Семейство Munnopsidae. СПб.: Наука, 2003. 381 с. (Определители по фауне СССР, издаваемые Зоологическим институтом РАН; Вып. 171).

Кусакин О.Г., Васина Г.С. Равноногие ракообразные (Isopoda, Asellota) батиали Курильских островов. Фауна материкового склона Курильской островной гряды // Исслед. фауны морей. 1993. Т. 46. С. 107–129.

Леонов А.К. Японское море. Региональная океанография // Л.: Гидрометеиздат, 1960. С. 291–463.

Лучин В.А., Манько А.Н. Водные массы // Гидрометеорология и гидрохимия морей. 2003. Т. 8. Японское море. Вып. 1. Гидрометеорологические условия. С. 243–256.

Морошкин К.В. Водные массы Охотского моря. М.: Наука, 1966. 67 с.

Савилов А.И. Экологическая характеристика донных сообществ беспозвоночных Охотского моря // Тр. Ин-та океанологии АН СССР. 1961. Т. 46.

Ушаков П.В. Фауна Охотского моря и условия ее существования. Л.: Изд-во АН СССР, 1953. 485 с.

Amano K. Biogeography and the Pleistocene extinction of neogastropods in the Japan Sea // Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol. 2004. Vol. 202. P. 245–252.

Boyko C.B., Bruce N.L., Hadfield K.A. et al. World Marine, Freshwater and Terrestrial Isopod Crustaceans database. 2008. Available from: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=118327>

Brandt A., Alalykina I., Fukumori H. et al. First insights into macrofaunal composition from the SokhoBio expedition (Sea of Okhotsk, Bussol Strait and northern slope of the Kuril-Kamchatka Trench) // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2018. Vol. 154. P. 106–120.

Brandt A., Alalykina I., Brix S. et al. Depth zonation of Northwest Pacific deep-sea macrofauna // Progr. in Oceanogr. 2019. Vol. 176. 102131.

Brandt A., Berge J. Peracarid composition, diversity and species richness in the area of the Northeast Water polynya, East Greenland (Crustacea, Malacostraca) // Polar Biol. 2007. Vol. 31. P. 15–22.

Brandt A., Brenke N., Andres H.G. et al. Diversity of peracarid crustaceans (Malacostraca) from the abyssal plain of the Angola Basin // Org. Diver. Evol. 2005. Vol. 5. P. 105–112.

Brandt A., Brökeland W., Brix S., Malyutina M. Diversity of Southern Ocean deep-sea Isopoda (Crustacea, Malacostraca) – A comparison with shelf data // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2004. Vol. 51. P. 1753–1768.

Brandt A., Elsner N., Brenke N. et al. Epifauna of the Sea of Japan collected via a new epibenthic sledge equipped with camera and environmental sensor systems // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2013. Vol. 86–87. P. 43–55.

Brandt A., Elsner N.O., Malyutina M.V. et al. Abyssal macrofauna of the Kuril-Kamchatka Trench area (Northwest Pacific) collected by means of a camera-epibenthic sledge // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2015a. Vol. 111. P. 175–187.

Brandt A., Stüven J.K., Caurant C., Elsner N.O. An account of the Ischnomesidae (Peracarida, Isopoda) from the Kuril-Kamchatka Trench and abyssal plain (Northwest Pacific) with the description of two new species // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2015b. Vol. 111. P. 279–293.

Brandt A., Gooday A.J., Brandão S.N. et al. First insights into the biodiversity and biogeography of the Southern Ocean deep sea // Nature. 2007. N 447. P. 307–311.

Brandt A., Havermans C., Janussen D. et al. Composition and abundance of epibenthic-sledge catches in the South Polar Front of the Atlantic // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2014. Vol. 108. P. 69–75.

Brandt A., Malyutina M.V. The German-Russian deep-sea expedition KuramBio (Kurile Kamchatka biodiversity studies) on board of the RV Sonne in 2012 following the footsteps of the legendary expeditions with RV Vityaz // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2015. Vol. 111. P. 1–9.

Brandt A., shipboard scientific party. Kuril Kamchatka Biodiversity Studies II – RV Sonne SO250, Tomakomai-Yokohama (Japan), 16.08.-26.09.2016 // University of Hamburg (Hamburg, Germany) Cruise report. 2016.

Brenke N. An epibenthic sledge for operations on marine soft bottom and bedrock // Mar. Techn. Soc. J. 2005. Vol. 39. P. 10–21.

Brenke N., Brix S., Knuschke T. A new deep-sea isopod species from the Angola Basin: *Prochelator angolensis* sp. nov (Asellota: Desmosomatidae) // Org. Div. Evol. 2005. Vol. 5. P. 179–188.

Brix S., Svavarsson J. Distribution and diversity of desmosomatid and nannoniscid isopods (Crustacea) on the Greenland-Iceland-Faeroe Ridge // Pol. Biol. 2010. Vol. 33. P. 515–530.

Brökeland W., Choudhury M., Brandt A. Composition, abundance and distribution of Peracarida from the Southern Ocean deep sea // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2007. Vol. 54. P. 1752–1759.

Connolly S.R., MacNeil M.A., Caley M.J. et al. Commonness and rarity in the marine biosphere // Proc. Nat. Acad. Sci. 2014. Vol. 111. P. 8524–8529.

Elsner N.O., Golovan O.A., Malyutina M.V., Brandt A. Alone in the dark: Distribution, population structure and reproductive mode of the dominant isopod *Eurycope spinifrons* Gurjanova, 1933 (Isopoda: Asellota: Munnopsidae) from bathyal and abyssal depths of the Sea of Japan // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2013. Vol. 86–87. P. 103–110.

Elsner N.O., Malyutina M. V., Golovan O.A. et al. Deep down: Isopod biodiversity of the Kuril-Kamchatka abyssal area including a comparison with data of previous expeditions of the RV Vityaz // Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2015. Vol. 111. P. 210–219.

Golovan O.A. Order Isopoda // Check-list of species of free-living invertebrates of the Russian Far Eastern seas. (B.I. Sirenko (Ed) / Zool. Institute RAS, 2013. P. 141–148.

Golovan O.A. Description of two ubiquitous species of Desmosomatidae (Isopoda: Asellota) from the Northwest Pacific Basin east of the Kuril-Kamchatka Trench // *Zootaxa*. 2015a. Vol. 4039. P. 201–224.

Golovan O.A. Desmosomatidae (Isopoda: Asellota) from the abyssal plain to the east of the Kuril-Kamchatka Trench: New data on diversity with the description of two new species // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 2015b. Vol. 111. P. 256–278.

Golovan O.A. Desmosomatidae (Isopoda: Asellota) from the Kuril Basin of the Sea of Okhotsk: First data on diversity with the description of the dominant species *Mirabilicoxa biramosa* sp. nov. // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 2018. Vol. 154. P. 292–307.

Golovan O.A., Błazewicz-Paszkowycz M., Brandt A. et al. Diversity and distribution of peracarid crustaceans (Malacostraca) from the continental slope and the deep-sea basin of the Sea of Japan // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 2013. Vol. 86–87. P. 66–78.

Golovan O.A., Błazewicz M., Brandt A., Jażdżewska A., Józwiak P., Lavrenteva A. V., Malyutina M. V., Petryashov V. V., Riehl T., Sattarova V. V. Diversity and distribution of peracarid crustaceans (Malacostraca) from the abyss adjacent to the Kuril-Kamchatka Trench // *Mar. Biod.* 2019. Vol. 49. P. 1343–1360.

Golovan O.A., Malyutina M.V. A new deep-sea genus of Paramunnidae (Isopoda: Asellota) from the Northwest Pacific adjacent to the Kuril-Kamchatka Trench with remarks on paedomorphosis in deep-sea species // *Progr. Oceanogr.* 2019. Vol. 178. 102200.

Golovan O.A., Malyutina M. V., Brandt A. Arcturoid isopods (Isopoda: Valvifera) from the SokhoBio expedition: First records from the abyss of the Sea of Okhotsk with description of *Neastacilla birsteini* sp. nov. // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 2018a. Vol. 154. P. 308–319.

Golovan O.A., Malyutina M.V., Brandt A. First record of the deep-sea isopod family Dendrotionidae (Isopoda: Asellota) from the Northwest Pacific with description of two new species of *Dendromunna* // *Mar. Biodiv.* 2018b. Vol. 48. P. 531–544.

Hessler R.R. The Desmosomatidae (Isopoda, Asellota) of the Gay Head-Bermuda transect // *Bull. Scrip. Inst. Oceanogr. Univ. California*. 1970. N 15. 63 P.

Jennings R.M., Golovan O., Brix S. Integrative species delimitation of desmosomatid and nannoniscid isopods from the Kuril-Kamchatka trench, with description of a hadal species // *Progr. Oceanogr.* 2019. 102236.

Kawabe M., Fujio S. Pacific ocean circulation based on observation // *J. Oceanogr.* 2010. Vol. 66. P. 389–403.

Lörz A.N., Kaiser S., Bowden D. Macrofaunal crustaceans in the benthic boundary layer from the shelf break to abyssal depths in the Ross Sea (Antarctica) // *Pol. Biol.* 2013. Vol. 36. P. 445–451.

Malyutina M.V. New data on pacific *Microcope* (Crustacea, Isopoda, Munnopsidae) with descriptions of two new species and redescription of *M. ovata* (Birstein, 1970) // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 2015. Vol. 111. P. 220–244.

Malyutina M., Brandt A. Diversity and zoogeography of Antarctic deep-sea Munnopsidae (Crustacea, Isopoda, Asellota) // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.* 2007. Vol. 54. P. 1790–1805.

Malyutina M.V., Brandt A. Introduction to SoJaBio (Sea of Japan Biodiversity Studies) // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.* 2013. Vol. 86–87. P. 1–9.

Malyutina M.V., Brandt A. Composition and distribution of Munnopsidae (Crustacea, Isopoda, Asellota), collected during the KuramBio expedition 2012 from the Kuril-Kamchatka Trench area // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.* 2015. Vol. 111. P. 245–255.

Malyutina M.V., Brandt A. First records of deep-sea Munnopsidae (Isopoda: Asellota) from the Kuril Basin of the Sea of Okhotsk, with description of *Gurjanopsis kurilensis* sp. nov. // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 2018. Vol. 154. P. 275–291.

Malyutina M.V., Chernyshev A.V., Brandt A. Introduction to the SokhoBio (Sea of Okhotsk Biodiversity Studies) expedition 2015 // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.* 2018a. Vol. 154. P. 1–9.

Malyutina M.V., Frutos I., Brandt A. Diversity and distribution of the deep-sea Atlantic Acanthocope (Crustacea, Isopoda, Munnopsidae), with description of two new species // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.* 2018b. Vol. 148. P. 130–150.

Malyutina M.V., Golovan O.A., Elsner N.O. Description of *Baeonectes brandtae* sp. nov. and redescription of *Eurycope spinifrons* Gurjanova, 1933 (Crustacea, Isopoda, Munnopsidae) from the deep-sea basin of the Sea of Japan // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 2013. Vol. 86–87. P. 79–102.

Malyutina M.V., Brandt A. Munnopsidae (Crustacea, Isopoda, Asellota) from the Kuril-Kamchatka Trench with a regional and inter-ocean comparison of their biogeographic and richness patterns // *Progr. Oceanogr.*, 2020. 102289

Meyer-Löbbecke A., Brandt A., Brix S. Diversity and abundance of deep-sea Isopoda along the Southern Polar Front: Results from the SYSTCO I and II expeditions // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.* 2014. Vol. 108. P. 76–84.

Oba T., Kato M., Kitazato H. et al. Paleoenvironmental Changes in the Japan Sea During the Last 85,000 Years // *Paleoceanography.* 1991. Vol. 6. P. 499–518.

Ramirez-Llodra E., Brandt A., Danovaro R., et al. Deep, diverse and definitely different: unique attributes of the world's largest ecosystem // *Biogeosci. Discuss.* 2010. Vol. 7. P. 2361–2485.

Raupach M.J., Mayer C., Malyutina M., Wägele J.W. Multiple origins of deep-sea Asellota (Crustacea: Isopoda) from shallow waters revealed by molecular data // *Proc. Roy. Soc. B: Biol. Sci.* 2009. Vol. 276. P. 799–808.

Riehl T., Golovan O.A., Malyutina M. V. Isopoda // *Biogeographic Atlas of the Deep NW Pacific Fauna*, in press.

Riehl T., Wilson G.D.F., Malyutina M.V. Urstylidae – a new family of abyssal isopods (Crustacea : Asellota) and its phylogenetic implications // *Zool. J. Lin. Soc.* 2014. Vol. 170. P. 245–296.

Svavarsson J., Brattegard T., Strömberg J.O. Distribution and diversity patterns of asellote isopods (Crustacea) in the deep Norwegian and Greenland Seas // *Progr. Oceanogr.* 1990. Vol. 24. P. 297–310.

Tyler P.A. Deep-sea eukaryote ecology of the semi-isolated basins off Japan // *J. Oceanogr.* 2002. Vol. 58. P. 333–341.

Wilson G.D.F. New insights into the colonization of the deep sea: Systematics and zoogeography of the Munnidae and the Pleurogoniidae comb. nov. (Isopoda; Janiroidea) // *J. Nat. Hist.* 1980. Vol. 14. P. 215–236.

Wilson G.D.F. Historical influences on deep-sea isopod diversity in the Atlantic Ocean // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.* 1998. Vol. 45. P. 279–301.

Wilson G.D.F. Local and regional species diversity of benthic Isopoda (Crustacea) in the deep Gulf of Mexico // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.* 2008. Vol. 55. P. 2634–2649.

Wolff T. Diversity and faunal composition of the deep-sea benthos // *Nature.* 1977. Vol. 267. P. 780–785.

Научное издание

**Жукова Наталья Владимировна,
Балакирев Евгений Станиславович,
Ефимова Ксения Владимировна и др.**

**ИССЛЕДОВАНИЯ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ
ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА: БИОРАЗНООБРАЗИЕ,
МОНИТОРИНГ И РАЦИОНАЛЬНОЕ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕСУРСОВ**

Монография

Подписано в печать 24.03.2020 г.
Формат 60×84 / 16. Усл. печ. л. 22,22.
Тираж 500 экз. (1-й завод 1–50). Заказ 106.

Дальневосточный федеральный университет
690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8

Отпечатано в Дальневосточном федеральном университете
690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8
(Типография Издательства ДВФУ,
690091, г. Владивосток, ул. Пушкинская, 10)