

На правах рукописи

МАЙОР ТАТЬЯНА ЮРЬЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИИ БАЙКАЛЬСКИХ
ЦИКЛОПОВ (СОРЕРОДА: СУСЛОРОИДА) НА ОСНОВЕ ЯДЕРНЫХ И
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск — 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент **Кирильчик Сергей Васильевич**

Официальные оппоненты:

Колбасов Григорий Александрович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», ведущий научный сотрудник Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова

Туранов Сергей Викторович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной систематики

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук

Защита состоится « 3 » апреля 2018 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу:
690001, Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423)2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук:
<http://wwwwimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/37-major-tatyana-yurevna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Ващенко

Ващенко Марина
Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Состав фауны циклопов в Байкале насчитывает 46 видов и подвигов, относящихся к 11 родам, двум подсемействам, одному семейству (Шевелева, 2012). В зоогеографическом отношении большая часть известных циклопов Байкала (64%) являются эндемиками. По числу эндемиков озера эта группа занимает четвертое место среди членистоногих, уступая равноногим ракам, амфиподам и остракодам (Тимошкин, 2001). Циклопы в Байкале занимают все экологические ниши: пелагиаль, абиссаль, супраабиссаль, сублитораль, литораль, зону заплеска литорали, есть виды, жизнь которых связана с обитанием на теле губок. Самыми массовыми из циклопов является эврибатные виды: *Cyclops kolensis* Lilljeborg, 1901, *Mesocyclops leuckarti* (Claus, 1857), *Thermocyclops crassus* (Fischer, 1853), обитающие в открытой пелагиали, в заливах, бухтах и сорах озера. Большая часть циклопов входят в экологическую группу бентосных организмов.

Г. Ф. Мазепова, описывая 16 новых видов и подвигов байкальских циклопов, отнесла их к роду *Acanthocyclops* Kiefer, 1927, указывая на наличие признаков переходного характера между двумя родами (*Acanthocyclops* / *Diacyclops* Kiefer, 1927) (Мазепова, 1978). В современной систематике (Dussart, Deffae, 2006) родовое название для большинства этих видов указано, как *Diacyclops*. Сложность комплекса *Acanthocyclops* / *Diacyclops* обусловлена их относительно древним возрастом и богатым видовым составом. Ряд ученых предполагает, что оба рода являются парафилитическими или полифилитическими (Stoch, 2001; Gallassi, 2004; Hołyńska, 2011).

Как отмечает Н. Г. Шевелева, большинство работ по байкальским циклопам посвящено описанию новых видов и лишь немногие - их экологии (Шевелева, 2012). В последнее время появились работы по изучению байкальских циклопов с помощью молекулярных методов. Часть из них посвящена оценке размеров геномов и проблеме диминуции хроматина у Cyclopoidea. Но в то же время эта сравнительно многочисленная группа организмов в Байкале остается еще малоизученной. Не решены вопросы, касающиеся родственных связей циклопов и истории происхождения их в озере.

Степень разработанности. Веслоногие ракообразные, к которым относятся циклопы, представляют собой самую многочисленную группу среди многоклеточных животных (Humes, 1994). В начале работы по теме диссертации было опубликовано всего несколько исследований митохондриальных и ядерных маркеров для разрешения филогенетических отношений в этой группе (Bucklin et al., 2003; Goetze, 2003; Huys et al., 2006). В настоящее время в базе данных GeneBank среди всех имеющихся нуклеотидных последовательностей для рода *Diacyclops*, 48% получено в данной работе. Филогенетические отношения эндемичных байкальских

циклопов были предположены ранее только на основании морфологических признаков (Мазепова, 1978).

Цель и задачи. Цель работы - изучение особенностей эволюции и филогении видов циклопов, населяющих озеро Байкал; анализ соответствий современной систематики и молекулярной филогении эндемичных байкальских видов родов *Acanthocyclops* / *Diacyclops*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК для двух наиболее популярных молекулярных маркеров - фрагментов генов первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*) митохондриального генома и гена *18S* рибосомной РНК ядерного генома.
2. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей, оценка межвидового и межродового полиморфизма выбранных эволюционных маркеров и построение филогенетических схем.
3. Сравнение топологий филогенетических схем с современной систематикой байкальских циклопов.
4. Оценка возраста исследуемых видов с помощью молекулярных часов.
5. Разработка и оптимизация метода относительной оценки размера диминуции хроматина с помощью ПЦР с оценкой результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ).
6. Оценка эволюционной согласованности изменения размера диминуции хроматина и филогении циклопов.

Научная новизна работы. Впервые были получены молекулярно-генетические данные для эндемичных циклопов из оз. Байкал. Проведена предварительная реконструкция филогенетических взаимоотношений между представителями 6 родов из 2 подсемейств Cyclopoidea и Eucyclopoidea, обитающих в Байкале и его водосборном бассейне. Определены нуклеотидные последовательности ДНК фрагментов генов *COI* и *18S* рРНК, проведен филогенетический анализ и оценка возраста для 12 видов из сложного в таксономическом определении комплекса *Acanthocyclops* / *Diacyclops*. Заложены основы для дальнейшего изучения молекулярной филогении циклопов. Пригодность используемых маркеров для филогенетических реконструкций оценена на разных таксономических уровнях. Выявлена проблема в таксономическом определении байкальских циклопов. Предложен новый молекулярно-генетический метод относительной оценки изменений размера генома у циклопов с использованием ПЦР-РВ. Метод апробирован на 4 видах циклопов. Впервые обнаружена ДХ у *Megacyclops viridis* (Jurine, 1820).

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационной работы расширяют представление о филогенетических отношениях байкальских циклопов и истории их происхождения. В базу данных генетических последовательностей GeneBank депонировано 45 рДНК и 56 мтДНК нуклеотидных последовательностей. Новый метод оценки

относительного размера генома с использованием ПЦР-РВ позволит интенсифицировать исследования процессов диминуции хроматина у циклопов.

Методология и методы исследования. В качестве эволюционных генетических маркеров в исследовании были выбраны фрагменты ДНК с разными темпами эволюции, позволяющие сравнивать таксоны циклопов на уровнях от вида до подсемейства. В работе применяли следующие молекулярно-генетические методы: амплификация целевых фрагментов ДНК с помощью ПЦР, клонирование и секвенирование ДНК. К полученным молекулярным данным применяли филогенетические методы: метод генетических расстояний и метод анализа дискретных признаков с помощью популярных филогенетических программ. Молекулярные часы использовали, как метод эволюционного датирования. Предложен новый метод оценки относительного размера геномов с использованием ПЦР-РВ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выявлены две филогенетические группы, по морфологическим признакам сходные с тремя эндемичными байкальскими видами *D. versutus* (Mazepova, 1961), *D. improcerus* (Mazepova, 1950) и *D. galbinus* (Mazepova, 1961).

2. Молекулярные данные показали, что род *Acanthocyclops* является полифилетическим.

3. Метод оценки относительного размера генома с помощью ПЦР-РВ является простым, быстрым и эффективным и может использоваться для изучения молекулярной эволюции циклопов, в частности диминуции хроматина.

4. Изменение размера диминуции хроматина эволюционно не согласовано с филогенией циклопов у изученных видов.

Степень достоверности результатов. О достоверности полученных результатов свидетельствует использование современных молекулярных методов исследования и разных подходов филогенетических реконструкций, с использованием статистических оценок полученных филогенетических деревьев, повторяемость результатов и публикации результатов работы в рецензируемом журнале. Обсуждение и интерпретация результатов базируется на экспериментальных данных, приведенных в диссертации в виде рисунков и таблиц. Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации – протоколам исследований.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на X международной конференции по веслоногим ракообразным (Таиланд, 2008), симпозиуме памяти Г. А. Левитского «Хромосомы и эволюция» (Санкт-Петербург, 2008), XII международной конференции по веслоногим ракообразным (Корея, 2014), IV всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Улан-Удэ, 2016).

Публикации. По результатам исследования опубликовано 7 научных работ: 3 – статьи в рецензируемом издании, рекомендованном действующим списком ВАК, 4 – тезисы научных конференций.

Реализация и внедрение результатов исследования. Теоретические положения и результаты исследования использованы при подготовке научных отчетов по междисциплинарным интеграционным проектам фундаментальных исследований СО РАН № 45, 51, по гранту Президиума СО РАН № 37 и по проекту «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии на примере рыб, губок и ассоциированной с ними микрофлоры» (VI.50.1.4. № 0345-2014-0002).

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследований автора, выполненным согласно планам исследовательских работ в группе эволюционной генетики лаборатории ихтиологии ЛИН СО РАН. Автор непосредственно участвовал в экспедиционных и экспериментальных работах; в анализе и интерпретации полученных результатов; в написании научных публикаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 107 страницах, содержит 8 таблиц, 16 рисунков, 3 приложения. Список литературы включает 201 источников, из которых 24 на русском языке и 177 на иностранных языках.

Благодарности. Выражаю искреннюю признательность научному руководителю к.б.н., доценту Сергею Васильевичу Кирильчику. Благодарю акад. РАН И. Ф. Жимулева, акад. НАН Украины В. И. Монченко, д.б.н. О. А. Тимошкина, Ю. А. Галимову, Е. А. Иванкину, к.б.н. В. И. Тетерину, И. В. Ханаева, Е. П. Терезу, к.б.н. Л. В. Самчишину, И. Ю. Зайдыкова, Т. В. Станиславчик за неоценимую помощь в организации работы и консультации. Выражаю особую благодарность к.б.н. Л. В. Сухановой за обучение молекулярным методам, внимательное отношение и консультации в работе; к.б.н. Н. Г. Шевелевой за помощь в сборе материалов, консультации, измерение и таксономическое определение циклопов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Приведены краткая характеристика отряда веслоногих ракообразных, видовой состав и экология циклопов в озере Байкал. Рассмотрены таксономические проблемы комплекса «*Diacyclops / Acanthocyclops*» и микроэволюционные процессы у веслоногих ракообразных, в том числе криптическое видообразование. Составлен обзор современных методов филогенетического анализа и молекулярных часов. Для исследуемой группы организмов проанализированы популярные эволюционные маркеры и

особенности эволюционного датирования. Отдельное внимание уделено процессам диминуции хроматина и методам оценки размеров геномов у *Copepoda*.

Глава 2. Материалы и методы

Оптимизацию условий эксперимента проводили на циклопах *Cyclops kolensis* Lilljeborg, 1901 и *Cyclops insignis* Claus, 1857, в большом количестве собранных в Андреевских прудах на Воробьевых горах (г. Москва) и любезно предоставленных Е. А. Иванкиной (ИМКБ СО РАН). Циклопы из оз. Байкал и малых озер на берегу Байкала были собраны аквалангистами или с помощью сети Джеди и сачка Апштейна с глубин до 40 м и 7 м соответственно в 2008 - 2011 гг. (Рисунок 1). Часть видов собрана в 2008 – 2013 гг. вне оз. Байкал: *C. kolensis* - оз. Тельбин (г. Киев), *M. viridis* и *A. vernalis* - Бельские озера (Иркутская обл.), *C. ochridanus* Kiefer, 1932 собран Gorica-Radozda из оз. Охрид (Македония) и любезно предоставлен О. А. Тимошкиным (ЛИН СО РАН).

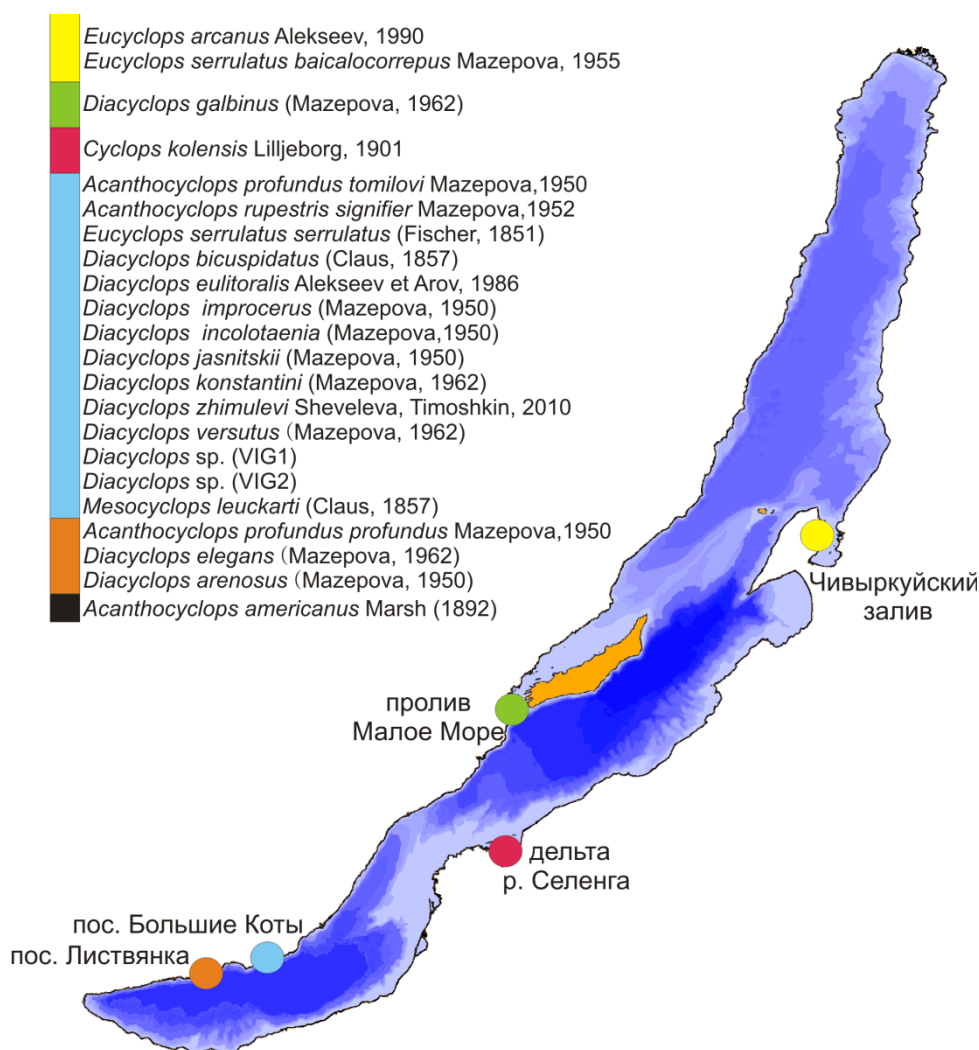


Рисунок 1. Приблизительные места сбора циклопов в оз. Байкал, для которых получены молекулярные данные. *A. americanus* выловлен в оз. Байкал, без указания определенного места сбора в озере.

Таксономическое определение и измерение циклопов проводилось к.б.н., с.н.с. лаборатории биологии водных беспозвоночных ЛИН СО РАН Н. Г. Шевелевой. Самок циклопов с яйцевыми мешками фиксировали в 96% этаноле. Суммарную ДНК выделяли из яйцевых мешков, что позволило сохранить циклопов в коллекции. Суммарную ДНК выделяли с помощью комплекта «РИБО-сорб» (AmpliSens) вариант 100 для выделения РНК / ДНК согласно инструкции производителя. Также использовали лизат яйцевых мешков в буфере для ПЦР с помощью протеиназы К для последующей амплификации целевых фрагментов. Амплификацию фрагментов гена *COI* проводили с праймерами: LCO-1490, HCO-2198 (Folmer, 1994); L1384, H2612 (Machida, 2004) и LCO-142 (5'-CCGGGATCTCTAATAGGGGACGACC-3'), HCO-1156 (5'-AGCGAACACCGCCCTATTCT-3'). Фрагмент гена *18S* рРНК получали в ходе «гнездовой» ПЦР с праймерами 18Sf, 18Sr и 554f, 1282r (Huys, 2006). Разделение и очистку ампликонов проводили с помощью геля – электрофореза. Кусочки геля, содержащие ампликоны, замораживали при -20°C, оттаивали и центрифугировали. Полученный элюат использовали в реакции секвенирования или клонирования. Фрагмент *18S* рРНК клонировали с использованием системы pGEM-T Easy Vector (Promega). Компетентные клетки *Escherichia coli* готовили согласно стандартному протоколу (Inoue, 1990). Трансформацию осуществляли методом электропорации с помощью ячеек Bio-Rad соответственно инструкции к прибору и методом теплового шока, согласно протоколу производителя системы клонирования (Promega). Разделение и визуализацию фрагментов проводили в однокапиллярном анализаторе ДНК ABI310A (Applied Biosystems) в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН, г. Новосибирск и в восьмиккапиллярном анализаторе SEQ8800 (Beckman Coulter). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили, используя программы ClustalW, вложенную в программу MEGA 3.1, 6 (Kumar et al., 2001; Tamura, 2013) и CLC Sequence Viewer 7.5 (CLC, 2015). Полимофизм ДНК оценивали в программе DnaSP 5.10.01 (Rozas, 2003). Выбор эволюционной модели, подсчет генетических расстояний, построение филогенетических схем, молекулярное датирование проводили в программах Mega 6 и MrBayes 3.1.2, 3.2.6 (Ronquist, 2003; Ronquist et al., 2012).

Молекулярно-генетический метод относительной оценки изменений размера генома с использованием ПЦР-РВ. В работе предложен и апробирован на байкальских циклопах новый быстрый и простой метод оценки степени диминуции хроматина (ДХ). Метод основан на предположении, что в процессе ДХ количество копий генов-мишеней в клетках зародышевого пути и соматических клетках остается одинаковым. При уменьшении размера генома вследствие ДХ, концентрация копий этих генов должна возрасти пропорционально степени диминуции, снижая значения C_t в ПЦР-РВ. В качестве додиминуционный материала (ESD-) использовали яйцевые мешки

циклопов с зародышами на стадии 2 - 8 клеток. Постдиминуционный материал составили яйцевые мешки с зародышами на более поздних стадиях (ESD+) и соматические ткани взрослых особей циклопов (BD+). В качестве геномишеней использовались гены «домашнего хозяйства» бета актина (*Actb*) и фактора элонгации трансляции EF-1альфа (*EF-1α*). Схема эксперимента состояла из следующих основных этапов: 1) определение и выравнивание концентраций растворов ДНК из ESD+, BD+ и ESD-; 2) приготовление набора стандартов с серией четырехкратных разведений 4x4; 3) постановка ПЦР-РВ с пробами ДНК ESD+, BD+, ESD- и набором стандартов в одном запуске; 4) определение размера диминуций (%) осуществлялось с использованием калибровочной кривой и формулы $CD = \Delta Ct / (CtD+) \times 100$, где $\Delta Ct = (CtD-) - (CtD+)$, (CtD-) и (CtD+) - значения Ct для (ESD-) и (ESD+, BD+), соответственно.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Разнообразие нуклеотидных последовательностей. В ходе исследования получены 56 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *COI* мтДНК (584 - 1168 п.н.) для циклопов. Нуклеотидные последовательности MF150247 - MF150250 *C. abyssorum* Sars, 1863, *C. kolensis* из Богучанского водохранилища (Иркутская обл.), любезно предоставлены сотрудником лаб. ихтиологии ЛИН СО РАН И. Ю. Зайдыковым. Также в анализ включены нуклеотидные последовательности циклопов, позаимствованные в банке данных GeneBank.

В полученном наборе нуклеотидных последовательностей «фолмеровского» фрагмента гена *COI* выявлен эффект насыщения синонимичных замен. Для увеличения количества филогенетически информативных позиций был расширен анализируемый фрагмент *COI* до 1228 п. н. Использование данного гена в нашей работе оправдано возможностью включить в анализ имеющиеся в банке данных нуклеотидные последовательности циклопов и наличием калибровок молекулярных часок по этому гену. Все анализируемые байкальские виды являются эндемиками озера за исключением *A. americanus* и *C. kolensis*. Для каждого вида определены нуклеотидные последовательности для 1 - 12 особей. При выравнивании нуклеотидных последовательностей протяженного фрагмента гена *COI* общий фрагмент, исключая недостающие данные, для представителей рода *Acanthocyclops* составил 579 оснований (163 филогенетически информативные позиции), для представителей рода *Diacyclops* – 886 оснований (265 филогенетически информативных позиций).

Дивергенция последовательностей *COI*, рассчитанная модифицированным методом Нея и Годжобори (Nei-Gojobori) с учетом несинонимичных замен, внутри видов составила 0,000 – 0,006; между видами одного рода 0,007 – 0,053. Самое высокое значение (0,053) соответствует дивергенции последовательностей *A. americanus* с байкальскими эндемичными

представителями рода *Acanthocyclops*. Значение дивергенции нуклеотидных последовательностей между *A. americanus* и эндемичными видами рода *Diacyclops* меньше и составляет 0,015 – 0,023.

Отсутствие различий между последовательностями COI некоторых особей, относящихся к разным эндемичным байкальским видам, повлекло их повторное более подробное таксономическое определение. В результате 8 особей не было возможным достоверно определить до вида, они были в дальнейшем обозначены, как *Diacyclops* sp. и составили группу VIG (Таблица 1).

Нуклеотидные последовательности фрагмента гена *18S* рРНК получены для 45 представителей 13 видов и 1 подвида циклопов. Среди проанализированных циклопов 5 видов и 1 подвид – эндемики Байкала. Для каждого вида определены нуклеотидные последовательности ДНК для 1 - 4 особей. Длина полученных последовательностей гена *18S* рРНК варьировала в пределах 658 - 713 п. н.

Таблица 1. Таксономическое определение циклопов на разных этапах исследования

Номер нуклеотидной последовательности в банке данных GeneBank	Таксономическое определение циклопов до молекулярного анализа	Таксономическое определение циклопов после молекулярного анализа
KT075078	<i>D. jasnitiskii</i>	<i>D. incolotaenia</i>
KT075062	<i>D. galbinus</i>	<i>D. sp. (VIG) *</i>
KT075064	<i>D. improcerus</i>	<i>D. sp. (VIG)</i>
KT075063	<i>D. improcerus</i>	<i>D. sp. (VIG)</i>
KT075065	<i>D. improcerus</i>	<i>D. sp. (VIG)</i>
KT075067	<i>D. versutus</i>	<i>D. sp. (VIG)</i>
KT075068	<i>D. improcerus</i>	<i>D. sp. (VIG)</i>
KT075069	<i>D. versutus</i>	<i>D. sp. (VIG)</i>
KT075070	<i>D. improcerus</i>	<i>D. sp. (VIG)</i>

* VIG группа из трех видов: *D. versutus*, *D. improcerus*, *D. galbinus*.

При выравнивании последовательностей общий фрагмент, исключаящий недостающие данные, составил 630 оснований (62 позиции филогенетически информативные). Генетические расстояния между особями одного вида,

рассчитанные методом K2P составили 0,000 – 0,014. Самые большие генетические расстояния были между нуклеотидными последовательности ДНК особей *D. bicuspidatus* (0,014). Если не учитывать этот вид, то среднее значение генетических расстояний на внутривидовом уровне по данному фрагменту составило 0,002. Межвидовые генетические расстояния, рассчитанные тем же методом, внутри родов варьировали в пределах 0,004 – 0,009, между родами - 0,022 – 0,079. Наиболее близкими между собой являются нуклеотидные последовательности ДНК представителей родов *Diacyclops* и *Cyclops* (0,023), *Eucyclops* и *Macrocyclops* (0,024) и *Thermocyclops* и *Mesocyclops* (0,032). Таким образом, анализируемый фрагмент гена *18S* рРНК, напротив, показывает медленную скорость накопления нуклеотидных замен и пригоден для сравнения далеких таксонов исследуемой группы.

Филогения циклопов. На Рисунках 2, 3 приведены NJ и BI филогенетические деревья для представителей двух родов *Diacyclops* и *Acanthocyclops* на основе полученных нуклеотидных последовательностей расширенного фрагмента *COI*. При построении филогенетических древ отдельно для каждого рода устойчивость основных ветвей была выше (Рисунок 4).

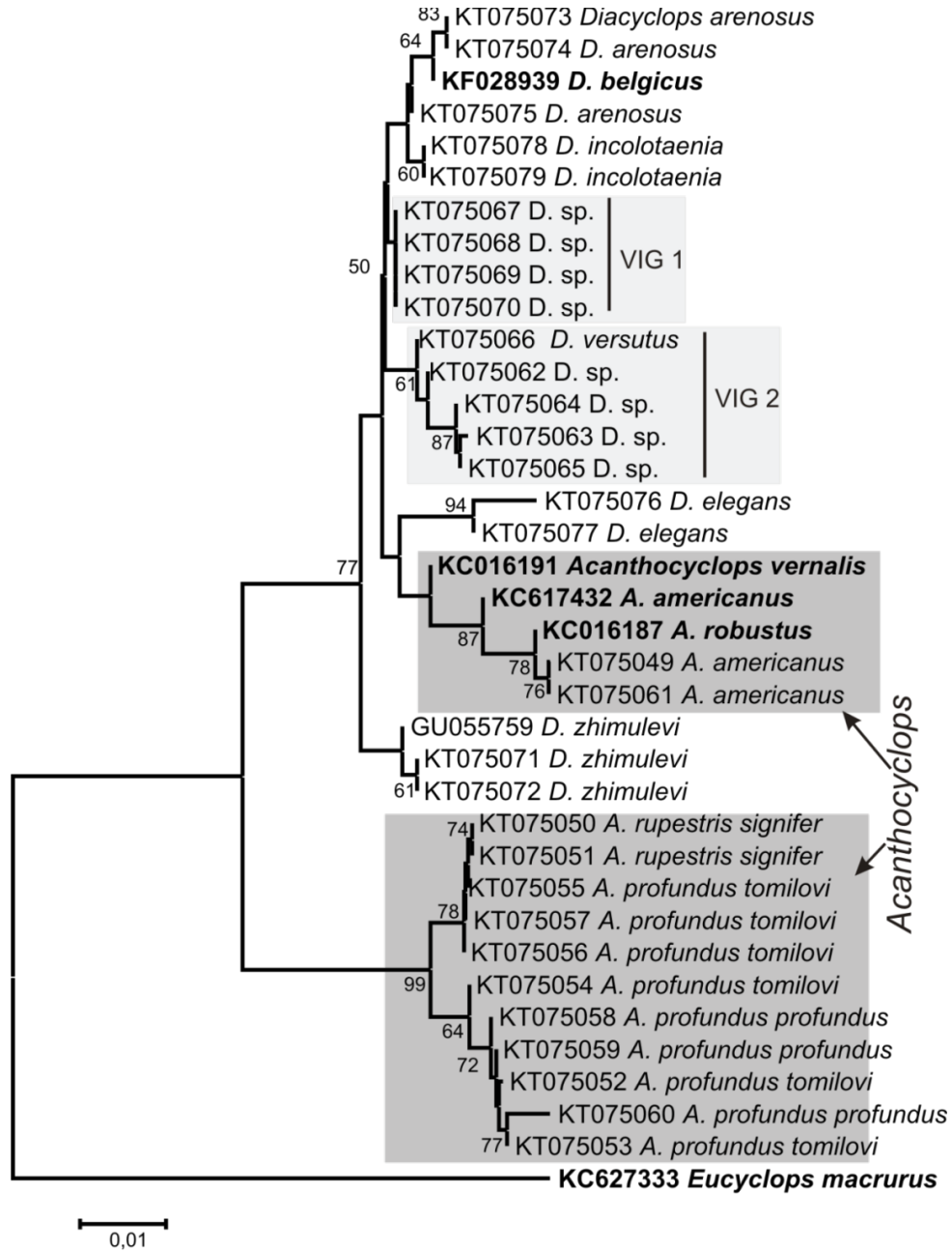


Рисунок 2. Филогенетическое дерево (NJ), построенное на основе аминокислотных последовательностей *COI*. Число в узле - значение бут-стреп поддержки узла ветвления. Перед видовым названием указан инвентарный номер в GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, позаимствованные из банка данных GenBank.

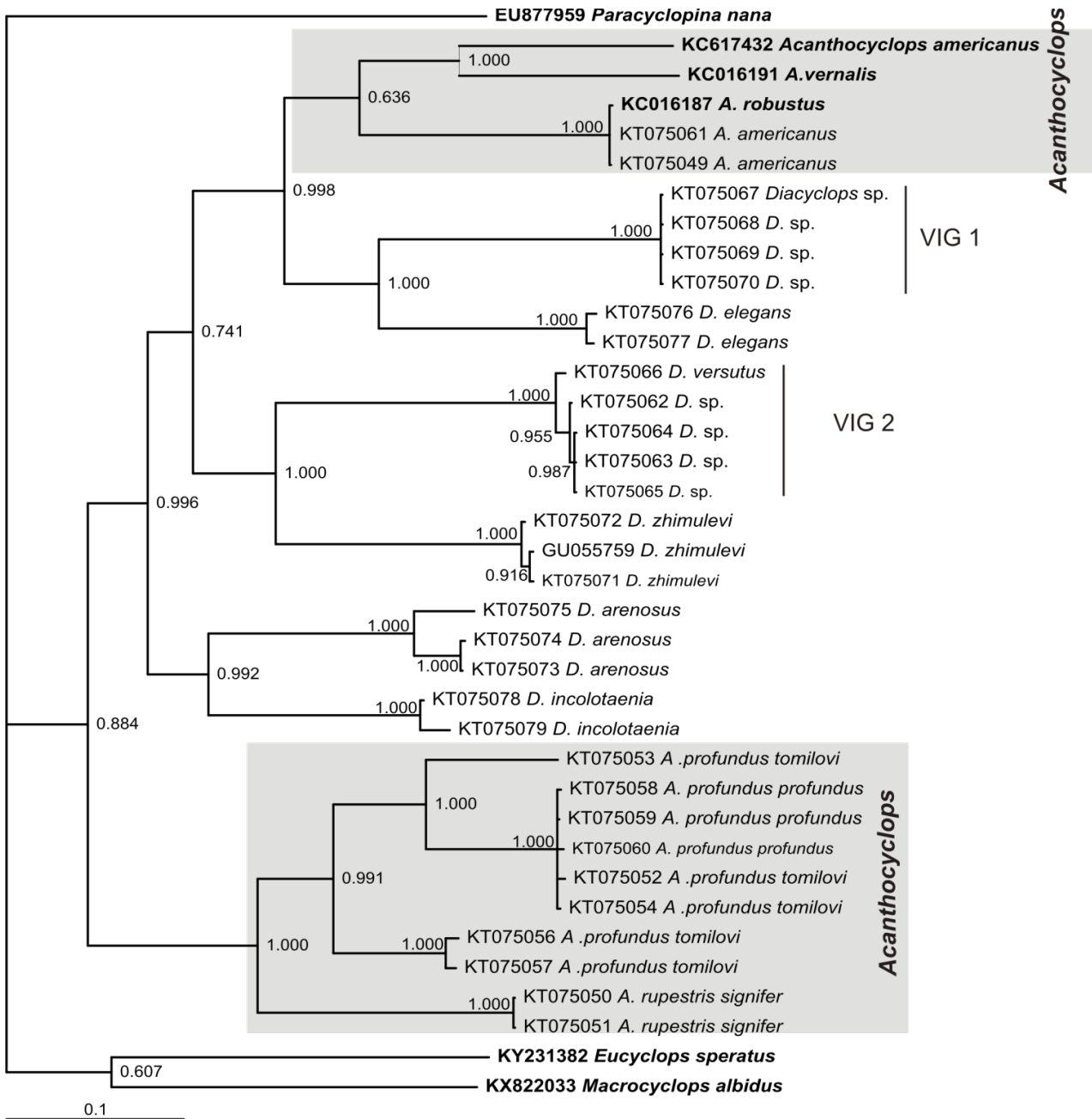


Рисунок 3. Филогенетическое дерево (BI, с учетом 1, 2 позиций кодона), построенное на основе нуклеотидных последовательностей *COI*. Число в узле – апостериорная вероятность. Перед видовым названием указан инвентарный номер в GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, позаимствованные из банка данных GenBank.

На полученных деревьях (NJ, BI, ML) есть два больших кластера. Первый составляют представители рода *Diacyclops* и три близких вида рода *Acanthocyclops*, а второй - эндемичные байкальские представители рода *Acanthocyclops*. Полученные топологии филогенетических деревьев подтверждают предположение о полифилетичности рода *Acanthocyclops*, сделанное на основе анализа морфологических признаков (Stoch, 2011;

Но́у́ńska, 2011). Также на всех филогенетических деревьях нуклеотидные последовательности особей, относящихся к группе VIG, по морфологическим признакам близких к *D. versutus*, *D. improcerus*, *D. galbinus*, образуют два кластера, обозначенные VIG 1 и VIG 2. Появление филогенетических групп с неясным таксономическим статусом можно объяснить недостаточно полным описанием байкальских циклопов; наличием криптического или псевдокриптического видообразования или митохондриальной интрогрессией в группе видов *D. versutus* / *D. improcerus* / *D. galbinus*, описываемой и у других групп организмов (McGuire, 2007; Husley, 2013; Darras, 2015).

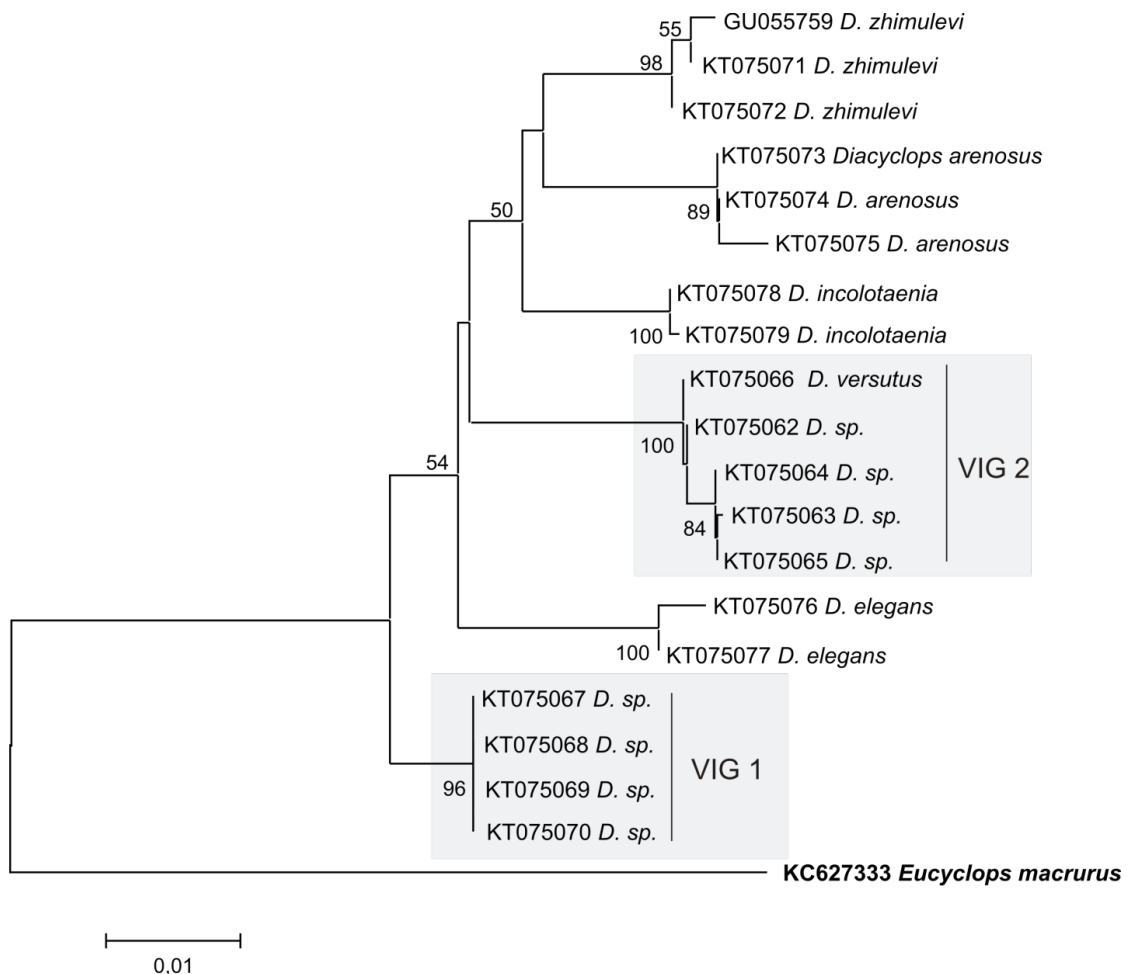


Рисунок 4. Филогенетическое дерево (NJ, с учетом 1, 2 позиций кодона), построенное нуклеотидных последовательностей *COI* для представителей рода *Diacyclops*. Число в узле - значение бут-стреп поддержки узла ветвления. Перед видовым названием указан инвентарный номер в GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, позаимствованные из банка данных GenBank.

Феномен видообразования с появлением новых форм морфологически идентичных или с небольшими морфологическими отличиями отражен в исследованиях по биоразнообразию веслоногих ракообразных (Lee, 2000; Goetze, 2003, Thum, Harrison, 2009).

Две особи байкальских циклопов, для которых получены нуклеотидные последовательности *COI* (KT075049, KT075061), по морфологии и биометрическим измерениям отнесены к *A. americanus* (Marsh, 1892): закругленный в верхней части генитальный сегмент; фуркальный индекс 5; латеральная щетинка почти в 2 раза короче внешней апикальной щетинки (37,5 мкм: 72,5 мкм соответственно); удлинённый (длина 220 мкм, ширина 200 мкм) генитальный сегмент; внутренний апикальный шип endP4 длиннее внешнего апикального (77,5 и 72, 5 мкм соответственно). На филогенетических деревьях, построенных разными методами, полученные нуклеотидные последовательности KT075049, KT075061 с высокой статистической достоверностью объединились с таковой *A. robustus* (Sars, 1892), взятой из GeneBank (KC016187) (Рисунок 2, 3). Для разрешения неопределенной ситуации с таксономическим определением байкальских циклопов из группы *A. americanus*, *A. robustus*, *A. vernalis* требуется дальнейшее изучение их детальной морфологии и молекулярных маркеров ядерной ДНК.

На филогенетическом древе для рода *Cyclops* байкальский вид *C. kolensis* вошел в кластер с видами *C. insignis* и *C. abyssorum* (Рисунок 5).

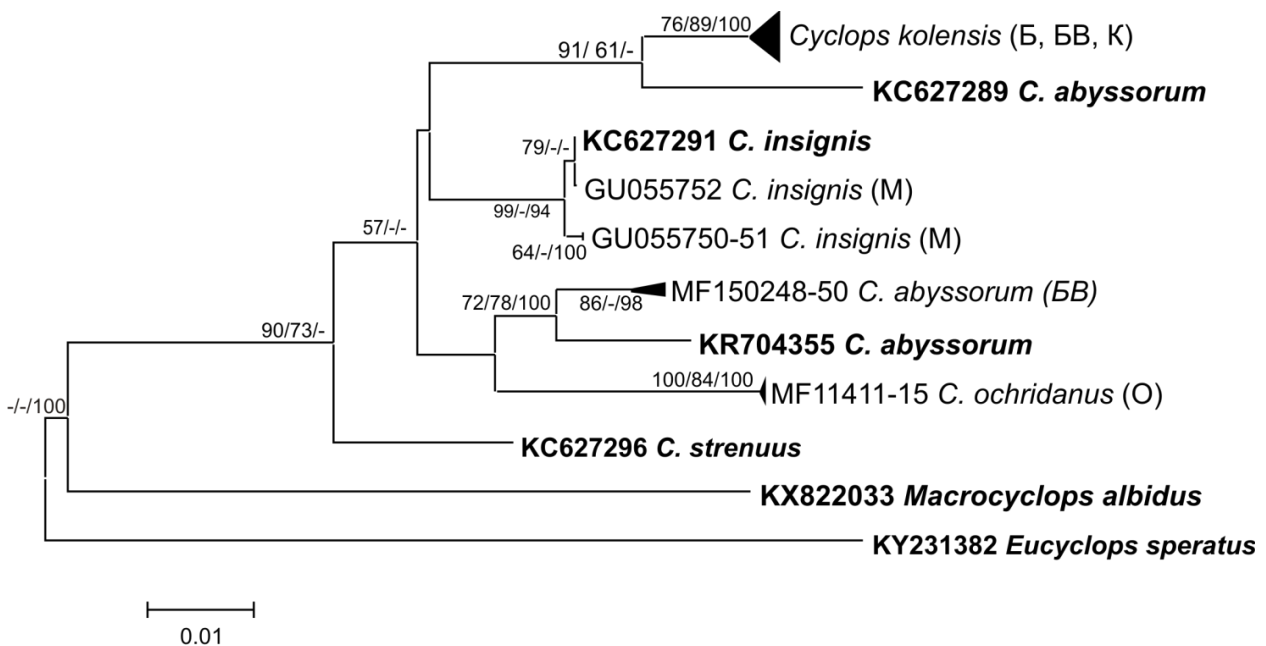


Рисунок 5. Филогенетическое древо (NJ, с учетом 1, 2 позиций кодона). Перед видовым названием указан инвентарный номер в GenBank. Для *C. kolensis* эти номера следующие: GU055749, GU055753-54, MF150241-47, MF150251-52. Число в узле - значение бут-стреп поддержек > 50% узла ветвления NJ древа / ML древа / апостериорной вероятности BI древа в процентах. Б – оз. Байкал, БВ – Богучанское водохранилище, Иркутская обл., М – Андреевские пруды на Воробьевых горах, г. Москва, К – оз. Тельбин, г. Киев, О – оз. Охрид, Македония. Жирным шрифтом выделены последовательности, позаимствованные из банка данных GeneBank.

На Рисунке 6 изображено филогенетическое древо, построенное для *C. kolensis*. Представители этого вида из оз. Байкал и Богучанского водохранилища (Иркутская обл.) формируют отдельный кластер (клада 2) и показывают генетическую обособленность от представителей этого вида из отдаленных частей ареала (клада 1).

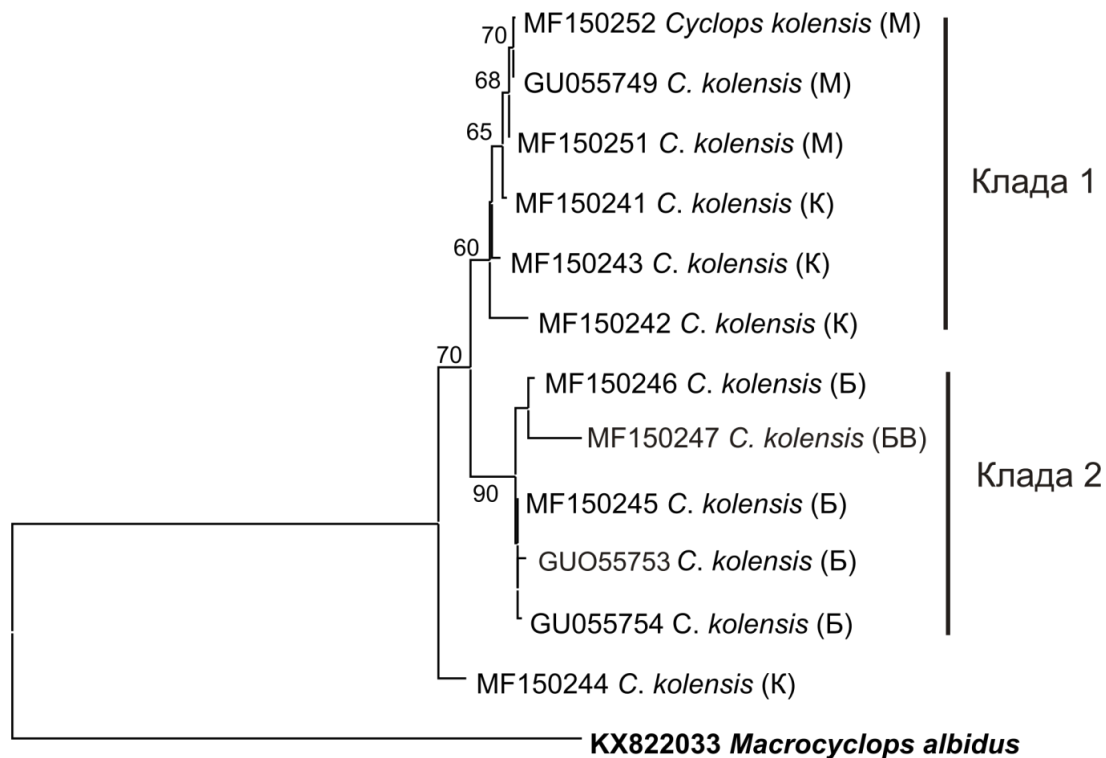


Рисунок 6. Филогенетическое древо (NJ, с учетом 1, 2, 3 позиций кодона), построенное на основе последовательностей фрагмента гена *COI*. Число в узле - значение бут-стреп поддержки узла ветвления. Б – оз. Байкал, ББ – Богучанское водохранилище, Иркутская обл., М – Андреевские пруды на Воробьевых горах, г. Москва, К – оз. Тельбин, г. Киев. Жирным шрифтом выделена последовательность, позаимствованная из банка данных GeneBank.

Топологии древ (NJ, MP, ML), полученные на основе нуклеотидных последовательностей *18S* рРНК были идентичны для всех статистически достоверных узлов. Байкальские представители рода *Diacyclops* образуют монофилетичную группу, что свидетельствует об их происхождении от общей предковой формы (Рисунок 7).

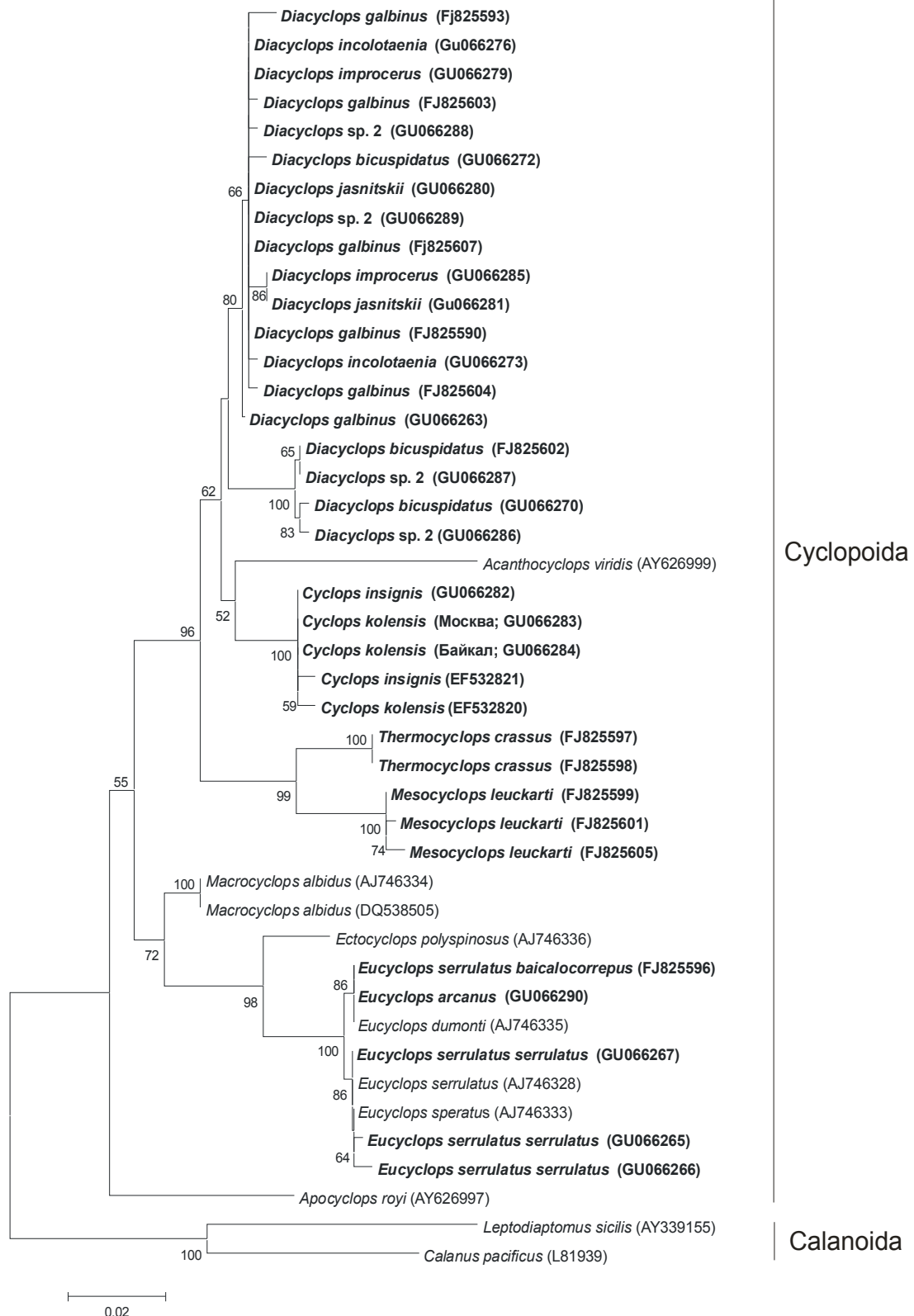


Рисунок 7. Филогенетическая схема (NJ - древо), построенная на основе последовательностей фрагмента гена *18S* рРНК. Число в узлах - значение бутстреп поддержки узла ветвления. Число в скобках после видового названия - номер доступа в GenBank. Название в скобках - место сбора. Жирным шрифтом выделены виды, для которых определены нуклеотидные последовательности в данной работе.

В отдельный кластер выделились представители родов *Thermocyclops* и *Mesocyclops*. Палеарктический вид *Eucyclops arcanus* Alekseev, 1990 и подвиды *Eucyclops serrulatus serrulatus* (Fischer, 1851), *Eucyclops serrulatus baicalocorrepus* Mazerova, 1955 вошли в группу с представителями этого же рода, чьи последовательности получены из GenBank.

Оценка возраста исследуемых видов. Сравнение предельных вероятностей двух моделей (не строгие часы и строгие молекулярные часы) в наборе данных по фрагменту *COI* для родов *Acanthocyclops*, *Diacyclops*, *Cyclops* в программе MrBayes показало преимущество модели строгих молекулярных часов. Возраст группы эндемичных видов родов *Diacyclops* / *Acanthocyclops* оценен в 20 млн л. Время расхождения голарктического вида *C. kolensis* от общего предка с видами *E. speratus* и *M. albidus* - 9 млн л. н. Данные оценки относятся к раннему и среднему Миоцену (23,8 – 5,3 млн л.) и являются приблизительными по причине малого количества палеонтологической информации для *Copepoda* и соответственно специфических калибровок скорости накопления замен (Gressey, 1973; Huys, 1991). В геологической истории Байкальской впадины 20 и 8 млн л. н. соответствует протобайкальскому этапу (30 – 3,5 млн л. н.). В это время происходило общее похолодание, поднятие окружающих пространств и углубление (до 400 - 500 м) озерных бассейнов, инициировавшее зоогеографическую изоляцию Байкальской впадины и формирование эндемичного байкальского комплекса гидробионтов (Мац и др., 2011). Вычисленный возраст байкальских циклопов не противоречит имеющейся палеонтологической информации для *Copepoda*. Среди ископаемых остатков, относящихся к среднему и позднему Миоцену, найдены циклопы рода *Acanthocyclops* (Wilkinson et al., 2010, Hołyńska et al., 2016). Известные молекулярным датировки для рода *Acanthocyclops* близки к нашим оценкам для байкальских представителей *Diacyclops* / *Acanthocyclops*. Возраст расхождения *Acanthocyclops vernalis*, *A. trajani* Mirabdullayev & Defaye, 2004 и *A. einslei* Mirabdullayev & Defaye, 2004 оценено в 10 - 15 млн л. н. (Blaħa et al., 2010). В другой работе посчитано время дивергенции *A. vernalis*, *A. americanus*, *A. robustus* - 10 – 14 млн л. н. (Miracle et al., 2013). В исследовании европейских видов рода *Cyclops* авторы относят время дивергенции анализируемых видов (в том числе *C. kolensis*) к среднему и позднему Миоцену (Krajicek et al., 2017), что также согласуется с нашей эволюционной оценкой для представителей *C. kolensis*.

Метод относительной оценки изменений размера генома с использованием ПЦР - РВ. Как показали результаты тестов, кривые флуоресценции для образцов ESD+ и BD+ демонстрируют очень близкие показатели Ct (Рисунок 8, Таблица 2). При этом между (ESD-) и (ESD+, BD+) для всех исследуемых видов циклопов прослеживаются значительные различия. Это свидетельствует о наличии ДХ во всех исследуемых видах.

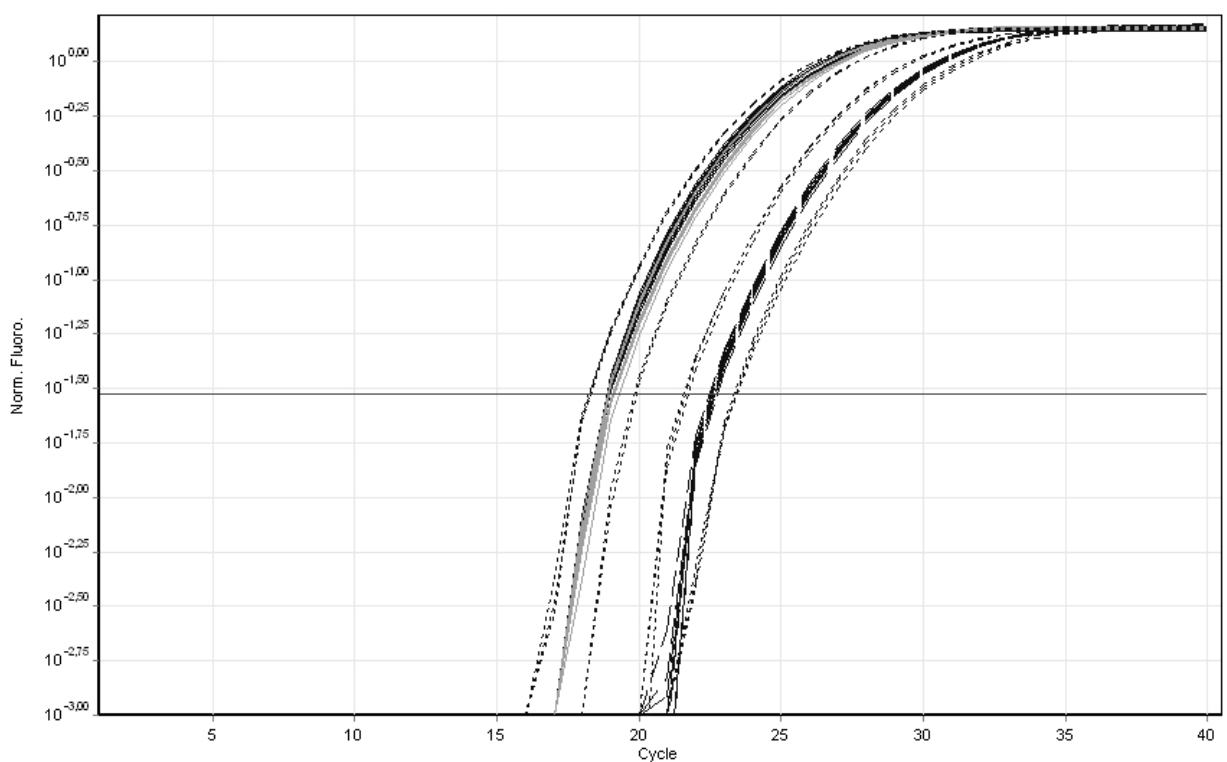


Рисунок 8. Результаты ПЦР-РВ фрагмента *Actb* образцов *A. vernalis*. Короткие пунктирные линии - 4x4 стандарт; сплошные линии - ESD+ (черные) и BD+ (серые) (по 3 образца, по 3 повтора каждого); длинные пунктирные линии - ESD- (4 образца по 3 повтора).

Таблица 2. Результаты анализа изменений размера генома в онтогенезе циклопов с помощью ПЦР-РВ

Вид	Размер ДХ (%)	Калибровочные кривые	
		Slope (M)	Коэффициент корреляции (R ²)
<i>C. kolensis</i>	95,3 ± 1,2	-3,31	0,999
<i>M. viridis</i>	91,1 ± 2,6	-3,24	0,999
<i>A. vernalis</i>	94,6 ± 0,8	-3,04	0,999
<i>C. insignis</i>	82,3 ± 5,2	-3,04	0,995

Предложенный нами подход прост и, в сравнении с методом Вильгельма с соавт. (Wilhelm et al., 2003), имеет дополнительный критерий оценки достоверности результатов, связанный с процедурой выравнивания концентраций ДНК. Проведенные нами эксперименты показали, что при несоблюдении некоторых рекомендаций пробоподготовки можно получить

значительные расхождения в показателях C_t в пределах как пост- (D+), так и додимиционного (D-) материала. Использование нормализации по концентрации ДНК позволяет оценить величину таких расхождений. Еще одна особенность предложенного нами подхода состоит в том, что единственным критерием выбора гена - мишени является присутствие одинакового количества копий гена в клетках D+ и D-. В качестве таких мишеней могут быть выбраны многокопийные гены, что увеличит чувствительность ПЦР. Для получения корректных данных необходимо: i) выделение и определение концентрации ДНК для всех проб D+ и D- проводить одновременно, с использованием одних и тех же смесей реагентов и процедур; ii) экстракцию ДНК необходимо проводить с помощью наборов, предназначенных для работы с малым количеством ДНК; iii) концентрация ДНК должна определяться флуорометрически; iv) не допускается длительное хранение или замораживание экстрактов ДНК.

Предложенный нами метод показал сходные результаты с известными данными по *C. kolensis* - одному из наиболее изученных видов в отношении ДХ среди циклопов. Оценки степени ДХ, полученные цитофотометрическими методами, для московской популяции этого вида варьируют от 94% (Гришанин, 2006; Семешин, 2011) до 98% (Wyngaard, 2011). Цитологические исследования байкальской популяции *C. kolensis*, показали, что в процессе ДХ теряется более 96% генетического материала (Гришанин, 2006; Семешин, 2011). Сходность литературных данных с нашими результатами подтверждает корректность последних, а также свидетельствует о правомерности использования ПЦР-РВ для исследования ДХ. *Megacyclops viridis* является малоизученным видом в отношении ДХ и ранее у данного вида она обнаружена не была. Цитологическими методами была исследована только популяция из Германии, у которой количество хромосом и ДНК в соматических клетках и клетках эмбриона на стадии 6-го деления было равным (Grishanin, 2004). У популяции исследованной нами с помощью молекулярно-генетических методов, ДХ составила около 91%.

На Рисунке 9 показаны филогенетические взаимоотношения нескольких видов циклопов в сочетании с полученными в нашей работе значениями ДХ для трех видов из этой группы. Отсутствие вектора изменения в количестве ДХ в соответствие с топологией дерева, говорит об эволюционной несогласованности между изменением количества элиминируемого хроматина и филогенией циклопов, что расширяет понимание биологической роли ДХ. Таким образом, результаты исследований показывают возможность применения метода ПЦР-РВ для оценки степени ДХ.

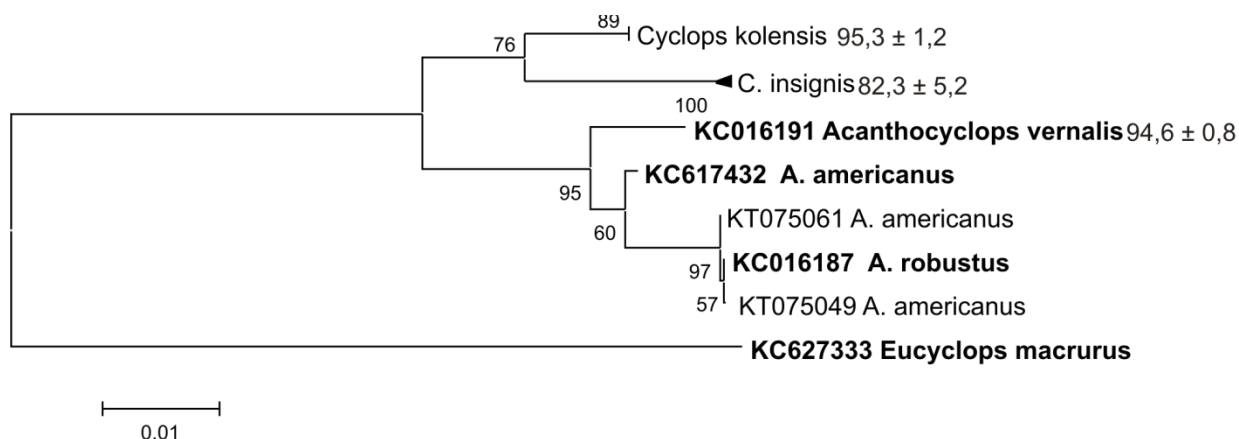


Рисунок 9. Филогенетическое древо (NJ), построенное на основе нуклеотидных последовательностей *COI*. Число в узле - значение бут-стреп поддержки узла ветвления. Число перед видовым названием – инвентарный номер в GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, позаимствованные из банка данных GenBank. Число после видового названия – полученное значение ДХ для этого вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведен молекулярно-филогенетический анализ циклопов, населяющих оз. Байкал. Впервые получены нуклеотидные последовательности для большей части эндемичных видов, которые депонированы в базу генетических данных GeneBank. В том числе получены молекулярные данные для *D. zhimulevi*, последнего из описанных видов байкальских эндемичных циклопов и представителя недавно обнаруженной группы мелких псаммофильных циклопов. Использование двух эволюционных маркеров позволило сравнивать таксоны на разных уровнях: 6 родов из двух подсемейств Cyclopoidea, Eucyclopoidea и 12 близких видов и подвида из самых многочисленных по видовому составу и высокоэндемичных родов *Acanthocyclops* и *Diacyclops*. Выявлена проблема в таксономическом определении байкальских циклопов. Полученные результаты будут интересны не только для дальнейшего изучения байкальских циклопов, но и пресноводных циклопов в целом. Это многообразная группа животных остается еще малоизученной с помощью молекулярных методов.

В рамках диссертационной работы заложены основы для изучения филогении циклопов из оз. Байкал молекулярными методами. С одной стороны филогенетическое древо, полученное по консервативному фрагменту 18S рРНК, отразило современные представления в систематике рассмотренных семейств циклопов: взаимоотношения родов, подсемейств. С другой стороны анализ фрагмента мтДНК показал высокую степень различий между полученными последовательностями видов в пределах одного рода: *Acanthocyclops*, *Diacyclops*, *Cyclops*; позволил обнаружить две

филогенетические группы последовательностей, относящихся к особям по морфологическим признакам близким к трем эндемичным видам *D. galbinus*, *D. improcerus*, *D. versutus*; выявил несоответствие разделения вида *A. profundus* с современной систематикой и его разделением на два подвида *A. profundus tomilovi*, *A. profundus profundus*. Так же филогенетическое древо по COI показало полифилетичность рода *Acanthocyclops* и обособленное положение байкальских эндемичных видов этого рода *A. profundus* и *A. rupestris*, от представителей рода *Diacyclops*.

Возраст расхождения представителей комплекса байкальских видов *Diacyclops* / *Acanthocyclops* от общего предка и вида *Cyclops kolensis* от общего предка с видами *E. speratus* и *M. albidus* оценен в 20 млн л. н. и 9 млн л. н. соответственно. В работе проведен анализ полученных временных оценок, имеющих палеонтологических данных и молекулярных датировок для Copepoda.

Предложен и апробирован на циклопах метод оценки относительного размера генома с использованием ПЦР-РВ. Преимуществами метода являются быстрота, простота и невысокая требовательность к количеству исследуемого материала, что актуально для изучения циклопов. Показана возможность применения метода ПЦР-РВ для оценки степени диминуции хроматина, что позволит интенсифицировать исследования в этой области. Впервые обнаружена диминуция хроматина у *Megacyclops viridis* в размере 91%. Анализ полученных молекулярных данных показал эволюционную несогласованность изменения размера диминуции хроматина и филогении байкальских циклопов у изученных видов, что расширяет понимание биологической роли процессов ДХ.

ВЫВОДЫ

1. Изучены филогенетические взаимоотношения байкальских циклопов, входящих в 6 родов и 2 подсемейства Cyclopinae и Eucyclopinae.
2. Молекулярно-филогенетические данные, полученные для вида *A. profundus*, не согласуются с современной систематикой и его разделением на два подвида *A. profundus tomilovi*, *A. profundus profundus*.
3. Молекулярные данные показали, что род *Acanthocyclops* является полифилетическим.
4. Выявлены две филогенетические группы, по морфологическим признакам сходные с тремя эндемичными байкальскими видами *D. versutus*, *D. improcerus* и *D. galbinus*.
5. Оценка возраста эндемичных байкальских видов родов *Diacyclops* и *Acanthocyclops* составляет 20 млн л.
6. Предложен и апробирован на 4 видах циклопов простой и эффективный метод относительной оценки изменений размера генома с использованием количественной ПЦР.

7. Впервые обнаружена диминуция хроматина у *Megacyclops viridis* в размере 91%.

8. Показана эволюционная несогласованность между изменением размера диминуции хроматина и филогенией циклопов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Майор Т.Ю.**, Шевелева Н.Г., Суханова Л.В., Тимошкин О.А., Кирильчик С.В. Молекулярно-филогенетический анализ циклопов (Copepoda: Cyclopoidea) из озера Байкал и его водосборного бассейна // Генетика. 2010. Т. 46, № 11. С. 1556–1564.

2. Тетерина В.И., Галимова Ю.А., Шевелева Н.Г., Суханова Л.В., **Майор Т.Ю.**, Зайцева А.Н., Кирильчик С.В. Простой и эффективный метод оценки размера диминуции хроматина у циклопов с использованием ПЦР в режиме реального времени // Генетика. 2016. Т. 52, № 11. С. 1327–1331.

3. **Майор Т.Ю.**, Галимова Ю.А., Шевелева Н.Г., Суханова Л.В., Кирильчик С.В. Молекулярно-филогенетический анализ представителей родов *Diasyclops* и *Acanthosyclops* (Copepoda: Cyclopoidea) из озера Байкал // Генетика. 2017. Т. 53, № 2. С. 233–239.

Работы в материалах конференций:

4. **Smykova T.Y.**, Sheveleva N.G., Sukhanova L.V., Kirilchik S.V., Timoshkin O.A. Molecular phylogeny of Lake Baikal Cyclopoidea (Copepoda): preliminary reconstruction // Abstracts of the 10th International Conference on Copepoda (10th ICOC), July 13–19, 2008, Pattaya, Thailand. – Pattaya, 2008. P. 92.

5. Зоткевич Е.А., Трифонов В.А., Гришанин А.К., Шевелёва Н.Г., **Смыкова Т.Ю.**, Тимошкин О.А., Жимулёв И.Ф. Диминуция хроматина и её значение в перестройке генома у циклопов // Материалы симпозиума памяти Г.А. Левитского «Хромосомы и эволюция», 26–27 ноября 2008 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2008. С. 49–50.

6. **Mayor T.**, Galimova Yu., Sheveleva N., Sukhanova L., Kirilchik S. Phylogeny of the Cyclopoidea from Lake Baikal based on mitochondrial COI gene sequence data // Abstracts of the 12th International Conference on Copepoda (12th ICOC) «Copepoda and the Global Environment», July 14–18, 2014, Seoul, Korea. – Seoul, 2014. P. 187.

7. **Майор Т.Ю.**, Галимова Ю.А., Шевелева Н.Г., Тимошкин О.А., Суханова Л.В., Кирильчик С.В. Молекулярная филогения циклопов (Crustacea: Copepoda) из оз. Байкал // Материалы IV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Биоразнообразие: глобальные и

региональные процессы», 23–27 июня 2016 г., г. Улан-Удэ. – Улан-Удэ: Издательство БНЦ СО РАН, 2016. С. 29.

Майор Татьяна Юрьевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИИ БАЙКАЛЬСКИХ
ЦИКЛОПОВ (СОРЕРОДА: СУСЛОРОИДА) НА ОСНОВЕ ЯДЕРНЫХ И
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук