

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

**Кочанова Елена Сергеевна**

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-квалификационной  
работы (диссертации)

**«Морфологическое и молекулярно-генетическое разнообразие пресноводных  
гарпактицид (Crustacea: Copepoda: Harpacticoida) Северо-Запада Евразии»**

06.06.01 Биологические науки

Гидробиология

Заведующий отделом аспирантуры,  
ЗИН РАН, кандидат биологических наук  
Доронин И.В.

Научный руководитель,  
доктор биологических наук,  
Алексеев В.Р.

Рецензент,  
доктор биологических наук, Профессор РАН,  
член-корреспондент РАН  
Котов А.А.

Санкт-Петербург

2020

## Содержание

|   |    |
|---|----|
| Введение .....  | 3  |
| 1. Обзор литературы .....   | 5  |
| 1.1 Краткая характеристика отряда гарпактицид (Harpacticoida) .....                               | 5  |
| 1.2 Морфологическая и молекулярно-генетическая изменчивость пресноводных гарпактицид .....        | 6  |
| 1.3 Обзор литературы по выбранным для исследования видам .....                                    | 9  |
| 1.3.1 <i>Canthocamptus staphylinus</i> Jurine .....   | 9  |
| 1.3.2 <i>Attheyella crassa</i> Sars .....   | 11 |
| 1.4 Биогеографическое распределение пресноводных гарпактицид .....                                | 13 |
| 2. Материалы и методы .....   | 15 |
| 3. Результаты и обсуждение .....  | 19 |
| 3.1 Морфологический и молекулярно-генетический полиморфизм <i>Canthocamptus staphylinus</i> ..... | 19 |
| 3.2 Морфологический и молекулярно-генетический полиморфизм <i>Attheyella crassa</i> .....         | 28 |
| 3.3 Филогенетическое разнообразие пресноводных гарпактицид .....                                  | 34 |
| Выводы .....  | 38 |
| Заключение .....  | 39 |
| Список литературы .....   | 40 |

## Введение

Изменчивость является одним из фундаментальных свойств живого и проявляется на всех уровнях организации живой материи. В экологии, систематике, эволюционной теории изменчивость является ключевым понятием. Разнокачественность особей обуславливает популяционную устойчивость и пластичность, играющие главную роль в поддержании гомеостаза — регулирования структуры и функций популяций при флуктуациях параметров среды. В масштабах ареала изменчивость особей и их адаптации к локальным комплексам факторов приводят к формированию сложной популяционной структуры вида (Павлова, 2010). Исследования механизмов возникновения и поддержания изменчивости и вариабельности популяций критически для понимания процессов видообразования, адаптации, инвазий и закономерностей микроэволюции (Avice, 2000).

В последнее время актуальной задачей при изучении биоразнообразия стало применение интегративного подхода, включающего в себя оценку морфологической и генетической изменчивости организмов (Schlick-Steiner et al., 2010). Такой подход позволяет картировать фенотипические признаки на филогенетическое древо и отследить процесс видообразования (Padiál et al., 2010). Однако, все чаще и чаще встречаются случаи, описывающие морфологически неразличимых, но при совместном существовании не скрещивающихся и сохраняющих целостность своего генофонда, криптических видов (De Queiroz, 2007). В связи с этим, применение одного или нескольких генетических маркеров особенно оправданы при изучении различных популяций.

Пресноводные гарпактикоидные копеподы – широко распространенные в разных типах водоемах организмы, которые являются подходящим объектом для изучения разнообразия в следствие (1) высокого уровня морфологической внутривидовой вариабельности и, тем не менее, слабо изученными с молекулярно-генетической стороны, особенно в Палеарктическом регионе, (2) изолированности пресноводных популяций и лимитированного дрейфа генов между ними, что позволяет практически каждую из них рассматривать как группу с уникальной эволюционной историей.

**Цели и задачи работы.** Целью данной работы является изучение морфологического и филогенетического разнообразия, систематики и особенностей эволюции на примере двух широко распространенных видов пресноводных гарпактицид Севера-Востока Евразии, а также анализ систематики и филогеографических паттернов распределения мировой фауны пресноводных гарпактицид на основе полученных и имеющихся в открытых базах данных генетических последовательностей.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Анализ морфологической variability пресноводных гарпактицид *Canthocamptus staphylinus* Jurine, 1820 и *Attheyella crassa* Sars, 1863 и выявление наиболее изменчивых среди исследованных популяций признаков.

2. Определение нуклеотидных последовательностей митохондриальных и ядерных генов ДНК из различных популяций рачков *C. staphylinus* и *A. crassa*, оценка внутривидового полиморфизма и дивергенции популяций и построение филогенетических деревьев.

3. Секвенирование митохондриального гена COI среди всех собранных в личной коллекции пресноводных гарпактицид, сбор всех доступных нуклеотидных последовательностей того же гена у пресноводных гарпактицид в открытых генетических базах данных, построение на их основе филогенетического древа и выявление основных паттернов структуризации и систематики семейств и видов.

## 1. Обзор литературы

### 1.1 Краткая характеристика отряда гарпактицид (Harpacticoida)

Отряд гарпактицид — Harpacticoida, Sars 1903 — представляет собой группу мелких ракообразных (0.2—2.5 мм), встречающихся по всему миру и живущих преимущественно на дне водоемов. В морской фауне мейобентоса, они являются наиболее богатой и многочисленной группой организмов после нематод — на данный момент отряд гарпактицид включает в себя более 4 500 видов (Huys, 2009). Вследствие своей экологической пластичности они могут жить в довольно широком спектре местообитаний: от мелких, пересыхающих луж и пазух листьев растений до крупных и глубоких озер, пещер и океанов (Боруцкий, 1952). В водной среде они встречаются от глубин более 10000 метров в Филиппинской впадине до высот 5540 метров в Гималаях (Machida, 2004). Более того, гарпактициды присутствуют в полугидроморфных местообитаниях, таких как мхи, листовая подстилка, и в интерстициальной песчаной среде (Friers и Ghene, 2000; Reid and Williamson, 2010; Voxshall и Halsey, 2004; Voxshall и Defaye, 2008; Defaye и Dussart, 2011). Следует отметить, что, будучи одним из элементов питания молоди рыб, они играют важную экологическую роль в водоемах, особенно в тех, где их присутствие достигает колоссального количества (Särkkä, 1992; Боруцкий, 1952).

Гарпактициды — самые мелкие из свободноживущих веслоногих раков и из свободноживущих ракообразных вообще. Их тело состоит, как правило, из 16 сегментов и разделено на две части: просома и уросома (Рис. 1). В просому входят цефалоторакс, несущий рострум с двумя парами антенн, науплиарный глаз, мандибулы и максиллярные ножки; и торакс — основное тело рачка с пятью парами сегментированных плавательных конечностей. Однако, границы торакса и просомы не совпадают — границы просомы приходятся на границу между третьим и четвертым сегментом торакса. В уросому, таким образом входят последний сегмент торакса, который несет пятую пару ножек, генитальный сегмент со сложным рисунком генитального поля и анальный сегмент, несущий оперкулум (или анальную пластинку), часто вооруженный шипиками. На анальный сегмент прикреплены парные подвижные каудальные ветви (фурка) (Корнев и Чертопруд, 2008). Оплодотворенные яйца самки Harpacticoida вынашивают в яйцевых мешках, чаще всего он один. У некоторых пресноводных гарпактикоид образуются покрытые утолщенной оболочкой зимующие яйца, способные переносить высыхание и значительные температурные перепады (Huys и Voxshall, 1991).

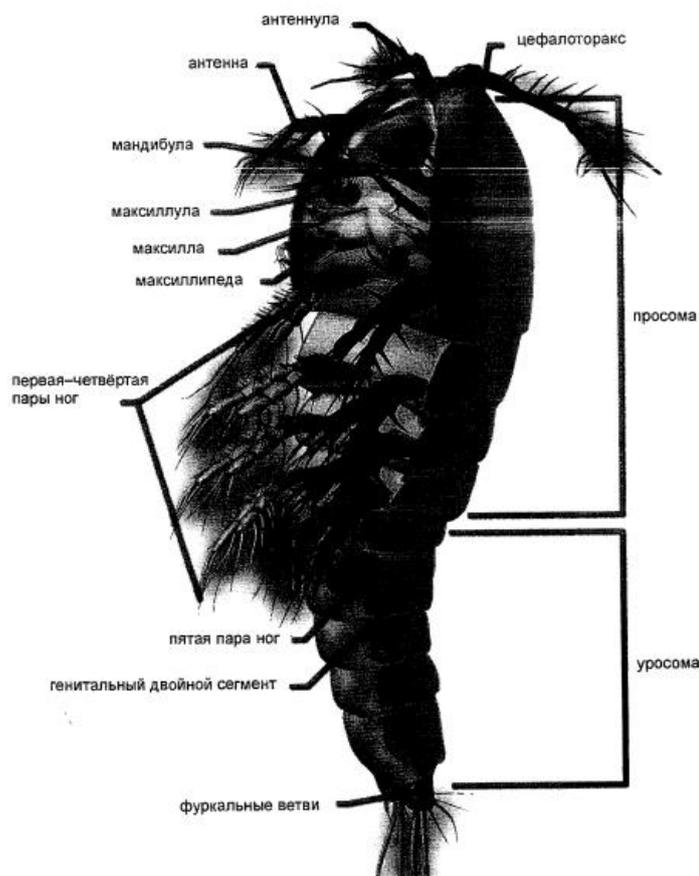


Рис. 1. Схема строения гарпактикоиды (Корнев и Чертопруд, 2008)

## 1.2 Морфологическая и молекулярно-генетическая изменчивость пресноводных гарпактицид

Гарпактициды достаточно сильно морфологически вариабельны в зависимости от условий среды, в том числе температуры, размера водоема, донного субстрата, а также трофности среды. Внутривидовое и внутривидовое разнообразие отряда проявляется в изменчивости практически всех морфологических структур (Боруцкий, 1952; Wells, 2007): членистости антеннул (*Eractophanes*), вооружения придатка антенн (*Neomrazekiella*, *Maraenobiotus*), строения пальпы мандибул (*Maraenobiotus*), членистости и вооружения плавательных ног (*Pesceus*, *Bryocamptus*, *Maraenobiotus*, *Eractophanes*), строения рудиментарных ножек (*Canthocamptus*, *Maraenobiotus*, *Eractophanes*), формы и вооружения каудальных ветвей (*Pesceus*, *Bryocamptus*, *Moraria*), тонкого вооружения сегментов тела (*Bryocamptus*, *Maraenobiotus*, *Neomrazekiella*), числа шипиков на анальной пластинке (*Canthocamptus*, *Bryocamptus*, *Eractophanes*) (Фефилова, 2017).

В зависимости от того, на сколько сильно варьируются морфологические признаки в разных популяциях ракообразных были выделены и выделяются новые подвиды и виды.

Например, на основании изменчивости размеров тела, каудальных ветвей и анальной пластинки среди вида *Viguriella coeca* в разное время выделяли подвиды, такие как *V. coeca menzeli* (Chappius) и *V. coeca brevisetosa* (Monard), причем было показано, что морфологическая изменчивость данного таксона носит как экологический, так и географический характер. Впоследствии, вид был переописан на *Phyllognatopus viguieri* (Galassi et al., 2011). В Северной Америке *Bryocamptus minutus* дает подвид *B. m. minnesotensis* Heggick, который отличается от типичной формы некоторыми морфологическими признаками (Боруцкий, 1952).

Однако, при отсутствии ярко выраженной морфологической изменчивости необходима молекулярно-генетическая оценка внутривидового разнообразия. Молекулярно-генетические методы исследования внутривидовой структуры популяций имеют обоснование в рамках теории нейтральной эволюции, согласно которой большинство из замен в ДНК эффективно нейтральны, и по этой причине неизбежно и по определенными законам накапливаются при расхождении видов (Kimura, 1968). В результате этого различия в последовательности ДНК между таксонами оказываются более значительными, чем фенотипические расхождения (Темралеева, 2014).

Прорывным и весьма эффективным инструментом для решения проблем в систематике оказалась идея всеобщей идентификации биоразнообразия методом ДНК-штрихкодирования (Hebert, 2003). Она основана на расшифровке и выявлении различий между нуклеотидными последовательностями в определенных генах митохондриальной ДНК, поскольку именно они несут информацию о межвидовой дивергенции и являются наиболее вариабельными. Предпосылкой для разработки нового подхода среди копепод стали исследования А. Баклин (Bucklin, 1999), которая прочитала последовательности участка гена субъединицы I цитохром с оксидазы (COI) у нескольких видов и обнаружила возможность различать даже близкородственные виды с помощью этого генетического маркера. Критерием для проведения видовых границ стало принято считать показатель различия генетических расстояний —  $p$ , который служит удобной шкалой градации систематических порядков (Avice, 1999). Следует учитывать, что определенные маркеры дают неодинаковые оценки уровня генетической дивергенции в силу различий в скоростях молекулярной эволюции, а также географической удаленности (Абрамсон, 2009).

В рамках высокой изменчивости митохондриального маркера, для получения надежного результата в таксономических исследованиях было показано эффективное использование нескольких независимо эволюционирующих участков ДНК (Easton, 2010; Garlitzka, 2012). Наименьшей, по сравнению с митохондриальными, скоростью эволюционной и мутационной

изменчивости обладают более консервативные ядерные гены, например, 18S или ITS рРНК, широко используемые как самостоятельно, так и совместно с другими генами в различных исследованиях (Темралеева, 2014). Молекулярный метод, включающий в себя использование нескольких полиморфных участков ДНК, увеличил филогенетическое разрешение и согласовался с морфологическими признаками таксона (Gontcharov, 2004).

Ревизия, основанная на использовании нескольких генетических маркеров в совокупности с морфологическим анализом, оказалась особенно оправданной для видов с широким ареалом, достаточным присутствием в местообитаниях и экологической биоиндикационной важностью, где их правильное разграничение имеет существенное значение для изучения биоразнообразия. Секвенирование отдельных генов в различных организмах и построение на их основе филогенетического древа стало одним из эффективных подходов в таксономических исследованиях. С позиций эволюционной теории одним из самых интересных подходов считается картирование морфологических признаков на филогенетическом древе (Гельфанд, 2009), как, например, в случае с диагностированием *Zeusodes arenicolus* Wilson, в ходе которой была установлена корреляция между кладами в филогенетическом древе и структурой шипов на пятой паре ног в исследованных популяциях (Easton, 2010). В таком случае можно говорить о фенотипическом проявлении генетической изменчивости.

Внутри отряда гарпактицил филогенетические исследования проводятся чаще для морской фауны, в то время как генетические исследования пресноводных гарпактицид остаются малоизученными в систематике отряда. Из 115 видов гарпактицид, задепонированных в международных генетических базах данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) и BoldSystems (<http://www.boldsystems.org>), 87 – морских и 28 – пресноводных. Наиболее широко генетически изучен морской рачок *Tigriopus californicus* Baker — среди 77580 нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank 75338 относятся к этому виду. В результате изучения экологии и эволюции *T. californicus* были продемонстрированы принципы дифференциации между популяциями вида, в следствие которой генетические дистанции, рассчитанные по митохондриальным генам ДНК между множеством различных обследованных популяций, превышали более 20%. Такое разнообразие связывают с особенностями расселения вида, а также палеогеографическими особенностями территорий местообитания *T. californicus* — побережья Тихого океана (Burton et al, 2007; Willet and Ladner, 2009).

Среди пресноводной фауны исследования носят географический и точечный характер распределения. Так, генетически и морфологически были изучены гарпактициды

принадлежащие семейству *Parastenocarididae* и обитающие в пещерных водоемах и грунтовых водах Италии (Bruno, 2017); благодаря исследованиям Томислава Карановича (2011, 2012, 2014) были изучены некоторые виды гарпактицид семейства *Miraciidae* и *Canthocamptidae* из Австралии и Южной Кореи; в ходе проекта по баркодингу планктонных и бентических организмов Великих озер (США) были отсекувенированы гарпактициды семейства *Canthocamptidae* и *Ameridae*. Изучение молекулярно-генетической изменчивости палеарктических гарпактицид либо отсутствуют вовсе, либо носят частичный характер. Однако, в этих немногочисленных исследованиях генетической структуры пресноводных гарпактицид также отмечается глубокая генетическая дивергенция (около 20%) между популяциями, подтверждая общий феномен всекого уровня внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия и существования криптических форм среди копепоид.

Последние исследования морфологической и молекулярно-генетической изменчивости пресноводных копепоид показали, что существенными факторами в формировании популяционной структуры и дифференциации являются географические условия и геологическая история их местообитания (Marrone et al., 2013). Например, рачок *Eudiaptomus hadzici* сформировал четыре эволюционно различающихся линии среди изолированных озер на Западных Балканах (Previšić et al., 2016). Другой вид копепоид *Neutrodiaptomus tumidus* образовал четыре филогруппы, разделенные на Северную, Центральную и Юго-Западную и Сюэшаньскую линии Тайване (Young et al., 2014). Холинска и Вингаард (Holynska, Wingaard, 2019) описали разнообразие видов циклопов и указали, что родственные виды *Cyclops lacustris*, *C. bohater* и *C. divergence* демонстрирует морфологические и генетические различия, а также различное географическое распределение, что указывает на фактор изоляции в процессе видообразования.

## 1.3 Обзор литературы по выбранным для исследования видам

### 1.3.1 *Canthocamptus staphylinus* Jurine

Гарпактицида *Canthocamptus staphylinus* Jurine, 1820 — один из наиболее широко распространенных представителей семейства *Canthocamptidae* в пресных водах разных материков. Помимо Европы, откуда данный вид описан, *C. staphylinus* также указан для Северной Африки, Японии, Новой Зеландии. (Боруцкий, 1966; Вехов, 1998; Фефилова, 2006; Fefilova, 2007). Вид *C. staphylinus* достаточно хорошо изучен с точки зрения биологии и экологии. Этому способствовали такие его особенности как крупные для гарпактицид размеры (0.8—1.0 мм) и высокая экологическая пластичность — *C. staphylinus* обитает в водоемах

самого различного типа: от весенних луж до крупных озер и рек, от пресных вод до солоноватых (Вехов, 1998; Дяхтер, 1968; Монченко, 1969) от вод с кислой реакцией среды до щелочной (Боруцкий, 1966).

*Canthocamptus staphylinus* относится к моноциклическим холодолюбивым формам (Боруцкий, 1952). У Harpacticoida всегда имеются периоды, когда рачки совершенно отсутствуют в водоеме: зимние формы обычно отсутствуют летом, летние же, наоборот, зимой. Такие пробелы объясняются наличием стадий покоя, в которых рачки переносят те или иные неблагоприятные условия среды. Гарпактицида *C. staphylinus* известный период жизни (чаще всего летом) проводит в стадии покоя в цистах. Цисты имеют вид круглого полого шара, состоящего из кусочков ила и растений, склеенного особым секретом; в этом шаре заключен взрослый организм. В таком виде рачок проводит летние месяцы, избегая неблагоприятных для него условий. Отчасти роль покоящейся стадии — защищать организм при высыхании водоема (Donner, 1928).

*Canthocamptus staphylinus* сильно варьирует в вооружении пятой пары плавательных ножек, в вооружении шипиками предпоследнего абдоминального сегмента, в количестве шипиков на анальной пластинке (от 0 до 17), в форме сперматофора и пр. Большая изменчивость формы дала повод к установлению целого ряда подвидов: *C. staphylinus monardi* Roy, 1927; *C. staphylinus neocomensis* Monard, 1918; *C. staphylinus sinuus* Coker, 1934; *C. staphylinus thallwitzii* Kessler, 1913; и отдельного вида *C. microstaphylinus* Wolf, 1905. Насколько эти вариации могут рассматриваться как подвиды, вопрос спорный. Данные Доннера (Donner, 1928) и Зиверта (1929), а также исследования материала из различных мест России и стран бывшего СНГ (Боруцкий, 1952) показали, что *C. staphylinus* подвержен большой индивидуальной изменчивости. Некоторые авторы предположили, что нет причин разделять *C. staphylinus* и *C. microstaphylinus*, интерпретируя морфологические различия как изменчивость внутри вида (например, Borutzky, 1952; Janetzky и др., 1996). Другие, включая Е. Вольфа (Wolf, 1905), Р. Гурни (Gurney, 1932), К. Ланга (Lang, 1948) и Й. Сарвала (Sarvala, 1977), выделили *C. microstaphylinus* как отдельный вид из-за значительных различий в его морфологии и других аспектах его биологии.

Все эти исследования были выполнены, в основном, первой половине прошлого века. Современных работ по данному виду очень мало, и вполне очевидна необходимость его ревизии на уровне новых методов исследования. Результатом такой ревизии может стать изменение статуса вида с широким ареалом распространения.

Еще одним фактом, подтверждающим изменчивость и адаптивность *C. staphylinus*, является его способность к переходу к партеногенетическому способу размножения. В

большинстве случаев, гарпактициды размножаются половым путем и демонстрируют достаточно четкий половой диморфизм — самки, обычно, крупнее самцов и имеют отличное от них морфологическое строение антеннул, пятой пары плавательных ног и генитального поля (Huys и Voxshall, 1991; Suárez-Morales, 2015). Партеногенетический способ размножения описан только для трех видов гарпактицид, принадлежащим к семейству Canthocamptidae: сперва для *Elaphoidella bidens* Schmeil (Roy, 1931) и *Epaetophanes richardi* Mrazek (Lang, 1935), основываясь на отсутствии самцов в популяции; а затем для *C. staphylinus* (Sarvala, 1978). Кроме того, партеногенез подозревается на основе дефицита самцов у некоторых других видов *Elaphoidella*: *E. leruthi* Chappuis, *E. elaphoides* Chappuis (Chappuis, 1955) и *E. grandidieri* Guerne and Richard (Lang, 1948). В случае с *C. staphylinus* партеногенетический жизненный цикл был доказан полевыми наблюдениями в олиготрофном озере Пааярви (Финляндия) в виде присутствия только 0,28% самцов в популяции, и лабораторными экспериментами в результате которых неплодотворенные самки на науплиарных и копеподитных стадиях были способны производить жизнеспособное потомство. Как правило, такие переходы беспозвоночных животных к партеногенетическому жизненному циклу служит адаптацией к неблагоприятным условиям окружающей среды (Grebelnyi, 1996).

### 1.3.2 *Attheyella crassa* Sars

Гарпактицида *Attheyella crassa* Sars, 1863 принадлежит к семейству Canthocamptidae и имеет широкое распространение в различных типах водоемах северной Европы и часто встречается в России, Швеции, Дании, Норвегии, Исландии и Финляндии (Enckell, 1980). Гарпактицида *A. crassa* преимущественно обитает в крупных водоемах — в озерах и реках, но также встречается и в менее значительных — ручьях, лужах, но при условиях достаточного количества воды (Боруцкий, 1952). Данный вид предпочитает илистые субстраты и положительно реагирует на эвтрофикацию, является полициклической и эвритермической формой (Dole-Olivier et al., 2000).

Исследования фауны гарпактицид финских олиготрофных озер показало, что частота встречаемости *A. crassa* в самых глубоких точках (более 20 метров) имеет ярко выраженную отрицательную корреляцию с концентрацией фосфора, биомассой фитопланктона и растворенного органического вещества (Särkkä, 1992).

Устойчивость *A. crassa* к различным органическим и неорганическим веществам, а также относительно короткий для гарпактицид период развития (4-6 недель) позволили использовать

данный вид в токсикологических исследованиях. В исследовании влияния встречающегося в донных отложениях фунгицида тебуконазола на культивируемые популяции *A. crassa* было выявлено, что при его применении в различных концентрациях изменяется длина тела гарпактицид на науплиарных стадиях, смертность науплиев и индивидуальная плодовитость (Turresson et al., 2007).

Более того, было показано, что концентрация загрязненных отложений может влиять на генетическое разнообразие популяций *A. crassa*. Исследование влияния донных отложений с тяжелыми металлами выявило, что через 120 дней эксперимента происходит значительное снижение генетического разнообразия в популяции *A. crassa*, подтверждая гипотезу о том, что применение токсических веществ может изменить структуру популяции и генетической информации (Gardeström, 2008).

Вышеперечисленные лабораторные эксперименты указывают на ту или иную изменчивость вида и быстрые микроэволюционные процессы при воздействии внешних факторов. Таксономические работы, наоборот, подтверждают стабильность и консервативную природу морфологических признаков *A. crassa* среди популяций ареала местообитания (Борущкий, 1952). Однако К. Ланг, в своей монографии указывает на существование подвида *A. schmeili*, отличающегося от *A. crassa* формой каудальных ветвей и шипов на пятой паре ног (Lang, 1948).

Такие неоднозначные данные обозначает с одной стороны недостаточную изученность вида, а с другой возможное присутствие криптических видов в данном таксоне. Существование криптических видов среди Copepoda достаточно ясно обосновал В. И. Монченко (2003), предполагая, что одной из причин трудностей их морфологической дифференцировки может быть исчерпанность (или полнота) морфологических адаптаций к современным условиям существования. Возможно, у копепод внешние морфологические структуры с контролирующим их генным аппаратом настолько полно адаптированы к условиям среды и их обычным флуктуациям, что сдвигать что-либо в этом хорошо отрегулированном механизме означало бы только дестабилизировать тесно пригнанные системы. Вероятно, все виды имеют генетическую основу внешнего разнообразия, но для большинства выгоден какой-либо один или небольшое число фенотипов, так что внешние эффекты генетического полиморфизма подавляются отбором на эпистатические гены.

## 1.4 Биogeографическое распределение пресноводных гарпактицид

В исследованиях разнообразия пресноводных копепод совместно с таксономической структурой важно учитывать регион обитания видов, его биоразнообразие и исторический контекст. Концепция космополитизма видов, которая считалась актуальной в 19 веке и предполагала глобальное расселение таксонов была подвергнута основательной ревизии, в результате которой более тщательное и региональное таксономическое рассмотрение отдельных видов позволило открыть множество комплексов пресноводных видов, разделенные географическими и экологическими барьерами (Marrone et al., 2013). Первой и прорывной работой в этой тематике стало исследование биоразнообразия кладоцер Фрея (Freu, 1986), а затем сложная структура широко распространённых видов была подтверждена и для пресноводных копепод (Lee, 1999; 2000).

Гарпактициды широко распространены по всему земному шару, а некоторые семейства встречаются во всех зоогеографических регионах. Например, семейство Canthocamptidae, одно из самых крупных из подкласса веслоногих раков насчитывает 627 видов и встречается на всех континентах. В основном своем большинстве, виды этого семейства обитают в пресноводных водоемах, но также может включать в себя эстуарные формы, например, *Mesochra*. Семейства Parastenocarididae, Phyllognathopodidae и Ameiridae также встречаются во всех зоогеографических регионах (за исключением Арктики) и достаточно распространены в подземных водах (Rouch, 1986; Galassi, 2001). Остальные семейства (Ectinosomatidae, Harpacticidae, Chappuisiidae, Huntemanniidae, Laophontidae, Cletodidae, Darcythompsoniidae) обитают более изолированно и регионально. Примечательно то, что, не смотря на широкое распространение нескольких семейств, уровень эндемичности видов среди разных районов остается достаточно значительным, около 90% всех видов встречаются только в одном из районов.

Из всех зоогеографических регионов (Рис. 2), лидирующим по количеству и разнообразию видов гарпактицид является Палеарктика – из 1124 зарегистрированных видов более половины (584) встречаются именно там, остальные распространены по другим шести. Наиболее часто встречаемыми видами являются представители семейства Canthocamptidae, такие как *Elaphoidella*, *Moraria*, *Canthocamptus*, *Bryocamptus*, *Attheyella* (Boxshall and Defaye, 2008). Более того, в Палеарктическом регионе находится так называемая горячая точка биоразнообразия (biodiversity hotspot), регион со значительным уровнем богатства видов – озеро Байкал, где совместно существует около 80 видов гарпактицид, большинство из которых эндемичны (Boxshall and Evstigneeva, 1994).

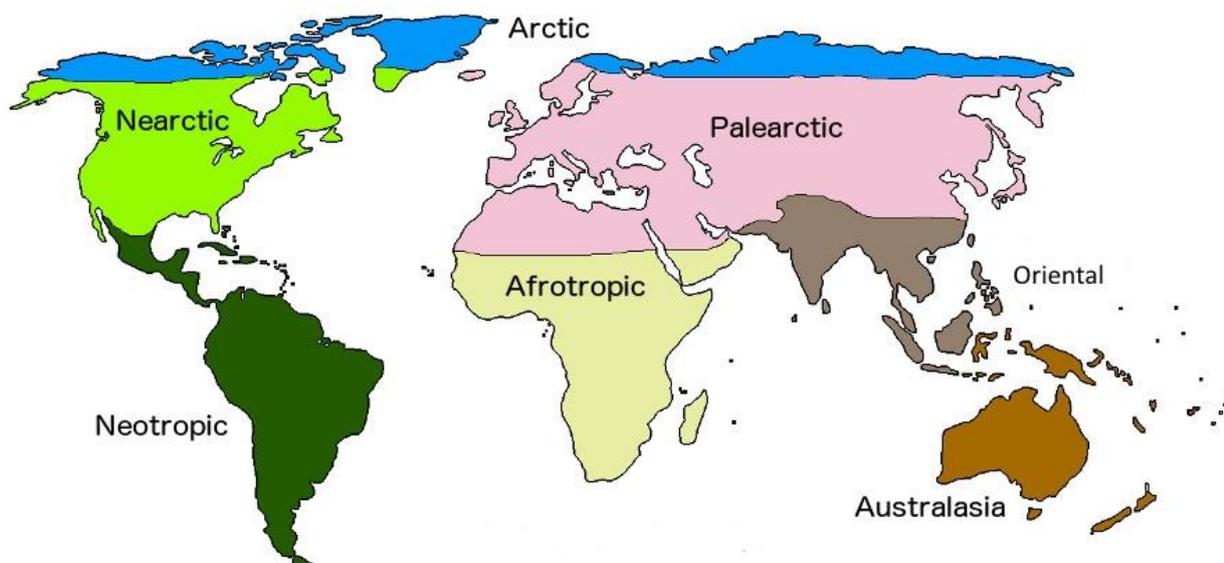


Рисунок 2. Зоогеографические районы расселения веслоногих рачков.

Интегративные исследования морфологической и молекулярно-генетической изменчивости пресноводных гарпактицид носят точечный характер, как правило привязанный к месту работы исследователей. Например, Томислав Каранович описал 7 новых видов гарпактицид из рода *Schizopera* на основе их морфологического и молекулярно-генетического различия среди водоемов в Австралии (Karanic and Cooper, 2012). Также он обнаружил генетическую неоднородность нескольких видов гарпактицид из рода *Kinnecaris* и предположил существование сложной системы видов-эндемиков с узким ареалом обитания в Австралии (Karanic and Cooper, 2011). В добавок к этому, Каранович отсековировал и изучил несколько других австралийских видов пресноводных гарпактицид (*Australocamptus hamondi*, *Elaphoidella humpreusi*, *Nitokra esbe* и *N. yeelimie*) (Karanic et al., 2014). Итальянская исследовательница Мария Кристина Бруно провела обширный морфологический и молекулярно-генетический анализ гарпактицид из рода *Stammericaris*, обитающих в подземных водах и пещерах Италии. На основе анализа морфологии и генетики видов она описала новый вид и отметила широкую вариативность изучаемых видов (Bruno et al., 2017). Проект по изучению биоразнообразия и баркодингу планктона и мейобентоса Великих Озер (США) позволил отсековировать и получить информацию о генетической структуре таких родов гарпактицид как *Canthocamptus*, *Moraria*, *Attheyella*, *Nitokra*, *Bryocamptus*, *Schizopera* (Connolly, неопубликованные данные). На данный момент, не смотря на большое разнообразие в Палеарктике, работ по филогении и филогеографии пресноводных гарпактицид считанные единицы (Kochanova et al., 2018; Kochanova and Gaviria, 2018).

## 2. Материалы и методы

Материалом послужили пресноводные гарпактициды из гидробиологических проб и фаунистических сборов из 21 водоема Европы, различных по типу, морфометрии и экологическим характеристикам (табл. 1). После обработки материала и составления списков видов было решено проанализировать детально два вида (*Canthocamptus staphylinus* и *Attheyella crassa*), которые имели наиболее широкое распространение среди собранного материала, а остальные виды отсекавировать для общего анализа филогенетической структуры пресноводных гарпактицид.

Предназначенный для изучения фенотипической изменчивости вида материал фиксировали 4%-ным формалином. У самцов и самок гарпактицид учитывали 20 количественных морфологических и морфометрических признаков, которые включали второстепенные качественные диагностические признаки вида и морфометрические характеристики. Гарпактикоид просматривали под микроскопами Микромед (Китай) и Leica DM 4000B (Германия), размеры рачков и их внешних морфологических структур определяли с помощью окуляр-микрометра. Статистический анализ морфологических и морфометрических признаков популяций осуществляли с помощью критериев Краскела–Уоллеса, корреляционного анализа и кластерного анализа. Для определения меры разнообразия морфологических признаков и индексов рассчитывали коэффициент вариабельности.

Для изучения генетического полиморфизма рачков фиксировали очищенным 96%-ным этанолом и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для филогенетического анализа использовали последовательности нуклеотидов фрагмента гена первой субъединицы цитохромоксидазы (CO1) митохондриальной ДНК, малую субъединицу гена 18S рибосомальной РНК и внутренний транскрибируемый спейсер (ITS) рибосомальной ДНК. ДНК выделяли при помощи 6%-ного раствора Chelex-100 в бидистиллированной воде. В 10 мкл раствора помещали разрезанного рачка, добавляли протеиназу-К и нагревали в термостате до температуры  $55^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин, затем до  $99^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. Для амплификации участка генов всех особей использовали прямой и обратный праймеры, указанные в таблицу 2. Реакции амплификации проводили в объеме 50 мкл. Реакционный микс состоял из двух названных выше праймеров (Евроген, Россия) – по 10 мкл, 10 мкл Screenmix (Евроген Россия), 18 мкл воды без нуклеаз (Ambition, США) и выделенной ДНК – 2 мкл. Использовали следующий температурный профиль полимеразной цепной реакции (ПЦР): начальная денатурация 5 мин при температуре  $94^{\circ}\text{C}$  и следующие пять циклов по схеме:  $90^{\circ}\text{C}$  (30 с), 45

°C (60 с), 72 °C (90 с); затем 27 циклов по схеме: 90 °C (30 с), 55 °C (45 с), 72 °C (60 с) и конечная элонгация 5 мин при 72 °C.

| Ген | Название праймера | Направление | Последовательность (5'-3')                  | Ссылка            |
|-----|-------------------|-------------|---|-------------------|
| COI | HCO 2198          | Прямой      | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA                  | Folmer, 1994      |
|     | LCO1490           | Обратный    | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG                   |                   |
|     | ZplankF1_t1       | Прямой      | TGTA AAAACGACGGCCAGTTCTASWAATCATAARGATATTGG | Prosser, 2013     |
|     | ZplankR1_t1       | Обратный    | CAGGAAACAGCTATGACTTCAGGRTGRCCRAARAATCA      |                   |
| ITS | ITS-4             | Прямой      | TCCTCCGCTTATTGATATGC                        | White et al. 1990 |
|     | ITS-5             | Обратный    | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG                      |                   |
| 18S | 18Sf              | Прямой      | TACCTGGTTGATCCTGCCAG                        | Huys et al., 2009 |
|     | 614r              | Обратный    | TCCA ACTACGAGCTTTTAAACC                     |                   |
|     | 554f              | Прямой      | AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC                       |                   |
|     | 1282r             | Обратный    | TCACTCCACCAACTAAGAACGGC                     |                   |
|     | 1150f             | Прямой      | ATTGACGGAAGGGCACCACCAG                      |                   |
|     | 18Sr              | Обратный    | TAATGATCCTTCCGCAGGTTAC                      |                   |

Таблица 2. Описание использованных в генетическом анализе праймеров.

ПЦР-продукты разделяли методом электрофореза в 1.3%-ном агарозном геле в триацетатном буферном растворе, окрашивали бромистым этидием, для визуализации применяли трансиллюминатор UVT-1 (Биоком, Москва). В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали 100 bp Ladder DNA marker (100 bp–3000 bp) (Thermo Scientific, ЕС). Для очистки полученного продукта применяли набор QI Aquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование проводили с использованием набора реагентов Ready Reaction Mix (Life Technology) на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью алгоритма ClustalW и редактировали вручную в программном пакете Mega 7.0. Филогенетические деревья с расчетом бутстреп-поддержек узлов ветвления (1000 репликаций) с применением методов максимального правдоподобия (ML), а также расчет генетических дистанций по модели Тамура–Нея проводили в том же пакете программ. Показатели гаплотипического (Hd) и нуклеотидного (p(π)) разнообразия для популяций рассчитывали с помощью пакета программ DNASP 5.10.

| Вид \ Популяция                                | <i>Canthocamptus staphylinus</i> | <i>Attheyella crassa</i> | <i>Nitokra hibernica</i> | <i>Elaphoidella gracilis</i> | <i>E. bidens</i> | <i>Pesceus shcmeili</i> | <i>A. dentata</i> | <i>A. trispinosa</i> | <i>Bryocamptus minutus</i> | <i>Moraria duthei</i> | <i>M. brevipes</i> |
|--|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------|
| Озеро Женева, Швейцария<br>46°27'N, 06°31'E    | +                                | +                        | -                        | -                            | -                | -                       | -                 | -                    | -                          | -                     | -                  |
| Озеро Цюрих, Швейцария<br>47°14'N, 08°40'E     | +                                | -                        | -                        | -                            | -                | -                       | -                 | -                    | -                          | -                     | -                  |
| Озеро Пааярви, Финляндия<br>61°04'N, 25°08'E   | +                                | +                        | +                        | +                            | +                | +                       | +                 | -                    | +                          | -                     | -                  |
| Озеро Плау ам зе, Германия<br>53°49'N, 12°37'E | +                                | -                        | -                        | -                            | -                | -                       | -                 | -                    | -                          | -                     | +                  |
| Озеро Штехлин, Германия<br>53°14'N, 13°03'E    | +                                | -                        | -                        | -                            | -                | -                       | -                 | +                    | -                          | -                     | +                  |
| Озеро Мюритц, Германия<br>53°25'N, 12°41'E     | -                                | -                        | +                        | -                            | -                | -                       | -                 | -                    | -                          | -                     | -                  |
| Озеро Целль ам зе, Австрия<br>47°33'N, 10°81'E | +                                | -                        | -                        | -                            | -                | -                       | -                 | -                    | -                          | -                     | -                  |
| Озеро Халльштат, Австрия<br>47°55'N, 13°65'E   | +                                | -                        | +                        | -                            | -                | -                       | -                 | +                    | +                          | -                     | -                  |
| Ручей Хиуу, Эстония<br>59°38'N, 24°67'E        | -                                | +                        | -                        | +                            | -                | -                       | -                 | -                    | -                          | -                     | -                  |
| Озеро Виртсъярв, Эстония<br>57°40'N, 26°40'E   | +                                | -                        | +                        | -                            | -                | -                       | -                 | -                    | +                          | -                     | -                  |
| Озеро Согсванн, Норвегия                       | +                                | +                        | -                        | -                            | -                | -                       | -                 | -                    | -                          | -                     | -                  |

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 59°58'N, 10°43'E  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Озеро Стора Ле,<br>Норвегия<br>59°18'N, 11°46'E   | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Озеро Ванерн,<br>Швеция<br>58°55'N, 13°30'E   | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Нювчимское<br>водохранилище,<br>Респ. Коми, Россия<br>61°39'N, 50°74'E                  | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Пруд в<br>ботаническом саду г.<br>Сыктывкара, Респ.<br>Коми, Россия<br>61°39'N, 51°72'E | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Река Печора, НАО,<br>Россия<br>68°18'N, 54°22'E   | - | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - |
| Ручей Каркалай,<br>Удмуртия, Россия<br>56°98'N, 52°40'E                                 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Озеро Нарачь,<br>Беларусь<br>54°87'N, 26°69'E   | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | + |
| Рыбинское<br>водохранилище,<br>Россия<br>58°08'N, 38°28'E                               | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| Орловский пруд, Лен<br>область, Россия<br>59°51'N, 30°02'E                              | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Вашуткины озера,<br>Респ. Коми, Россия<br>68°01'N, 61°33'E                              | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - |

Таблица 1. Перечень популяций и наличия видов гарпактицид в исследованных местообитаниях.

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1 Морфологический и молекулярно-генетический полиморфизм

##### *Canthocamptus staphylinus*

**Морфологический полиморфизм.** В морфологическом анализе использовались данные из 13 популяций вида. По основным диагностическим признакам: членистости и вооружению антеннул и антенн, вооружению торакальных конечностей, форме и вооружению каудальных ветвей и анальной пластинки все просмотренные гарпактициды соответствовали описанию вида *C. staphylinus* в определителе Е.В. Боруцкого (Боруцкий, 1952). Для особей из всех обследованных популяций устойчивыми были следующие количественные морфологические характеристики: сплошное вооружение задних краев абдоминальных сегментов на брюшной стороне и отсутствие вооружения на спинной, антеннулы самок состояли из восьми члеников, экзоподит антенн самок и самцов – из двух, пальпа мандибул – из двух члеников; число придатков на экзоподите антенн – 4, на пальпе мандибул – 5. Длина тела самок (без апикальных щетинок каудальных ветвей) варьировала от 0.6 до 1.25 мм, самцов – от 0.6 до 1.04 мм. Самые крупные особи найдены в Орловском пруду, самые мелкие – в водоемах г. Сыктывкара и Нювчимском водохранилище (табл. 3). Длина внутренней апикальной щетинки на каудальных ветвях составляла в разных популяциях от 0.6 до 0.8 мм у самок и от 0.4 до 0.7 мм – у самцов. Число шипиков на анальной пластинке у самок *C. staphylinus* колебалось от 9 до 18, у самцов – от 8 до 12. Антеннулы всех самок состояли из восьми члеников, сенсорный отросток на их четвертом членике достигал седьмого – середины восьмого членика.

Изменчивым количественным морфологическим признаком для обследованных выборок *C. staphylinus* оказалось число шипиков на экзоподите торакальной рудиментарной ноги пятой пары. У подавляющего большинства самок зарегистрировано пять таких шипиков, из которых внутренний апикальный очень короткий и тонкий (Рис. 3). У двух самок из Орловского пруда на середине внутреннего края экзоподита пятой конечности присутствовал хорошо развитый шестой шипик.

| Водоем       | Признаки         |                   |                  |              |                  |                   |
|--------------|------------------|-------------------|------------------|--------------|------------------|-------------------|
|              | Ltot, мм         | Nspin             | Lf/Wf            | L2/L1        | L4/L3            | L2/L4             |
| Озеро Женева | 0.9±0.1<br>(n=6) | 16.0±0.4<br>(n=6) | 1.7±0.1<br>(n=6) | 3.6<br>(n=1) | 1.6±0.3<br>(n=2) | 1.0±0.04<br>(n=2) |

|                          |                    |                    |                   |                   |                   |                    |
|--------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Озеро Пааярви            | 1.0±0.05<br>(n=20) | 12.5±1.3<br>(n=11) | 2.3±0.5<br>(n=18) | 2.9±0.4<br>(n=17) | 2.1±0.3<br>(n=12) | 1.0±0.06<br>(n=12) |
| Озеро Выртсъярв          | 0.89±0.09<br>(n=7) | 10.5±1.8<br>(n=7)  | 2.3±0.4<br>(n=6)  | 2.9±0.8<br>(n=6)  | 1.9±0.3<br>(n=5)  | 1.2±0.09<br>(n=4)  |
| Орловский пруд           | 1.1±0.08<br>(n=8)  | 12.3±0.1<br>(n=4)  | 2.3±0.5<br>(n=4)  | 2.8±0.2<br>(n=6)  | 2.0±0.1<br>(n=6)  | 1.0±0.24<br>(n=7)  |
| Пруд в Сыктывкаре        | 0.7±0.1<br>(n=14)  | 10.0±0.6<br>(n=5)  | 2.7±0.4<br>(n=14) | 2.7±0.7<br>(n=14) | 1.7±0.1<br>(n=7)  | 1.0±0.06<br>(n=7)  |
| Нювчимское водохранилище | 0.7±0.1<br>(n=8)   | 10.2±0.9<br>(n=5)  | 2.4±0.5<br>(n=8)  | 2.3±0.3<br>(n=8)  | 1.7±0.2<br>(n=8)  | 1.0±0.07<br>(n=8)  |
| Озеро Цюрих              | 0.99±0.03<br>(n=4) | 13.0<br>(n=1)      | 2.0<br>(n=1)      | 3.1<br>(n=1)      | 1.4<br>(n=1)      | 1.1<br>(n=1)       |
| Озеро Плау ам зе         | 0.9±0.3<br>(n=3)   | 12.0±0.5<br>(n=3)  | 2.1±0.5<br>(n=3)  | 2.7<br>(n=1)      | 1.9<br>(n=1)      | 0.7<br>(n=1)       |
| Озеро Штехлин            | 0.8±0.3<br>(n=7)   | 13.0±0.5<br>(n=7)  | 2.0±0.3<br>(n=7)  | 3.5±0.2<br>(n=7)  | 2.4±0.3<br>(n=7)  | 1.2±0.5<br>(n=7)   |
| Озеро Гальштатт          | 0.92±0.5<br>(n=10) | 14.0±0.3<br>(n=10) | 2.0±0.2<br>(n=10) | 3.6±0.3<br>(n=10) | 2.5±0.5<br>(n=10) | 1.1±0.3<br>(n=10)  |
| Озеро Согнсванн          | 0.99±0.5<br>(n=7)  | 15.0±0.5<br>(n=7)  | 2.1±0.5<br>(n=7)  | 3.5±0.3<br>(n=7)  | 2.6±0.2<br>(n=7)  | 1.3±0.4<br>(n=7)   |
| Озеро Ванерн             | 1.0±0.05<br>(n=11) | 12.5±1.3<br>(n=11) | 2.3±0.5<br>(n=11) | 2.9±0.4<br>(n=11) | 2.1±0.3<br>(n=11) | 1.0±0.06<br>(n=11) |
| Озеро Нарачь             | 0.89±0.09<br>(n=7) | 10.5±1.8<br>(n=7)  | 2.3±0.4<br>(n=7)  | 2.9±0.8<br>(n=7)  | 1.9±0.3<br>(n=7)  | 1.2±0.09<br>(n=7)  |

Таблица 3. Морфометрические и количественные морфологические характеристики самок из различных популяций *Canthocamptus staphylinus*.

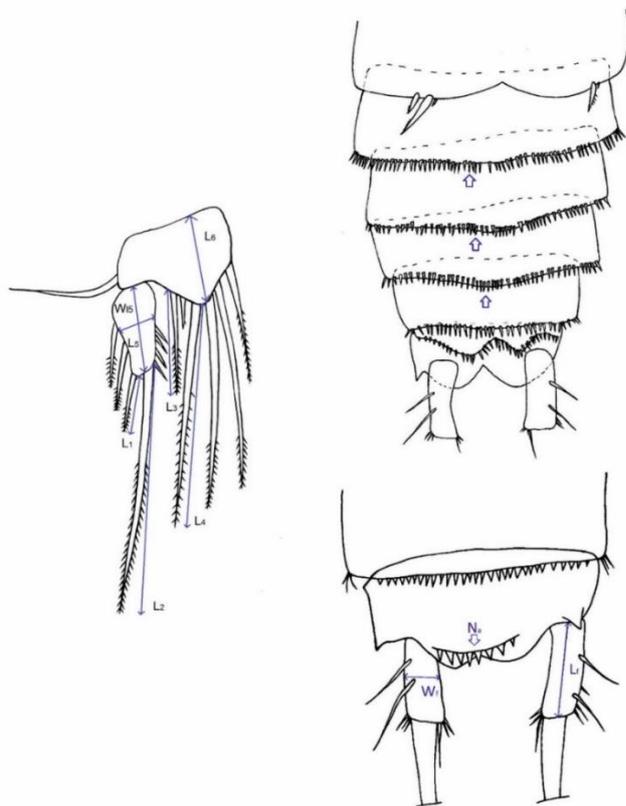


Рисунок 3. Изображение пятой пары ног самки, abdomena и каудальных ветвей с анальной пластинкой *C. staphylinus*.

По промерам длины и ширины каудальных ветвей рачков и промерам длин шипиков на пятой паре торакальных конечностей самок рассчитано семь морфометрических индексов, определяющих соотношения значений этих промеров. Из них только четыре индекса достоверно различались для разных популяций по критерию Краскелла–Уоллеса:  $Lf/Wf$  (отношение длины каудальных ветвей к их ширине),  $L2/L1$  (отношение длин второго (третьего) от внешнего края шипа и третьего (четвертого) от внешнего края шипа на экзоподите пятой пары торакальных ног),  $L4/L3$  (отношение длин третьего от внутреннего края шипа (самого длинного) и первого внутреннего шипа на базиэндоподите пятой пары ног самки),  $L2/L4$  (отношение длин второго (третьего) от внешнего края шипа на экзоподите пятой пары ног и третьего внутреннего шипа на базиэндоподите самки).

Отношение длины каудальных ветвей к их ширине составляло у самок от 1.7 до 2.7, у самцов – от 1.7 до 2.5 (Табл. 3). Рачки с наиболее широкими и короткими каудальными ветвями обнаружены в пробах из оз. Женева (типовая популяция), с наиболее удлиненными и тонкими ветвями – в сборах из водоемов г. Сыктывкара (Табл. 3).

Наиболее вариабельным морфологическим признаком в целом для самок *C. staphylinus* оказалось число шипиков на анальной пластинке, для самцов – морфометрический индекс каудальных ветвей. В выборках рачков из разных популяций разнообразие морфологических характеристик проявлялось по-разному. Высокой вариабельностью в большинстве популяций различались морфометрические индексы, описывающие каудальные ветви и вооружение конечностей пятой пары. Размеры тела гарпактикоид варьировали внутри популяций не столь существенно (Табл. 3).

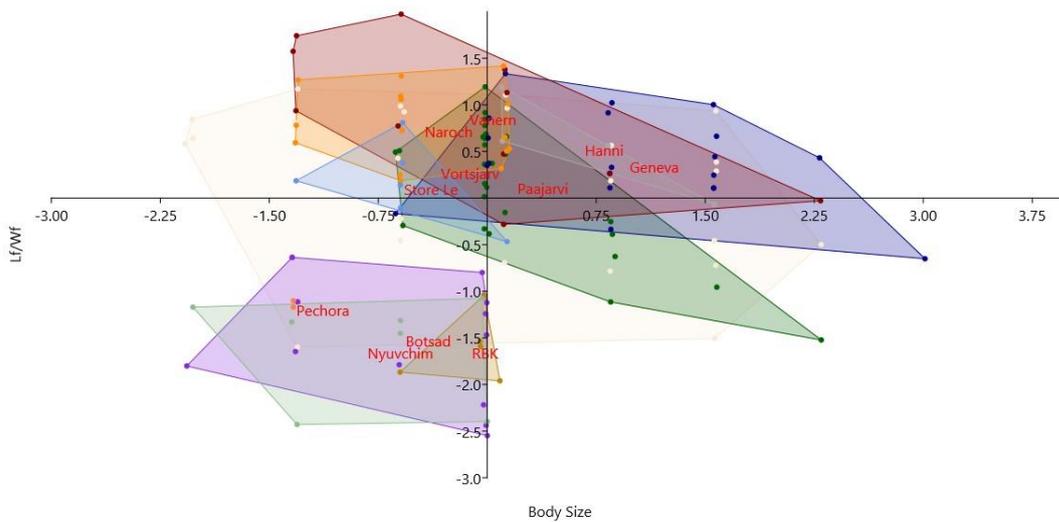


Рисунок 4. График, построенный методом главных компонент на основе измерений длины тела и индекса длины фуркальных ветвей Lf/Wf *C. staphylinus*.

Анализ главных компонент на основе морфометрических измерений у самок *C. staphylinus* позволил выделить две резко различных группы рачков смешанных по составу популяций. В одну группу вошли популяции из Республики Коми, обладающие меньшими размерами тела и других структур, во вторую – все остальные популяции (Рис. 4). Также следует отметить, что рачки из Республики Коми характеризовались наличием более удлинённых каудальных ветвей (их длина примерно в три раза превышает ширину), а также присутствием на внутренних апикальных каудальных щетинках “светлого места” – “heller Stelle” (Рис. 5), что является характерным признаком вида *C. microstaphylinus* (Lang, 1948).

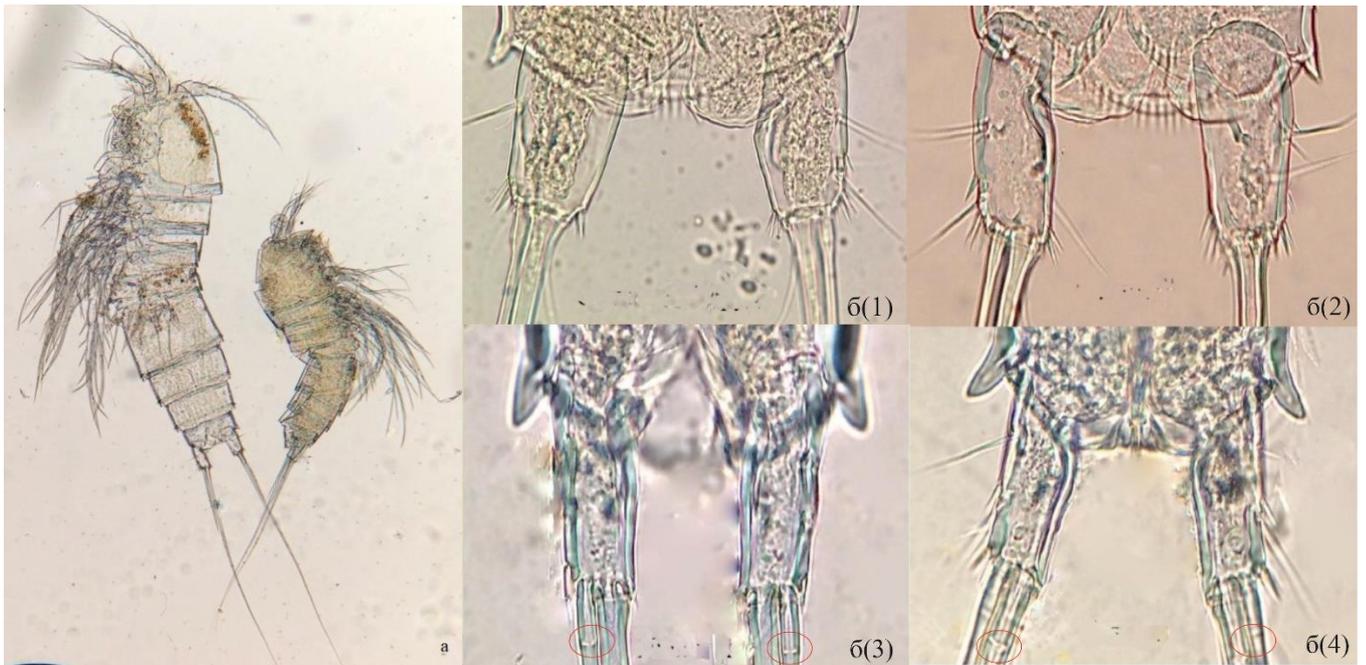


Рисунок 5. Фотографии гарпактицид из озера Пааярви и и пруда в Республике Коми (а) и каудальных ветвей гарпактицид из разных водоемов (б): озеро Пааярви (б(1)), Орловский пруд (б(2)), пруд в ботаническом саду г. Сыктывкара (б(3)), Нювчимское водохранилище (б(4)). Красным кружком отмечены “heller Stelle”.

**Генетический полиморфизм.** В результате изучения генетического полиморфизма было проанализировано 79 нуклеотидных последовательностей длиной 608 п.н. гена COI митДНК и 16 нуклеотидных последовательностей длиной 1245 п.н. гена 18S рРНК из 13 популяций вида.

Последовательности гена COI содержали 75 полиморфных сайтов, среди которых 73 парсимониально информативных. Общее число мутаций составляло 87. Среди проанализированных нуклеотидных последовательностей самок *C. staphylinus* выявлено 10 различных гаплотипов. Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в базу данных GenBank под номерами: KP974713-KP974734 и KC627284-86. Последовательности гена 18S содержали 12 полиморфных сайтов и были задепонированы базу данных GenBank под номерами: MN061649-MN061659.

Анализ филогенетического древа, построенных по молекулярно-генетическим данным гена COI с применением метода максимального правдоподобия, выявил кластеры сходной топологии. Образцы разделились на три клады с высокой степенью поддержки устойчивости ветвей (Рис. 6). В первую кладу объединились 15 особей гарпактикоид из трех водоемов Республики Коми, относящихся к бассейну р. Сысола и характеризующимися признаками вида *C. microstaphylinus*. Вторая и третья клады объединились в один крупный

кластер, который соответствует описанию вида *C. staphylinus* и разделились по географическому признаку. Во вторую кладу, условно названную Фенноскандская, вошли образцы из водоемов Финляндии, Швеции и Северной Германии. В третью кладу, условно Континентальную, вошли все остальные популяции из России, Беларуси, Эстонии, Швейцарии, Австрии и Германии. Примечательно, что практически каждая популяция создала отдельную кладу на дереве, обозначая разнородность каждой из них и отсутствие миграции.

Филогенетическое дерево на основе последовательностей гена 18S рРНК не выявило различий между изученными популяциями и оба вида были объединены в одну кладу с различием в несколько мутаций (Рис.7). Скорее всего, этот ген является слишком консервативным для разграничения популяций и видов, что также подтверждается в исследованиях других копепод (Sukhikh and Alekseev, 2015).

Генетические расстояния, посчитанные по модели Тамура-Ней, показали относительно высокие значения дивергенции между кладами. Например, расстояние между кладами *C. staphylinus* и *C. microstaphylinus* составило около 27% процентов, а между Фенноскандской и Континентальной группами *C. staphylinus* – примерно 25% (Рис. 8). В то время как генетические расстояния между популяциями внутри клад были в диапазон от 0.5 до 3.5% (Рис. 7).

Достаточно высокие зафиксированные генетические дистанции между кладами коррелируют с другими значениями, полученные в других исследованиях копепод (Burton et al., 2007; Easton et al. 2010; Garlitzka et al. 2012; Willet and Ladner, 2009). Более того, согласно другим исследованиям, популяции веслоногих рачков демонстрируют необычайно высокую дивергенцию митохондриальной ДНК с более высокими уровнями дифференциации аминокислот, чем в других таксонах. Вместе со сравнительно низкими уровнями ядерного разнообразия это предполагает, что быстрая эволюция митохондриальной ДНК стимулирует компенсаторную эволюцию ядерной ДНК в изолированных популяциях (митонуклеарный конфликт), тем самым обеспечивая потенциально важный механизм, вызывающий внутреннюю репродуктивную изоляцию (Barreto et al., 2017).

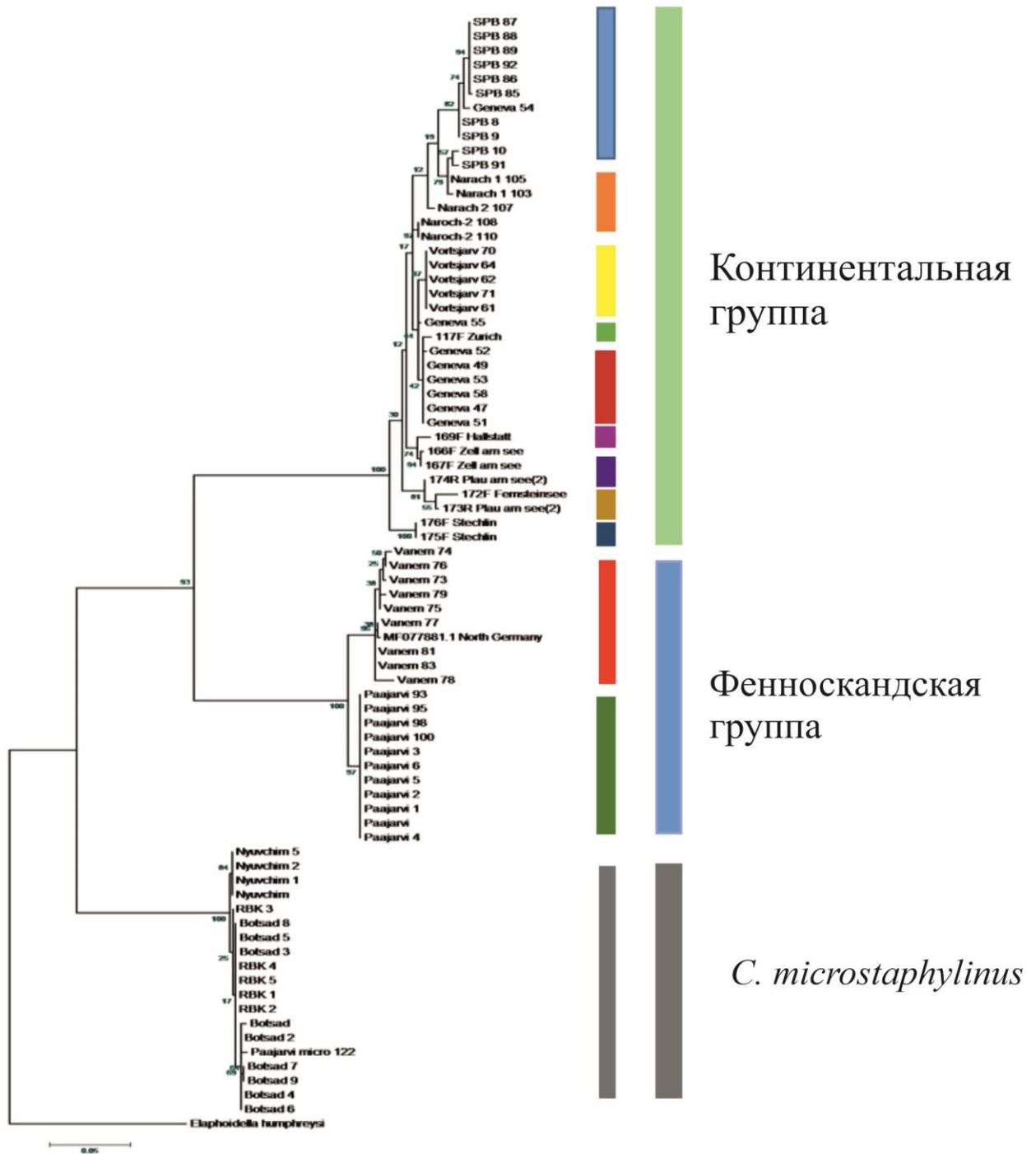


Рисунок 6. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия на основе нуклеотидных последовательностей *C. staphylinus* гена COI митДНК. В узлах клад обозначены значения бутстреп-поддержки. В качестве внешней группы была использована последовательность вида *Elaphoidella humpreysi* из того же семейства *Canthocamptidae*.

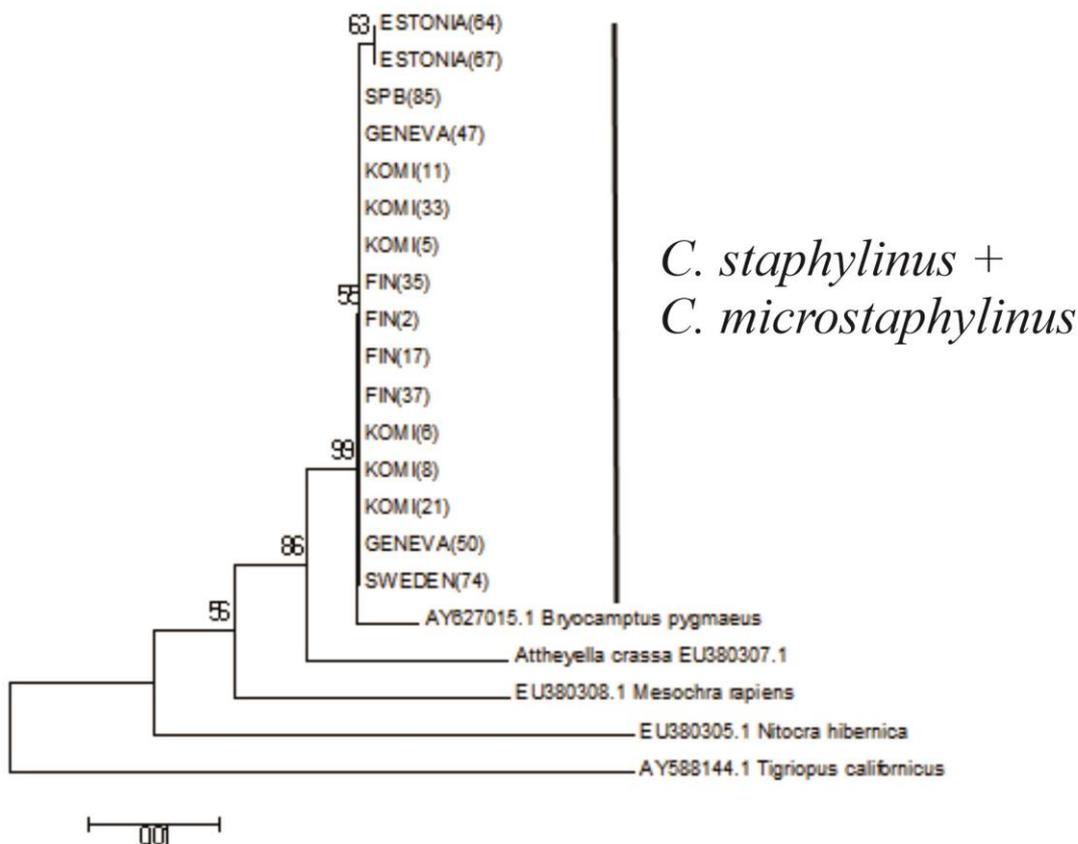


Рисунок 7. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия на основе нуклеотидных последовательностей *C. staphylinus* гена 18S рРНК. В узлах клад обозначены значения бутрстреп-поддержки. В качестве внешней группы была использована последовательность вида *Tigriopus californicus*. Также для анализа были добавлены другие виды пресноводных гарпактицид, имеющиеся в базе данных GenBank.

Совместно с вышеописанными морфологическими (более мелкие размеры тела, вытянутые каудальные ветви, наличие «heller Stelle») и генетическими (дистанции около 27%) различиями между популяциями *C. staphylinus* и *C. microstaphylinus*, мы можем подтвердить валидность вида *C. microstaphylinus* и отметить его присутствие в водоемах Республики Коми.

Две клады *C. staphylinus*, достаточно сильно различающиеся генетически (25% дивергенции), но не морфологически предполагают наличие криптических видов среди исследованных популяций. Криптические виды достаточно часто встречаются в исследованиях генетической структуры копепод и могут показывать экологическую или географическую разнородность популяций (Lee, 2000; Lee and Frost, 2002; Goetze, 2003; Cornils and Held, 2014; Figueroa et al., 2019). В данном случае мы наблюдаем

филогеографическую картину распределения популяций, которые разделились на Фенноскандскую и Континентальную группы.

Матрица генетических дистанций среди популяций *Canthocamptus staphylinus*

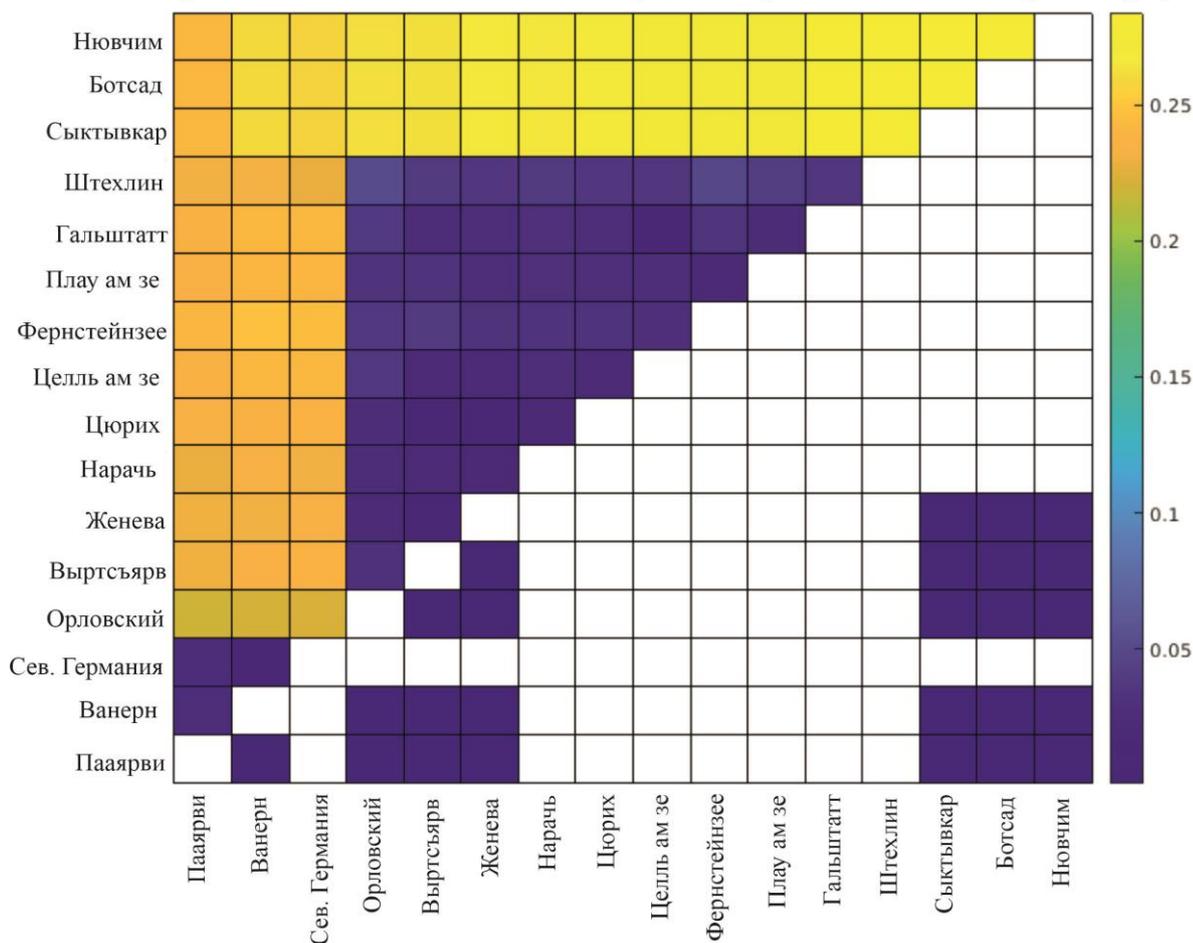


Рисунок 8. Матрица генетических дистанций, рассчитанная по модели Тамура-Ней для популяций *C. staphylinus*. Сверху диагонали значения для гена COI митДНК, снизу – для гена 18S рРНК.

Глубокая дивергенция между кладами (19,6–25,2% для гена COI) предполагает доплейстоценовое происхождение каждой линии. В целом, часы мтДНК веслоногих рачков тикают со скоростью примерно 2,6% расхождения последовательностей мтДНК на миллион лет (Marrone et al., 2013; Previšić et al., 2016). Используя эти цифры в качестве общего ориентира, эти две клады вида должны были разойтись где-то в раннем миоцене. Подобное или даже большее генетическое расхождение, предполагающее более древнюю изоляцию, также было обнаружено у других веслоногих ракообразных (Lee, 2000; Lee and Frost, 2002; Goetze, 2003; Burton et al. 2007; Willet and Ladner 2009; Easton et al. 2010 ; Marrone et al., 2013; Cornils, Held, 2014; Previšić et al., 2016; Figueroa et al., 2019).

### 3.2 Морфологический и молекулярно-генетический полиморфизм

#### *Attheyella crassa*

**Морфологический полиморфизм.** По основным диагностическим признакам: членистости и вооружению антеннул и антенн, торакальных конечностей, форме и вооружению каудальных ветвей все рассмотренные гарпактициды соответствовали описанию вида *Attheyella crassa* (Борутцкий, 1952). Для особей из всех обследованных популяций устойчивыми были следующие количественные морфологические характеристики: сплошное вооружение задних краев абдоминальных сегментов на брюшной стороне и отсутствие вооружения на спинной, антеннулы самок состояли из восьми члеников, экзоподит антенн самок и самцов – из двух, пальпа мандибул – из двух члеников; число придатков на экзоподите антенн – 4, на пальпе мандибул – 5. Наиболее вариабельными морфологическими признаками ( $p < 0.05$ ) для всех изученных популяций являлись: длина тела, длина апикальной щетинки каудальных ветвей, индекс отношения длины к ширине каудальных ветвей ( $L_f / W_f$ ), индекс длины к ширине дистального членика пятой пары ног ( $L_d / W_d$ ), а также индекс отношения длины к ширине базиэндоподита пятой пары ног ( $L_b / W_b$ ) (Рис.10).

Длина тела взрослых самок варьировала от 0,6 до 0,828 мм. Самый маленький экземпляр был найден в озере Пааярви, самый большой - в ручье Хиуу. Длина апикального шипа на каудальных ветвях варьировала от 0,3 (экземпляр из озера Пааярви) до 0,52 мм (экземпляр из озера Согнсванн). Индекс  $L_f / W_f$  изменялся от 1,375 (образец из озера Согнсванн) до 2,365 (образец из озера Пааярви). Индекс  $L_d / W_d$  варьировал от 1,69 (экземпляр из Женевского озера) до 2,72 (экземпляр из озера Пааярви). Индекс  $L_b / W_b$  – от 1,92 (образец из озера Нарачь) до 3,35 (экземпляр из Женевского озера). Средние значения измеренных морфологических признаков среди популяций приведены в Таблице 4.

| Популяция     | Морфологические признаки    |                                  |                             |                             |                             |
|---------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|               | Длина тела,<br>мм           | Длина<br>апикального<br>шипа, мм | $L_f/W_f$                   | $L_d/W_d$                   | $L_b/W_b$                   |
| озеро Пааярви | $0.671 \pm 0.066$<br>(n=24) | $0.372 \pm 0.039$<br>(n=24)      | $1.925 \pm 0.205$<br>(n=24) | $2.014 \pm 0.074$<br>(n=24) | $2.308 \pm 0.075$<br>(n=24) |
| озеро Женева  | $0.766 \pm 0.028$           | $0.403 \pm 0.071$                | $1.733 \pm 0.292$           | $2.510 \pm 0.790$           | $2.282 \pm 0.405$           |

|                         |             |             |             |             |             |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                         | (n=7)       | (n=7)       | (n=7)       | (n=7)       | (n=7)       |
| озеро Ванерн            | 0.630±0.127 | 0.440±0.014 | 1.994±0.001 | 2.181±0.001 | 2.153±0.001 |
|                         | (n=6)       | (n=6)       | (n=6)       | (n=6)       | (n=6)       |
| озеро Согнсванн         | 0.700±0.082 | 0.416±0.052 | 1.533±0.144 | 2.470±0.241 | 2.023±0.047 |
|                         | (n=15)      | (n=15)      | (n=15)      | (n=15)      | (n=15)      |
| Ручей Хиуу              | 0.810±0.018 | 0.443±0.038 | 2.159±0.155 | 2.303±0.052 | 2.153±0.001 |
|                         | (n=2)       | (n=2)       | (n=2)       | (n=2)       | (n=2)       |
| Озеро Нарачь            | 0.720±0.050 | 0.415±0.035 | 1.866±0.001 | 1.923±0.001 | 2.307±0.001 |
|                         | (n=12)      | (n=12)      | (n=12)      | (n=12)      | (n=12)      |
| Ручей Каркалай          | 0.738±0.047 | 0.393±0.041 | 2.236±0.205 | 2.666±0.135 | 2.000±0.001 |
|                         | (n=9)       | (n=9)       | (n=9)       | (n=9)       | (n=9)       |
| Рыбинское водохранилище | 0.635±0.035 | 0.385±0.021 | 2.029±0.041 | 2.588±0.001 | 2.153±0.001 |
|                         | (n=19)      | (n=19)      | (n=19)      | (n=19)      | (n=19)      |

Таблица 4. Морфометрические характеристики самок из различных популяций *Attheyella crassa*.

На графике, построенном методом принципиальных компонент (Рис. 9), популяции разделились на две основных группы. В первую группу вошли популяции из Финляндии, Швеции, Беларуси и Эстонии, а во вторую – популяции из Швейцарии и Норвегии, России. Различающим группы признаком на графике выступила длина апикальной щетинки каудальных ветвей.

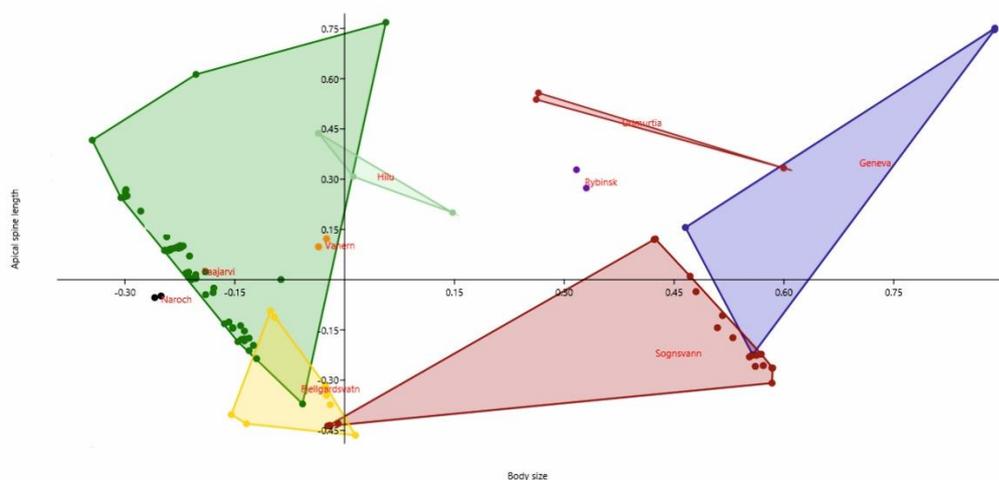


Рисунок 9. График, построенный методом главных компонент на основе измерений длины тела и индекса длины апикальной щетинки каудальных ветвей *A. crassa*.

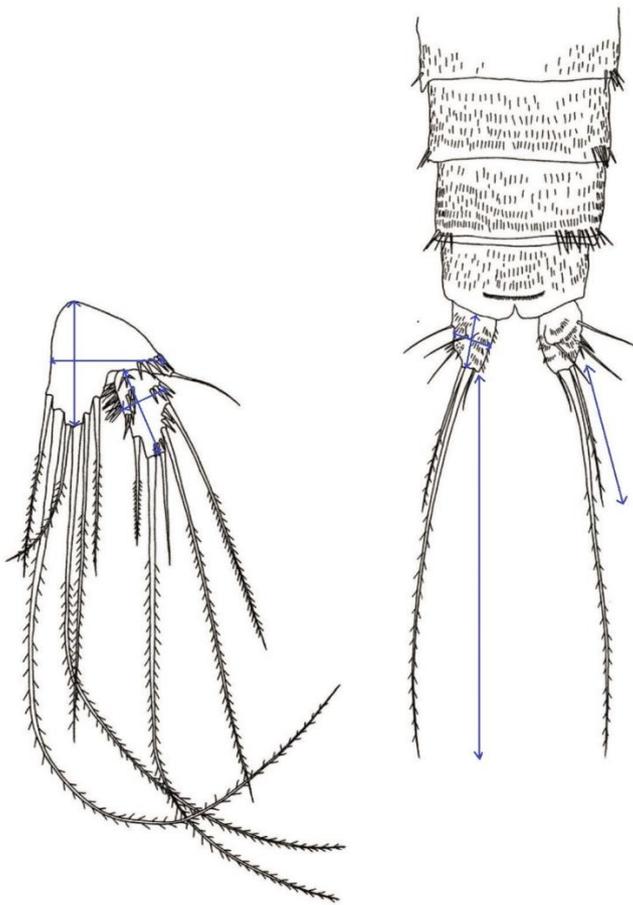


Рисунок 10. Изображение пятой пары ног самки (а) и каудальных ветвей с анальной пластинкой (б) *A. crassa*.

**Молекулярно-генетический полиморфизм.** Полученные 35 нуклеотидных последовательностей гена COI из 10 популяций вида, общей длиной 550 пар оснований, содержали 67 полиморфных сайтов, 65 из которых были парсимониально информативны. Общее гаплотипическое разнообразие составило 0.882, 13 гаплотипов было идентифицировано среди всех популяций. Последовательности были депонированы в базу данных GenBank под номерами: MN477639- MN477671.

Образцы сформировали две клады на филогенетическом древе с достаточно высокими значениями бутстреп-поддержки в узлах. В первую кладу, условно Восточную, вошли самки *A. crassa* из популяций Рыбинского и Нювчимского водохранилищ, озер Нарочь и Пааярви, ручьев Хииу и Каркалай, а также водоема дельты реки Печоры; во вторую кладу, условно Западную, — самки из озер Согнсванн и Женева, а также Рыбинского водохранилища (Рис. 11).

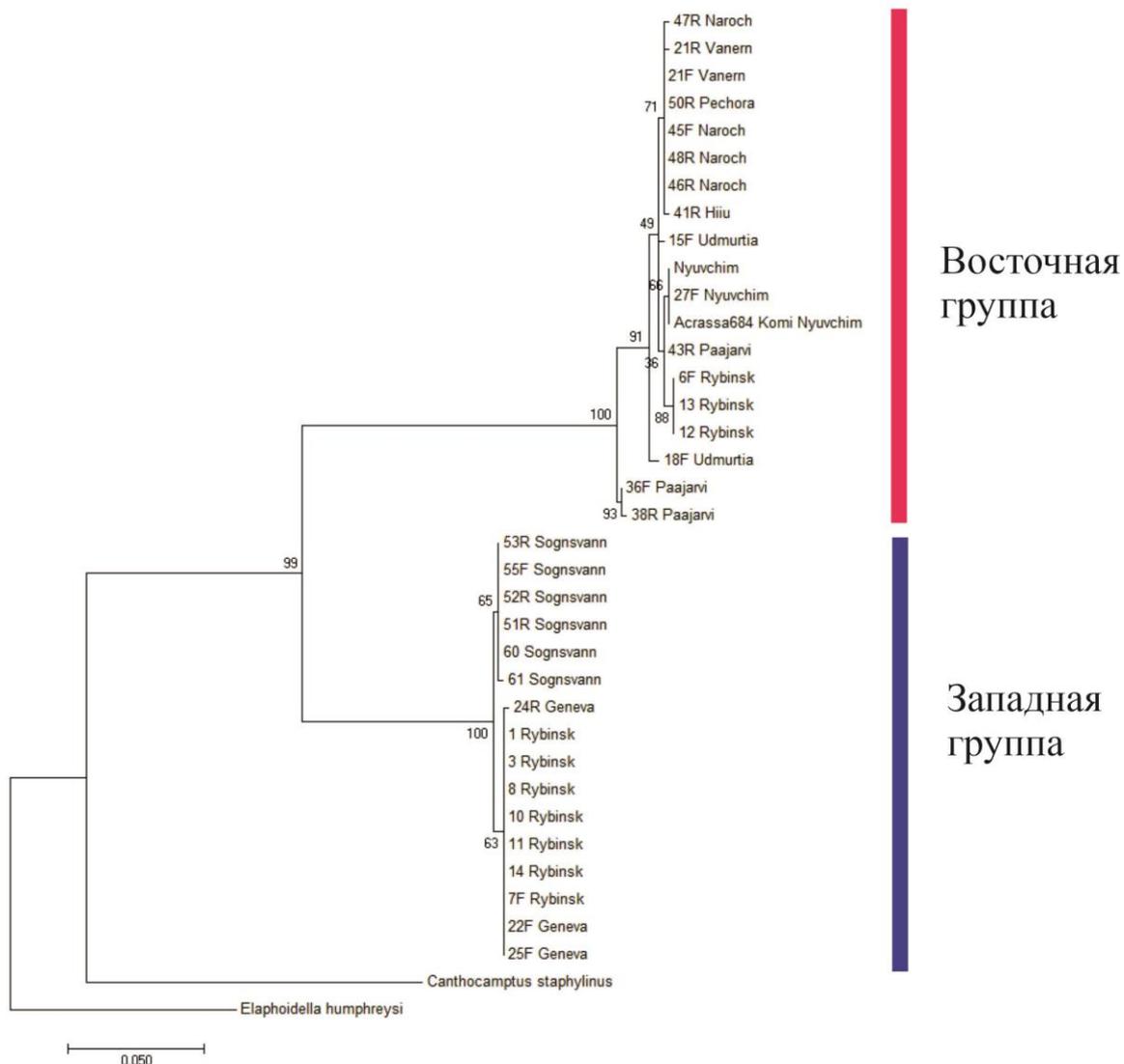


Рисунок 11. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия на основе нуклеотидных последовательностей *A. crassa* гена COI митДНК. В узлах клад обозначены значения бутрстреп-поддержки. В качестве внешней группы была использована последовательность вида *Elaphoidella humpreysi* из того же семейства *Canthocamptidae*.

Полученные 17 последовательностей гена ITS рРНК из 11 популяций вида, общей длиной 490 пар оснований, содержали 23 полиморфных сайта, 19 из которых были парсимониально информативны. Общее гаплотипическое разнообразие составило 0.632, 6 гаплотипов было идентифицировано среди всех популяций. Нуклеотидные последовательности были задепонированы в базу данных GenBank под номерами: MN038086-MN038100.

Образцы также сформировали две клады, идентичные по составу кладам на филогенетическом древе, построенном на основе последовательностей митДНК. В первую кладу, условно Восточную, вошли самки *A. crassa* из популяций Рыбинского и Нювчимского водохранилищ, озер Нарочь и Пааярви, ручьев Хиу и Каркалай, а также водоема дельты реки Печоры; во вторую кладу, условно Западную, — самки из озер Согнсванн и Женева, а также Рыбинского водохранилища (Рис. 12).

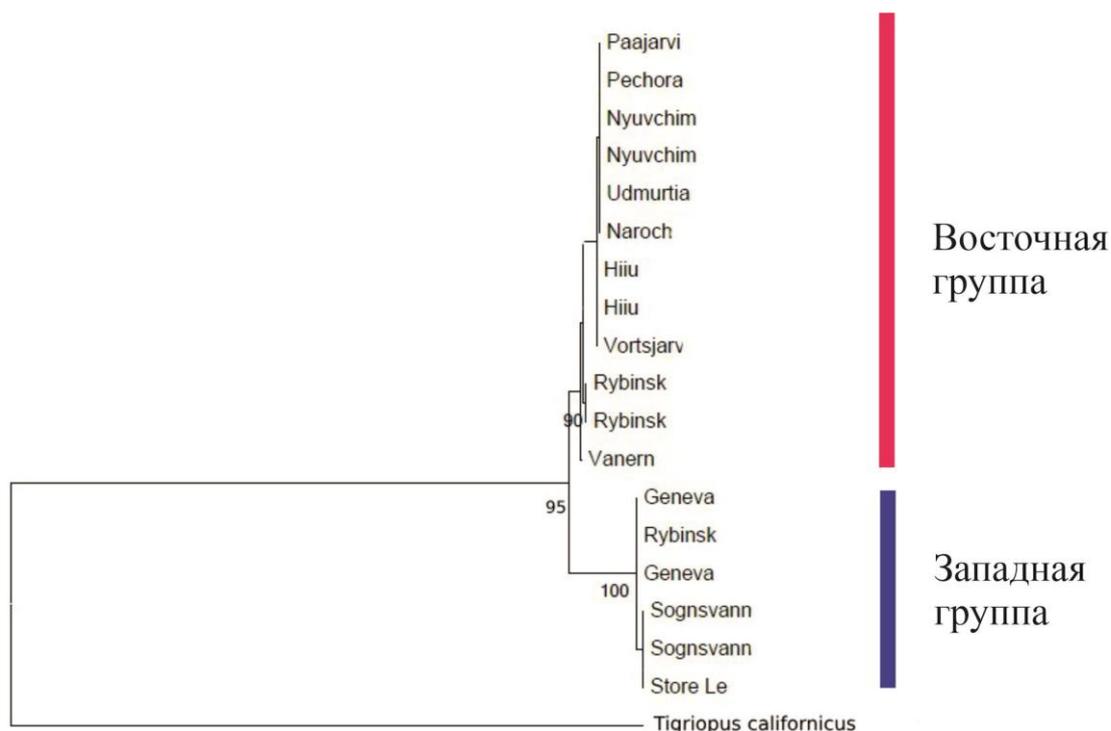


Рисунок 12. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия на основе нуклеотидных последовательностей *A. crassa* гена ITS рНК. В узлах клад обозначены значения бутстреп-поддержки. В качестве внешней группы была использована последовательность вида *Tigriopus californicus*.

Матрица генетических дистанций (Рис.13) также показывает присутствие в анализе двух основных групп, конгруэнтных кладам на филогенетических деревьях. Генетические дистанции между Западной и Восточной кладами составляли 19,6% для COI и 10,4% для ядерного маркера ITS. Дивергенция внутри групп составляла 1% (COI) и 0,9% (ITS) в Восточной кладе и 0,5% (COI) и 0,4% (ITS) в Западной Кладе.

Матрица генетических дистанций среди популяций *Attheyella crassa*

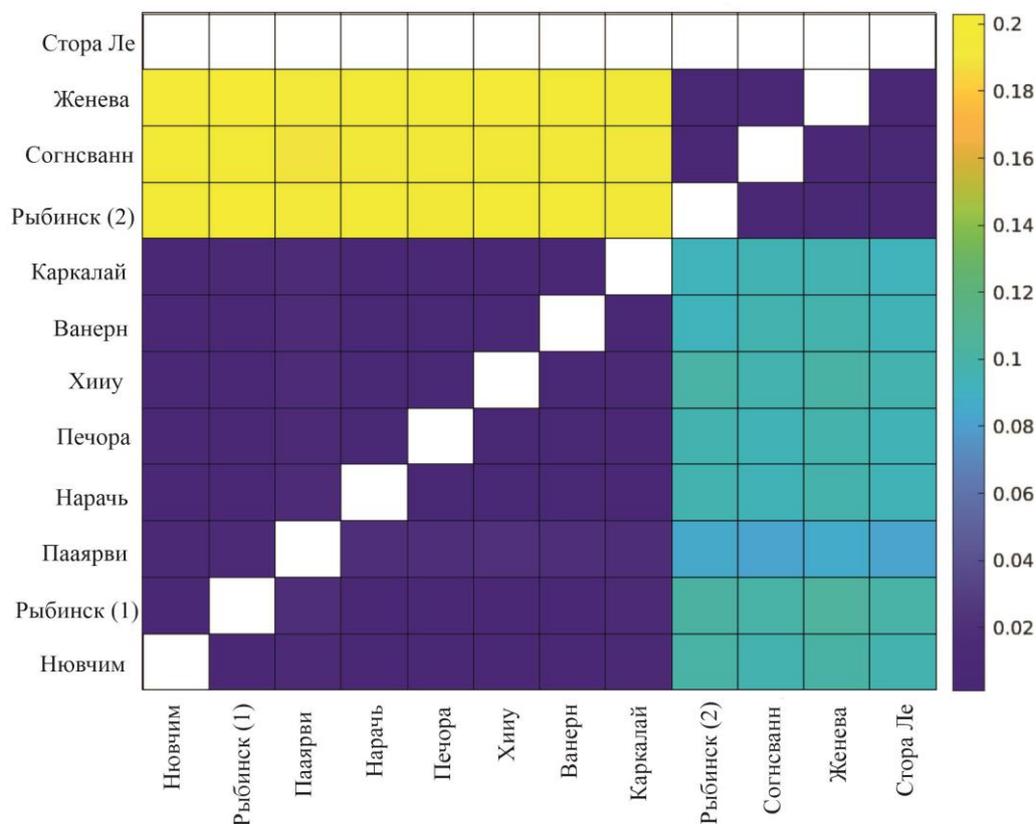


Рисунок 13. Матрица генетических дистанций, рассчитанная по модели Тамура-Ней для популяций *A. crassa*. Сверху диагонали значения для гена COI митДНК, снизу – для гена ITS рРНК.

Исследования полиморфизма *A. crassa* также подтверждают феномен высокой внутривидовой изменчивости среди копепод и гарпактицид в частности (Schizas et al., 1999; Easton et al., 2010). Несмотря на то, что морфологически, в результате анализа главных компонент, было выявлено две группы популяций, мы не можем говорить о выделении новых видов, а скорее делать вывод о наличии криптических форм потому что (1) морфологически разные группы не совпадают с кладами на филогенетическом дереве и частично пересекаются, (2) мы не выявили ярко-выраженных морфологических различий между группами, а подтвердили общую вариабельность некоторых морфометрических признаков среди популяций.

Разделение популяций на клады носит географический характер. Схожие филогеографические паттерны разделения на Западную и Восточную группы были обнаружены и в других наземных и водных европейских таксонах (Vainio and Väinölä,

2003). В целом, европейская фауна рассматривается как смесь сибирских и европейских линий, которые мигрировали в регион из рефугиальных территорий по направлению с Юга и Востока (Siivonen, 1982). Уровень дивергенции между кладами *A. crassa* также указывает на миоценовые оледенения, как период образования двух различных эволюционных линий.

Интересным фактом является то, что популяция рачков из Рыбинского водохранилища разделилась и присутствовала в двух кладах (Рис.11 и Рис.12). Следуя из этого, можно предположить, что в данном виде наблюдается не только процесс симпатрического видообразования в следствие географического факторы, но и аллопатрическое, разделяющее популяцию в одном местообитании на разные группы. Одним из возможных факторов такого разделения может служить миграция рачков на водоплавающих птицах по Черноморскому пролетному пути (Najdenski et al., 2018), которая была подтверждена и для гарпактицид (Jensen et al., 2019).

### 3.3 Филогенетическое разнообразие пресноводных гарпактицид

На основе отобранного нами материала, мы отсекали более 15 видов гарпактицид, собрали все существующие нуклеотидные последовательности пресноводных гарпактицид из баз данных NCBI и BOLD (Табл. 5) и построили общее филогенетическое древо с целью выявления основных паттернов распределения (Рис.14).

| Вид  | Семейство              | Ареал обитания       |
|--|------------------------|----------------------|
| <b><i>Canthocamptus staphylinus</i> (Jurine, 1820)</b>             | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>   |
| <b><i>Canthocamptus microstaphylinus</i> (Wolf, 1905)</b>          | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>   |
| <i>Canthocamptus vagus</i> Coker & Morgan, 1940                    | Canthocamptidae        | Неарктика            |
| <i>Canthocamptus robertckokeri</i> Wilson M.S., 1958               | Canthocamptidae        | Неарктика            |
| <i>Canthocamptus staphylinoides</i> (Pearse, 1905)                 | Canthocamptidae        | Неарктика            |
| <i>Canthocamptus coreensis</i> Chang, 2002                         | Canthocamptidae        | Ориентальная область |
| <i>Canthocamptus kitaurensis</i> Kikuchi in Ishida & Kikuchi, 1999 | Canthocamptidae        | Ориентальная область |
| <b><i>Attheyella crassa</i> (Sars G.O., 1863)</b>                  | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>   |
| <b><i>Attheyella dentata</i> (Poggenpool,</b>                      | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>   |

|  |                        |                                   |
|--|------------------------|-----------------------------------|
| <b>1874)</b>   |                        |                                   |
| <i>Attheyella trispinosa</i> (Brady, 1880)   | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>                |
| <i>Attheyella illinoisensis</i> Forbes, 1876   | Canthocamptidae        | Неарктика                         |
| <i>Nitokra hibernica</i> (Brady, 1880)   | <b>Ameridae</b>        | <b>Палеарктика и Неарктика</b>    |
| <i>Nitokra lacustris</i> (Schmankevitsch, 1875)  | Ameridae               | Палеарктика                       |
| <i>Elaphoidella gracilis</i> (Sars, G.O., 1863)  | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>                |
| <i>Elaphoidella bidens</i> (Schmeil, 1894)   | Canthocamptidae        | Палеарктика, Ориентальная область |
| <i>Pesceus schmeili</i> (Mrázek, 1893)   | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>                |
| <i>Attheyella</i> ( <i>Neomrazikiella</i> ) <i>nordenskjoldi</i> (Lilljeborg, 1902)      | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика и Неарктика</b>    |
| <i>Baikalocamptus longifurcatus</i> (Borutzky, 1931)                                     | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Байкал</b>                     |
| <i>Moraria mrazeki</i> (Scott T., 1903)  | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>                |
| <i>Moraria cristata</i> Chappuis, 1929   | Canthocamptidae        | Неарктика                         |
| <i>Moraria brevipes</i> (Sars G.O., 1862)  | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>                |
| <i>Bryocamptus minutus</i> (Claus, 1863)   | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика и Неарктика</b>    |
| <i>Bryocamptus zchokkei</i> (Schmeil, 1893)  | <b>Canthocamptidae</b> | <b>Палеарктика</b>                |
| <i>Bryocamptus nivalis</i> (Willey, 1925)  | Canthocamptidae        | Неарктика                         |
| <i>Bryocamptus stillae</i> Cottarelli & Bruno in Cottarelli, Bruno, Spina & Grasso, 2012 | Canthocamptidae        | Палеарктика                       |
| <i>Mesochra alaskana</i> Wilson M.S., 1958   | Canthocamptidae        | Неарктика                         |
| <i>Schizopera borutzkyi</i> Monchenko, 1967  | Miraciidae             | Неарктика                         |
| <i>Schizopera abei</i> Karanovic, Kim & Grygier, 2015                                    | Miraciidae             | Ориентальная область              |
| <i>Schizopera akation</i> Karanovic & Cooper, 2012                                       | Miraciidae             | Австралазия                       |
| <i>Schizopera akolos</i> Karanovic & Cooper, 2012  | Miraciidae             | Австралазия                       |
| <i>Schizopera kronosi</i> Karanovic & Cooper, 2012                                       | Miraciidae             | Австралазия                       |
| <i>Schizopera leptafurca</i> Karanovic & Cooper, 2012                                    | Miraciidae             | Австралазия                       |
| <i>Schizopera uranusii</i> Karanovic & Cooper, 2012                                      | Miraciidae             | Австралазия                       |
| <i>Kinnecaris uranusii</i> Karanovic &   | Parastenocarididae     | Австралазия                       |

|   |                     |             |
|---|---------------------|-------------|
| Cooper, 2011  |                     |             |
| <i>Stammericaris destillans</i> Bruno & Cottarelli in Bruno et al., 2017                          | Parastenocarididae  | Палеарктика |
| <i>Stammericaris diversitatis</i> (Cottarelli & Bruno in Cottarelli, Bruno, Spena & Grasso, 2012) | Parastenocarididae  | Палеарктика |
| <i>Stammericaris trinacriae</i> (Pesce, Galassi & Cottarelli, 1988)                               | Parastenocarididae  | Палеарктика |
| <i>Proserpinicaris amalasuntae</i> (Bruno & Cottarelli, 1998)                                     | Parastenocarididae  | Палеарктика |
| <i>Australocamptus hamondi</i> Karanovic, 2004  | Canthocamptidae     | Австралия   |
| <i>Elaphoidella humphreysi</i> Karanovic, 2006  | Canthocamptidae     | Австралия   |
| <i>Phyllognathopus viguieri</i> (Maupas, 1892)  | Phyllognathopodidae | Австралия   |

Таблица 5. Перечень видов, использованных для анализа филогенетической структуры гарпактицид. Жирным шрифтом помечены те, что были отсекуены нами.

Филогенетическое древо построено на основе 143 нуклеотидных последовательностей гена COI митДНК 42 двух видов (Табл. 5) из пяти семейств (Canthocamptidae, Ameridae, Miraciidae, Parastenocarididae, Phyllognathopodidae) пресноводных гарпактицид. В качестве внешней группы были использованы последовательности морской гарпактициды *Tigriopus californicus*. Каждое из семейств сформировало отдельную кладу на филогенетическом древе. Внутри клад с семействами, образцы часто группировались по родам, видам и ареалам местообитания. Например, гарпактицида *A. crassa* сформировала отдельную большую кладу на древе с таким же разделением на две группы, которое описано в предыдущем разделе, а родственные ей виды *A. trispinosa* и *A. dentata* объединились в другую соседнюю кладу. Виды *E. gracilis* и *E. bidens* также попали в одну группу. Род *Stammericaris* (совместно с одним образцом *Proserpinicaris amalasuntae*) и род *Kinnecaris* образовали отдельные группы в семействе Parastenocarididae. Примечательно, что род *Canthocamptus* отделился от других родов семейства Canthocamptidae в отдельную большую кладу, которая в свою очередь распадается на разные подклады по видам. Такое разделение говорит о парафилетической структуре семейства и возможном выделении рода *Canthocamptus* в отдельное подсемейство. Географическое положение отсекуенных видов также имеет большое значение в структуризации древа. Например, разные виды рода *Canthocamptus* из Неарктики (*C. staphylinoides*, *C. vagus*, *C. robertcockeri*) сформировали отдельную кладу от видов из

Палеарктики (*C. staphylinus*, *C. microstaphylinus*, *B. longifutcatus*). Виды *A. hamondi* и *E. humpreysi* из Австралии образовали отдельный кластер между видами рода *Canthocamptus* из Неарктики и Палеарктики. Гарпактициды рода *Schizopera* из семейства Miraciidae разделились на несколько групп в зависимости от региона обитания (Австралийская группа, Ориентальная и Неарктическая). Среди рачков семейства Ameridae также наблюдается разделение на Неарктические и Палеарктические виды. Гарпактициды из озера Байкал не сгруппировались в один кластер, а попали в две разные клады семейства Canthocamptidae, что указывает на внутриволюционное разнообразие, а также сигнализирует о возможных нескольких колонизациях этого древнего озера, однако для окончательных выводов нужны дальнейшие исследования с более обширной выборкой.

Таким образом, общее филогенетическое древо пресноводных гарпактицид выявило основные паттерны структуризации внутри отряда и подтвердило важность рассмотрения таксономической иерархии совместно с географическим распределением. Последнее является существенным фактором в изучении разнообразия и видообразования пресноводных гарпактицид в следствие изолированности популяций и лимитированного дрейфа генов между ними. Веслоногие рачки являются одними из самых древних организмов и существуют как подкласс уже более 500 миллионов лет (Huys et al., 2016). Геологическая история становления современных континентов, циклы потепления и оледенения и более локальные геофизические изменения отражаются в генетическом разнообразии копепоидов и влияют на макро- и микроэволюционные процессы (Aulsebrook, 2000).

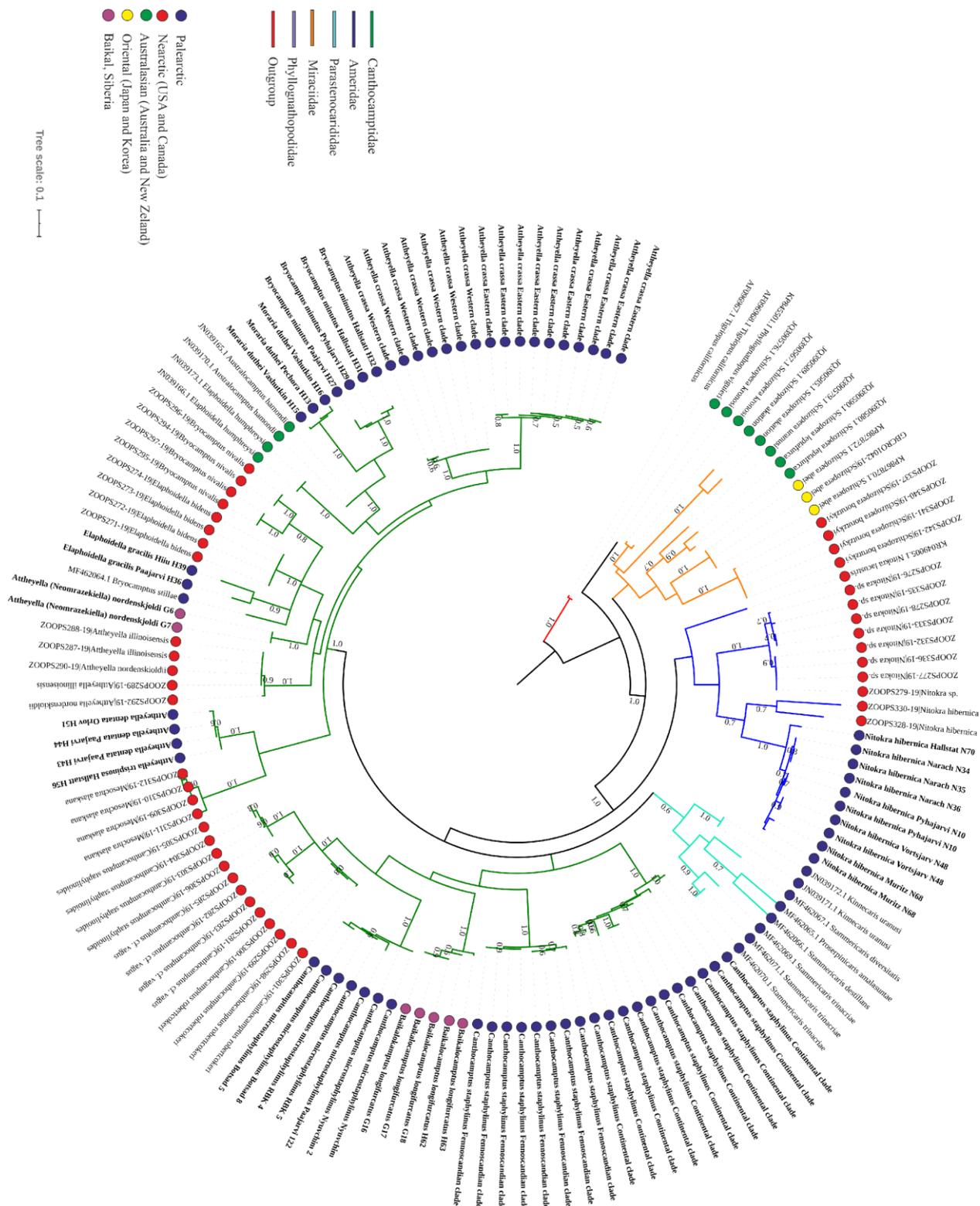


Рисунок 14. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия на основе нуклеотидных последовательностей гена COI митДНК пресноводных гарпактицид. В узлах клад обозначены значения бутрстреп-поддержки. В качестве внешней группы были использованы последовательности вида *Tigrionus californicus*.

## Выводы

1. В данном исследовании было изучено морфологическое и молекулярно-генетическое разнообразие гарпактицид *Canthocamptus staphylinus* и *Attheyella crassa*, а также филогенетические взаимоотношения между 42 видами, входящих в 17 родов и пяти семейств (*Canthocamptidae*, *Ameridae*, *Miraciidae*, *Parastenocarididae*, *Phyllognathopodidae*) пресноводных гарпактикоидных копепод.

2. Морфологический анализ популяций *C. staphylinus* определил высокую вариабельность некоторых морфологических и морфометрических признаков и выявил две наиболее различающихся группы популяций, соответствующих описанию видов *C. staphylinus* и *C. microstaphylinus*.

3. Молекулярно-генетический анализ гена COI митДНК исследованных популяций *C. staphylinus* показал высокую дивергенцию между популяциями, полифилетичную структуру вида и образовал три основных клады на филогенетическом древе – Континентальную и Фенноскандскую группы *C. staphylinus* и отдельную кладу *C. microstaphylinus*, тем самым подтвердив валидность вида *C. microstaphylinus* и выявив комплекс криптических видов внутри *C. staphylinus*. Молекулярно-генетический анализ гена 18S рРНК не выявил различий между исследованными популяциями в следствие высокой консервативности гена.

4. Морфологический анализ популяций *A. crassa* также показал высокую вариабельность некоторых морфологических и морфометрических признаков, однако четкого разделения на кластеры не было выявлено.

5. Молекулярно-генетический анализ гена COI митДНК исследованных популяций *A. crassa* определил высокую дивергенцию между популяциями, полифилетичную структуру вида и образовал две основных клады на филогенетическом древе – Западную и Восточную группы, выявив комплекс криптических видов внутри *A. crassa*. Молекулярно-генетический анализ гена ITS рРНК разделил исследованные популяции по той же схеме и выявил конгруэнтность между использованием этих двух маркеров.

6. Филогенетический анализ отсеквенированных в данном исследовании 15 видов совместно со всеми доступными в генетических базах данных видами пресноводных гарпактицид выявил общую кластеризацию видов согласно их семействам, а внутри родов и видов согласно их географическому ареалу местообитания. Клада семейства *Canthocamptidae* распалась на две группы, одна из которых состояла только из видов рода *Canthocamptus*, а другая из всех остальных.

## Заключение

В работе проведен морфологический и молекулярно-генетический анализ разнообразия пресноводных гарпактицид. Впервые были получены нуклеотидные последовательности 15 видов пресноводных гарпактицид из Палеарктики, зоографического региона, обладающего самым большим разнообразием пресноводных гарпактикоидных копепоид, которые, тем не менее, до сих пор слабо изучены с генетической стороны.

Морфологический анализ позволил выделить основные изменчивые признаки среди изученных популяций *C. staphylinus* и *A. crassa*, которые в последствии могут учитываться в определителях. Использование трех эволюционных маркеров позволило сравнивать таксоны на разных уровнях и выявить наиболее подходящие для изучения филогенетических взаимоотношений внутри вида. В результате молекулярно-генетического анализа *C. staphylinus* и *A. crassa* были выявлены комплексы криптических видов и у того, и у другого вида, которые образовались, скорее всего, в Миоцене в следствие климатических изменений и расселения популяций. Существование криптических видов может отобразиться на оценке общего биоразнообразия региона и изучения ответной реакции отдельных организмов на изменения климата. При вычислении генетических дистанций было обнаружено, что гарпактикоидные копепоиды обладают достаточно большим уровнем дивергенции между кладами (~20%), что позволяет сделать выводы о большой скорости эволюции митохондриальной ДНК у таксона.

В рамках данной работы была проведена уникальная оценка филогенетических взаимоотношений среди пресноводных гарпактицид в целом. В результате построения филогенетического древа на основе доступных нуклеотидных последовательностей были выявлены основные паттерны структуризации – это таксономический и географические факторы распределения. Было показано, что для пресноводной фауны оба фактора играют важную роль в формировании разнообразия.

Данная работа рассматривает совместную оценку морфологического и генетического разнообразия широко распространенных пресноводных гарпактицид в Палеарктике и представляет собой задел для более глубокого исследования филогеографических паттернов расселения и факторов, влияющих на современное биоразнообразие.

## Список литературы

1. Абрамсон Н.И. 2009. Молекулярные маркеры, филогеография и поиск критерия разграничения видов // Труды Зоологического института РАН. С. 185-198.
2. Боруцкий Е.В. 1952. Harpacticoida пресных вод. М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1952. 424 с. – (Фауна СССР; Т. 3, вып. 4).
3. Вехов Н. В. 1998. Ракообразные водоемов приморских участков восточного побережья архипелага Новая Земля // Биология внутренних вод. № 1. С. 14-20.
4. Гельфанд М.С. 2009. Геномы и эволюция // Вестник Российской Академии Наук 2009, том 79, № 5, с. 411.
5. Дяхтер М. Н. 1968. Видовой состав и распределение низших ракообразных мезобентоса в заливах дельты Килийского рукава Дуная // Гидробиол. журн. 1968. Том. IV. №6. С. 13-19.
6. Зиверт М.В. Опыт изучения фауны пресноводных Eucorperoda Украины. Тр. Харьковск. общ. исп. Природы. 1929. 50 (2): 3-22.
7. Корнев П.Н., Чертопруд Е.С. 2008. Веслоногие ракообразные отряда Harpacticoida Белого моря: морфология, систематика, экология. М.: Т-во научных изданий КМК. 2008. 379 с.
8. Монченко В. И., Полиук В. В. 1969. О гарпактицидах (Crustacea, Harpacticoida) советского участка низовьев Дуная и его дельты // Вестник зоологии. 1969. № 6. С. 58-64.
9. Монченко В.И. 2003. Свободноживущие циклопообразные копеподы Понто-Каспийского бассейна, - Киев: Наукова думка, 2003. – 350 с.
10. Павлова В.В. 2010. Эколого-географическая изменчивость морфологических признаков *Dreissena polymorpha* и *Dreissena bugensis* (Mollusca, Bivalvia): дис. канд. биол. наук. Борок, 2010.
11. Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С. 2014 Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). // Кострома, 2014. 215 с.
12. Фефилова Е.Б. 2006. Распространение и биотопическое распределение гарпактицид (Harpacticoida, Corperoda) на Северо-Востоке Европейской России // Биол. внутр. вод. 2006. №4. С. 9-16.

13. Фефилова Е.Б. 2017. Исследование фауны гарпактикоид (Harpacticoida, Copepoda, Crustacea) озера Глубокого // Гидробиологическая станция на Глубоком озере: Труды. Т. 11. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2017. С. 107-118.
14. Avise J.C., Johns G.C. 1999. Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification for extant species // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1999. Vol. 96. P. 7358-7363.
15. Avise, J.C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
16. Barreto, F. S., Watson, E. T., Lima T. G., Willett C. S., Edmands S., Li W., & Burton R. S. 2018. Genomic signatures of mitonuclear coevolution across populations of *Tigriopus californicus* // Nature Ecology & Evolution, 2(8): 1250 -1257.
17. Boxshall G.A., Defaye D. 2008. Global diversity of copepods (Crustacea: Copepoda) in freshwater // Hydrobiologia 595:195–207.
18. Boxshall G.A., Halsey S.H. 2004. An introduction to copepod diversity. Dorchester: The Dorset Press. Vol. 1, 2. 966 p.
19. Boxshall, G. A. & T. D. Evstigneeva, 1994. The evolution of species flocks of copepods in Lake Baikal: a preliminary analysis. In: Martens, K., B. Goddeeris & G. Coulter (eds), Speciation in Ancient Lakes. Archiv für Hydrobiologie, Ergebn Limnology 44: 235–245.
20. Bruno M.C., Cottarelli V., Hauffe H.C., Rossi C., Obertegger U., Grasso R., Spena M.T. 2017. Morphological and molecular analyses of epikarstic Parastenocarididae (Copepoda: Harpacticoida) from two Sicilian caves, with description of a new *Stammericaris* // Zootaxa. 4350(2):251-283.
21. Bucklin A., M. Guarnieri, R.S. Hill, A.M. Bentley, S. Kaartvedt, 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR // Hydrobiologia 401: 239-254.
22. Burton, R. S., R. J. Byrne, and P. D. Rawson. 2007. Three divergent mitochondrial genomes from California populations of the copepod *Tigriopus californicus* // Gene, 403:53–59.
23. Chang C.Y. 2007. Two harpacticoid species of genera *Nitokra* and *Ameira* (Harpacticoida: Ameiridae) from brackish waters in Korea // Integr Biosci. 11:247–253.
24. Chappuis, P. A. 1955. Notes sur les Copepodes. 18. Nouveaux Harpacticoides des Pyrenees. 19. Harpacticoides cavernicoles de Grece. 20. Copepodes Harpacticoides des Iles du Pacifique. Notes Biospeol., 10: 89–101.

25. Cornils, A., Held, C. 2014. Evidence of cryptic and pseudocryptic speciation in the *Paracalanus parvus* species complex (Crustacea, Copepoda, Calanoida) // *Frontiers in zoology*, 11:19.
26. De Queiroz, Kevin. 2007. Species Concepts and Species Delimitation // *Systematic Biology*. 56 (6): 879–886.
27. Defaye, D., Dussart, B. H. 2011. World directory of the Crustacea Copepoda of inland waters. III-Harpacticoida. IV-Gelyelloida. Germany: Backhuys Publ., Margraf Pub. Weikersheim.
28. Dole-Olivier, M.-J., Galassi, D.M.P., Marmonier, P., Creuze des Chatelliers, M. 2000. The biology and ecology of lotic microcrustaceans // *Freshwater Biol.* 44, 63–91.
29. Donner F. 1928. Die Harpacticiden der Leipziger Umgebung und der Schneeberger Erzbergwerke. *Intern. Rev. Hydrob. U. Hydrogr.*, 20 (3-4): 221-353.
30. Dussart, B.H. 1969. Les Copépodes des Eaux Continentales d'Europe Occidentale. 1967. I. Calanoides et Harpacticoides. 1969. II: Cyclopoides et Biologie. Paris. N. Boubée & Cie.
31. Easton E.E, Thistle D., Spears T. 2010. Species boundaries in *Zausodes*-complex species (Copepoda: Harpacticoida: Harpacticidae) from the North-Eastern Gulf of Mexico // *Invertebrate Systematics*, 24:258-270.
32. Enckell, P.H., 1980. Kräftdjur (fåltfauna). Signum, Lund, Sweden.
33. Fefilova E. 2007. Seasonal development of harpacticoid copepods in the North-East of European Russia // *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*. 170 (1): pp. 65-75.
34. Figueroa, D., Cartes, J., Figueroa, N. 2019. Insights to the genetic structure of *Calanus helgolandicus* (Calanoida: Copepoda) from deep-sea specimens in the Balearic Sea // *Crustacean Research*, 48:119-132.
35. Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, & R. Vriyenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3:294–299.
36. Frey, D. G. 1986. The non-cosmopolitanism of chydorid Cladocera; implications for biogeography and evolution // *Crustacean Issues* 4: 237–256.
37. Friers F., Ghenne V. Cryptozoic copepods from Belgium: diversity and biogeographic implications// *Belg. J. Zool.* 2000. 130 (1). P. 11–19.
38. Galassi D.M.P., De Laurentiis P. & Fiasca B. 2011. Systematics of the Phyllognathopodidae (Copepoda, Harpacticoida): re-examination of *Phyllognathopus viguieri* (Maupas, 1892) and *Parbatocamptus jochenmartensi* Dumont and Maas, 1988, proposal of a new

genus for *Phyllognathopus bassoti* Rouch, 1972, and description of a new species of *Phyllognathopus* // ZooKeys, 104: 1–65.

39. Galassi, D. M. P. 2001. Groundwater copepods: diversity patterns over ecological and evolutionary scales. // Hydrobiologia. 453/454: 227–253.

40. Gardeström, J., U. Dahl, O. Kotsalainen, A. Maxson, T. Elfving, M. Grahn, B.E. Bengtsson, and M. Breitholtz. 2008. Evidence of population genetic effects of long-term exposure to contaminated sediments—a multi-endpoint study with copepods // Aquatic Toxicology 86: 426–436.

41. Garlitzka, L., T. Neretina, D. Shepetov, N. Mugue, J. Bagulei, and A. Azovsky. 2012. Cryptic diversity of the ‘cosmopolitan’ harpacticoid copepod *Nannopus palustris*: genetic and morphological evidence // Molecular Ecology, 21:5336–5347.

42. Goetze, E. 2003. Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family *Eucalanidae* // Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 270: 2321–2331.

43. Gontcharov A.A., Marin B., Melkonian M. 2004. Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and rbcL sequence comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta) // Mol. Biol. Evol., 21(3):612-624.

44. Grebelnyi, S.D. 1996. Influence of parthenogenetic reproduction on the genotypic constitution and evolutionary success of populations and species // Hydrobiologia, 320(1):55–61.

45. Gurney, R. 1931-1933. British Fresh-water Copepoda. Vols. I-III. The Ray Society, London.

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

47. Holynska, M., Wyngaard, G. 2019. Towards a phylogeny of *Cyclops* (Copepoda): (in)congruences among morphology, molecules and zoogeography // Zoologica Scripta, 1-23.

48. Huys R., Boxshall G.A. 1991. Copepod Evolution. London: Unwin Brothers Ltd. 468 p.

49. Huys R., Mackenzie-Dodds J., Llewellyn-Hughes J. 2009. Cancrincolidae (Copepoda: Harpacticoida) associated with land crabs: a semiterrestrial leaf of the ameirid tree // Mol. Phylogenetic. Evolution, 51: 143-156.

50. Huys R., Suárez-Moralis E., Serrano-Sánchez M.L., Centeno-García E., Vega F.J. 2016. Early Miocene amber inclusions from Mexico reveal antiquity of mangrove-associated copepods [электронный ресурс] // Scientific Reports. Vol. 6. Режим доступа: <https://www.nature.com/articles/srep34872>.

51. Janetzky, W., R. Enderle, and W. Noodt. 1996. Crustacea Copepoda Gelyelloida und Harpacticoida // Süßwasserfauna von Mitteleuropa, 8(4/2):1-228.
52. Jensen, T. C., Walseng B., Hessen, D. O., Dimante-Deimantovica, I., Novichkova, A. A., Chertoprud, E. S., Chertoprud, M. V., Christoffersen, K. S. 2019. Changes in trophic state and aquatic communities in high Arctic ponds in response to increasing goose populations // *Freshwater Biology*, 2019:1–14
53. Jurine, L. 1820. Histoire des Monocles, qui se trouvent aux environs de Genève. Genève et Paris. 258 p.
54. Karanovic T, Kim K, Lee W. 2014. Morphological and molecular affinities of two East Asian Species of *Stenhelia* (Crustacea, Copepoda, Harpacticoida) // *Zookeys*. 411:105–143.
55. Karanovic, T., Cooper, S. J. B. 2011. Molecular and morphological evidence for short-range endemism in the *Kinnecaris solitaria* complex (Copepoda: Parastenocarididae), with descriptions of seven new species // *Zootaxa*, 3026, 1–64.
56. Karanovic, T., Cooper, S. J. B. 2012. Explosive radiation of the genus *Schizopera* on a small subterranean island in Western Australia (Copepoda : Harpacticoida): unravelling the cases of cryptic speciation, size differentiation and multiple invasions // *Invertebrate Systematics*, 26, 115–192.
57. Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level // *Nature*. 217 (5129): 624–6.
58. Kochanova, E.S., Gaviria, S. 2018. Integrative taxonomy of the freshwater harpacticoid *Attheyella crassa* G.O. Sars, 1863 (Crustacea: Copepoda: Canthocamptidae) in the Palearctic region // *Invert. Zool.*, 15(3):267–276.
59. Kochanova, E.S., Fefilova, E.B., Sukhikh, N.M., Velegzhaninov, I.O., Shadrin, D.M., Pylina, Ya.I., Alekseev, V.R. 2018. Morphological and Molecular-Genetic Polymorphism of *Canthocamptus staphylinus* Jurine (Harpacticoida, Copepoda, Crustacea) // *Inland Water Biol.*, 11(2):120–132.
60. Lang K. 1935. In der Gattung Epactophanes (Copepoda Harpacticoida). *Arkiv f. Zool.*, 28 A(11) : 1-27.
61. Lang, K. 1948. Monographie der Harpacticiden. Vol. 1-11. Lund.
62. Lee C.E. 2000. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate —populations // *Evolution*, 54: 2014–2027.
63. Lee, C.E., Frost, B.W. 2002. Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae) // *Hydrobiologia*, 480:111–128.

64. Machida R.J., Miya M.U., Nishida M., Nishida S. Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda) // *Mar. Biotechnol.* 2002. Vol. 4, № 4. P. 406 – 417.
65. Marrone, F., Brutto, S., Hundsdoerfer, A.K., Arculeo, M. 2013. Overlooked cryptic endemism in copepods: systematics and natural history of the calanoid subgenus *Occidodiaptomus* Borutzky 1991 (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae) // *Mol. Phylogenet. Evol.*, 66:190–202.
66. Najdenski, H., Dimova, T., Zaharieva, M.M., Nikolov, B., Petrova-Dinkova, G., Dalakchieva S., Popov K., Tokarevich, N. K. 2018. Migratory birds along the Mediterranean – Black Sea Flyway as carriers of zoonotic pathogens // *Canadian Journal of Microbiology*, 64(12): 915-924.
67. Padial JM, Miralles A, de la Riva I, Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy // *Front Zool.* 7: 16-10.1186/1742-9994-7-16.
68. Previšić, A., Gelemanović, A., Urbanič, G., Ternjej, I. 2016. Cryptic diversity in the Western Balkan endemic copepod: Four species in one? // *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100:124-134.
69. Prosser, S., Martínez-Arce, A., Elías-Gutiérrez, M. 2013. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans // *Mol. Ecol. Resources*, 13:1151–1155.
70. Reid, J.W., C.E. Williamson. 2010. Copepoda. In: J.H. Thorp, A.P. Covich. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. 3rd Ed, Academic Press/Elsevier. p. 829-899.
71. Rocha-Olivares A., Fleeger J.W., Foltz D.W. 2001. Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of ameobenthic harpacticoid copepod // *Molecular Biology and Evolution*, 18:1088–1102.
72. Rouch, R., 1986. Copepoda: les Harpacticoides souterrains des eaux douces continentales. In Botosaneanu, L. (ed.), *Stygofauna Mundi*, E.J.Brill, Leiden, 321–355.
73. Roy, J. 1931. Sur l'existence de la parthénogenese chez une espece de Copepodes (*Elaphoidella bidens*) // *C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris* 192, 8:507-509 .
74. Särkkä, J. 1992. Effects of eutrophication and organic loading on the occurrence of profundal harpacticoids in a lake in southern Finland.// *Environ. Monit. Assessment* 16: 211 - 223.
75. Sars, G.O. 1863. Oversigt af de indenlandske Ferskvandcopepoder. *Forhandlinger i Videnskabs-Selskabet i Christiania Aar.* P.212–262.
76. Sarvala J. 1979. A Parthenogenetic life cycle in a population of *Canthocamptus staphylinus* (COPEPODA, HARPACTICOIDA) // *Hydrobiologia* vol. 62, 2, pag. 113-129.

77. Sarvala, J. 1977. The naupliar development of six species of freshwater harpacticoid Copepoda. *Ann. Zool. Fennici*, 14:135–161.
78. Schizas, N. V., Dahms, H. U., Kangtia, P., Corgosinho, P., Galindo, A. M. 2015. A new species of *Longipedia* Claus, 1863 (Copepoda: Harpacticoida: Longipediidae) from Caribbean mesophotic reefs with remarks on the phylogenetic affinities of Polyarthra // *Mar Biol Res.*, 11(8):789–803.
79. Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH. 2010. Integrative taxonomy: a multiscore approach to exploring biodiversity // *Annu Rev Entomol.* 55: 421-438. 10.1146/annurev-ento-112408-085432.
80. Suárez-Morales E. 2015. Maxillopoda // J. Thorp, D.C. Rogers (eds.) *Ecology and General Biology: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*. Academic Press. P. 709-755.
81. Sukhikh, N.M., Alekseev, V.R. 2015. Genetic and morphological heterogeneity within *Eucyclops serrulatus* (Fischer, 1851) (Crustacea: Copepoda: Cyclopidae) // *Journal of Natural History*, 49:2929-2953.
82. Turesson E.U., Stiernstrom S., Minten J., Adolfsson-Erici M., Bengtsson B., Breitholtz M. 2007. Development and reproduction of the freshwater harpacticoid copepod *Attheyella crassa* for assessing sediment-associated toxicity // *Aquatic Toxicology*, 83 (2007):180–189.
83. Vainio, J. K., Väinölä R. 2003. Refugial races and postglacial colonization history of the freshwater amphipod *Gammarus lacustris* in Northern Europe // *Biological Journal of the Linnean Society*, 79:523–542.
84. Wells J.B.J. 2007. An annotated checklist and keys to the species of Copepoda Harpacticoida (Crustacea) // *Zootaxa*, 1568: 1-872.
85. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH; Sninsky JJ, White TJ (eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
86. Willett, C. S., J. T. Ladner. 2009. Investigations of fine-scale phylogeography in *Tigriopus californicus* reveal historical patterns of population divergence // *BMC Evolution*, 9:139.
87. Wolf E. 1905. Die Fortpflanzungsverhältnisse unserer einheimischen Copepoden. *Zool. Jahrb., Syst.*, 22 : 101-280.
88. Young, S., Lee, Y., Liu, M. 2014. Genetic variability and divergence of *Neutrodiaptomus tumidus* Kiefer 1937 (Copepoda: Calonida) among 10 subpopulations in the

high mountain range of Taiwan and their phylogeographical relationships indicated by mtDNA COI gene // Zool. Stud. 53, 22.

89. <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>

90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>