

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ» СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

МАЙОР ТАТЬЯНА ЮРЬЕВНА

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

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Кирильчик Сергей Васильевич

Иркутск, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Краткая характеристика отряда ракообразных веслоногих (Copepoda)	11
1.2 Видовой состав и экология циклопов в озере Байкал	13
1.3 Таксономические проблемы комплекса « <i>Diacyclops/Acanthocyclops</i> »	14
1.4 Микроэволюционные процессы у веслоногих ракообразных. Криптические виды	17
1.5 Методы филогенетического анализа	18
1.6 Эволюционные маркеры в филогении веслоногих ракообразных (Copepoda)	24
1.7 Гипотеза молекулярных часов. Эволюционное датирование у Copepoda ..	28
1.8 Диминуция хроматина. Методы оценки размеров геномов у пресноводных ракообразных	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1 Сбор материала	40
2.2 Выделение тотальной ДНК циклопов	40
2.3 Амплификация генетических маркеров	41
2.4 Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК	43
2.5 Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей ДНК	43
2.6. Молекулярно-генетический метод относительной оценки изменений размера генома с использованием ПЦР с оценкой результатов в режиме реального времени	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	48
3.1 Оптимизация условий ПЦР	48

3.2	Определение нуклеотидных последовательностей.....	52
3.3	Разнообразие нуклеотидных последовательностей гена COI.....	58
3.4	Оценка насыщения нуклеотидных замен в 3 позиции кодона.....	59
3.5	Разнообразие нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК.....	60
3.6	Филогения циклопов	61
3.7	Оценка возраста исследуемых видов.....	73
3.8	Метод относительной оценки изменений размера генома с использованием ПЦР с оценкой результатов в режиме реального времени.....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		82
ВЫВОДЫ		84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		85
ПРИЛОЖЕНИЕ А		105
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....		106
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....		107

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДХ – диминуция хроматина

млн. л. – миллион лет

мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

Оз. озеро

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с оценкой результатов в режиме реального времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

СОI – ген первой субъединицы цитохром-с-оксидазы

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Состав фауны циклопов в Байкале насчитывает 46 видов и подвигов, относящихся к 11 родам, 2 подсемействам, одному семейству (Шевелева, 2012). В зоогеографическом отношении большая часть известных циклопов Байкала (64%) являются эндемиками. По числу эндемиков озера эта группа занимает четвертое место среди членистоногих, уступая равноногим ракам, амфиподам и остракодам (Тимошкин, 2001). Циклопы в Байкале занимают все экологические ниши: пелагиаль, абиссаль, супраабиссаль, сублитораль, литораль, зону заплеска литорали, есть виды, жизнь которых связана с обитанием на теле губок. Самыми массовыми из циклопов является эврибатные виды: *Cyclops kolensis* Lilljeborg, 1901, *Mesocyclops leuckarti* (Claus, 1857), *Thermocyclops crassus* (Fischer, 1853), обитающие в открытой пелагиали, в заливах, бухтах и сорах озера. Большая часть циклопов входят в экологическую группу бентосных организмов.

Г. Ф. Мазепова, описывая 16 новых видов и подвигов байкальских циклопов, отнесла их к роду *Acanthocyclops* Kiefer, 1927, указывая на наличие признаков переходного характера между двумя родами (*Acanthocyclops* / *Diacyclops* Kiefer, 1927) (Мазепова, 1978). В современной систематике (Dussart, Deffae, 2006) родовое название для большинства этих видов указано, как *Diacyclops*. Морфологическое сходство *Diacyclops* / *Acanthocyclops*, и недостаточное стандартное описание большинства видов приводит к тому, что таксоны из одного рода переносятся в другой (Gallassi, 2004). Сложность комплекса *Acanthocyclops* / *Diacyclops* обусловлена также их относительно древним возрастом и богатым видовым составом. Род *Diacyclops* включает более чем 100 видов и является самым многочисленным и разнообразным родом среди всех циклопообразных (Stoch, 2001; Монченко, 2003). Ряд ученых предполагает, что оба рода являются парафилитическими или полифилитическими родами (Stoch, 2001; Hołyńska, 2011).

Как отмечает Н. Г. Шевелева, большинство работ по байкальским циклопам посвящены описанию новых видов и лишь немногие посвящены их экологии (Шевелева, 2012). В последнее время появились работы по изучению байкальских циклопов с помощью молекулярных методов. Часть из них посвящена оценке размеров геномов и проблеме диминуции хроматина у Cyclopoida. Но в то же время эта сравнительно многочисленная группа организмов в Байкале остается еще малоизученной. Не решены вопросы, касающиеся родственных связей циклопов и истории происхождения их в озере (время и пути проникновения на данную территорию, наиболее вероятные предковые формы, влияние геолого-климатических и др. факторов, генеалогия появления каких-либо признаков - монофилетичность или парафилетичность их появления).

Степень разработанности. Веслоногие ракообразные, к которым относятся циклопы, представляют собой самую многочисленную группу среди многоклеточных животных (Humes, 1994). На начало работы по теме диссертации было опубликовано только несколько исследований митохондриальных и ядерных маркеров для успешного разрешения филогенетических отношений в этой группе (Bucklin et al., 2003; Goetze, 2003; Nuys et al., 2006). В настоящее время в базе данных GeneBank среди всех имеющихся нуклеотидных последовательностей для рода *Diacyclops* 48% получены в данной работе. Филогенетические отношения эндемичных байкальских циклопов и история происхождения их в озере были предположены Г. Ф. Мазеповой ранее только на основании морфологических признаков (Мазепова, 1978).

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

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК для двух наиболее популярных независимо наследуемых молекулярных маркеров -

фрагментов генов первой субъединицы цитохромоксидазы (COI) митохондриального генома и гена 18S рибосомной РНК ядерного генома.

2. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей; оценка межвидового и межродового полиморфизма выбранных эволюционных маркеров и построение филогенетических схем.

3. Сравнение топологии филогенетических схем с современной систематикой байкальских циклопов.

4. Оценка возраста исследуемых видов с помощью молекулярных часов.

5. Разработка и оптимизация метода относительной оценки размера диминуций с помощью количественной ПЦР

6. Оценка эволюционной согласованности изменения размера диминуций хроматина и филогении циклопов.

Научная новизна работы. Впервые были получены молекулярно-генетические данные для циклопов из оз. Байкал. Проведена предварительная реконструкция филогенетических взаимоотношений между представителями 6 родов из двух подсемейств Cyclopinae и Eucyclopinae, обитающих в Байкале и его водосборном бассейне. Определены нуклеотидные последовательности ДНК фрагментов генов COI и 18S рРНК, проведен филогенетический анализ и оценка возраста для 12 видов из сложного в таксономическом определении комплекса *Acanthocyclops* / *Diacyclops*. Заложены основы для дальнейшего изучения молекулярной филогении пресноводных циклопов. Пригодность используемых маркеров для филогенетических реконструкций оценена на разных таксономических уровнях. Выявлена проблема в таксономическом определении байкальских циклопов. Предложен молекулярно-генетический метод относительной оценки изменений размера генома у циклопов с использованием ПЦР с оценкой результатов в режиме реального времени. Метод апробирован на 4 видах циклопов. Впервые обнаружена ДХ у *Megacyclops viridis* (Jurine, 1820) в размере 91%. Показана эволюционная несогласованность изменения размера диминуций хроматина и филогении циклопов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационной работы расширяют представление о филогенетических взаимоотношениях байкальских циклопов и времени происхождения самой многочисленной и высокоэндемичной группы циклопов в озере, относящейся к родам *Diacyclops* и *Acanthocyclops*. В базу данных генетических последовательностей GeneBank депонировано 45 рДНК и 56 мтДНК нуклеотидных последовательностей. Разработанный и апробированный метод оценки размера генома с использованием ПЦР-РВ позволит интенсифицировать исследования процессов диминуции хроматина у циклопов.

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

Положения, выносимые на защиту:

1. Выявлены две филогенетические группы, по морфологическим признакам сходные с тремя эндемичными байкальскими видами *D. versutus* (Mazepova, 1961), *D. improcerus* (Mazepova, 1950) и *D. galbinus* (Mazepova, 1961).
2. Молекулярные данные показали, что род *Acanthocyclops* является полифилетическим.
3. Метод оценки относительного размера генома с помощью ПЦР-РВ является простым, быстрым и эффективным и может использоваться для изучения молекулярной эволюции циклопов, в частности диминуции хроматина.

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

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

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

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

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

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследований автора, выполненным согласно планам исследовательских работ в группе эволюционной генетики ЛИН СО РАН. Автор непосредственно участвовал

в экспедиционных и экспериментальных работах; в анализе и интерпретации полученных результатов; в написании научных публикаций.

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

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Краткая характеристика отряда ракообразных веслоногих (Copepoda)

Класс ракообразных (Crustacea) принадлежит к типу членистоногих (Arthropoda), подтипу жабродышащих (Branchiata), представители которого ведут в основном водный образ жизни. Очень кратко ракообразные могут быть охарактеризованы как животные с билатерально-симметричным, неравномерно-членистым телом, группирующимся в отделы, и передвигающиеся посредством подвижно присоединенных к телу парных, как правило, двуветвистых и членистых конечностей. Тело ракообразных покрыто хитинизированной, нередко пропитанной известью кутикулой. Она образует панцирь, который служит животным наружным скелетом; у некоторых систематических групп он образует двустворчатую раковину, защищающую рачка от неблагоприятных воздействий внешней среды и хищников. Мускулатура состоит из поперечно-полосатых волокон, объединенных в мышечные пучки, которые соединяют сегменты и членики, обеспечивая разнообразие движений. Высшие ракообразные дышат жабрами, представляющими пластинчатые придатки ног – эиподиты. Мелкие низшие раки обычно дышат покровами тела. Развитие низших раков протекает с метаморфозом, сопровождается рядом последовательных линек (типичная ранняя личинка – науплиус); у высших метаморфоз часто укорочен, развитие прямое: молодь внешне отличается от родителей только размерами и наличием половых придатков (Тимошкин, 1995).

Веслоногие ракообразные (Copepoda) являются очень древней группой животных, вероятно, отделившихся от других таксонов членистоногих в период 388 - 522 млн. лет назад (Regier, 2005). Отряд включает 11500 видов, входящих в 200 семейств, хотя эти данные могут составлять всего 15% от фактического

количества видов (Huys, Boxshall, 1991). Таким образом, веслоногие ракообразные представляют собой самую многочисленную группу среди многоклеточных животных, включая крайне многочисленных насекомых и нематод (Humes, 1994).

Веслоногие ракообразные встречаются в самых разнообразных местах обитания (пресная вода, морская вода, морские отложения, влажная почва, подземные воды и др.) при различных температурных и солевых режимах. В водной среде они встречаются от глубин более 10000 метров в Филиппинской впадине до высот 5540 метров в Гималайских горах (Machida, 2004).

Кроме свободноживущих форм Copepoda участвуют в различных взаимоотношениях с широким кругом хозяев. Более половины известных видов живут в симбиотических отношениях с другими организмами. Они паразитируют практически на всех таксонах животных, начиная от губок и до позвоночных, включая млекопитающих. В основном это морские формы и взрослые стадии (Bron, 2011).

Что касается подотряда Cyclopoida, то более разнообразны представители пресноводных форм. Некоторые виды встречаются почти повсеместно. Этому способствуют, прежде всего, высокая морфологическая пластичность видов и приспособления к перенесению неблагоприятных условий. Некоторые виды циклопов живут исключительно во временных усыхающих водоемах, могут переносить полное промерзание луж и вмерзание в лед. В воде циклопы передвигаются порывистыми скачкообразными движениями и способны выполнять, подобно самолету-истребителю, разнообразные «фигуры высшего пилотажа», что позволяет этим хищным рачкам успешно охотиться за отдельными экземплярами мелких водных обитателей. Падают (опускаются) циклопы пассивно, головой вниз (Тимошкин, 2001). Большинство циклопов хищники, но среди них есть и растительноядные виды. Растительноядные циклопы являются первичными консументами в планктонных сообществах и участвуют практически во всех пелагических пищевых цепях. Науплиарные стадии наиболее ценны в трофических связях, так как они преимущественно

представляют пищевой ресурс для рыб и их молоди (Kiesling, 2002). Кроме этого циклопы являются промежуточными хозяевами ленточных и круглых червей, паразитирующих в позвоночных животных, в частности в домашних, а также в человеке (Тимошкин, 2001). Таким образом, значение циклопов в жизни внутренних водоемов очень велико.

1.2 Видовой состав и экология циклопов в озере Байкал

Состав фауны циклопов в Байкале насчитывает 46 видов и подвигов, относящихся к 11 родам, двум подсемействам, одному семейству (Шевелева, 2012). В зоогеографическом отношении большая часть описанных циклопов (64%) являются эндемиками Байкала. По числу эндемиков эта группа занимает четвертое место среди членистоногих, уступая равноногим ракам, амфиподам и остракодам (Тимошкин, 2001). Одну треть этого списка занимают представители рода *Diacyclops*, которые все являются эндемиками, за исключением вида *D. bicuspidatus* (Claus), 1857. Последним из описанных видов этого рода в Байкале является *D. zhimulevi* Sheveleva, Timoshkin, 2010. Этот вид относится к самым мелким из описанных циклопов в озере. Размеры половозрелой самки составляют в среднем 0,32 мм без фуркальных щетинок. Н. Г. Шевелева с соавт. отмечает, что *D. zhimulevi* является только одним из представителей целой группы неописанных мелких псаммофильных циклопов с длиной тела не более 0,5 мм, обитающих в литорали Южного Байкала (Sheveleva, 2010).

Циклопы в Байкале занимают все экологические ниши: пелагиаль, абиссаль, супраабиссаль, сублитораль, литораль, зону заплеска литорали, есть виды, жизнь которых связана с обитанием на теле губок. Самыми массовыми из циклопов является эврибатные виды: *Cyclops kolensis*, *Mesocyclops leuckarti*, *Thermocyclops crassus*, обитающие в открытой пелагиали, в заливах, бухтах и сорах озера. *C. kolensis* обитает как на малых глубинах (1 - 3 м), так и на глубине 250 - 300 м, но предпочитает верхний 0 - 50 м горизонт открытой пелагиали. В

течение года он входит в структурообразующее ядро зоопланктона, составляя 30 - 60% его численности. *M. leuckarti* и *Th. crassus* относятся к более теплолюбивым формам, эти циклопы достигают массового развития в мелководной зоне, заливах и бухтах. Так *M. leuckarti* в заливе Мухор в период открытой воды составляет основу зоопланктона, на его долю приходится от 18 до 93% общей численности (Шевелева, 2005). Другой теплолюбивый вид *Th. crassus* занимает лидирующее положение по численности среди низших ракообразных в Посольском и Северо-Байкальском сорах.

Большая часть циклопов входят в экологическую группу бентосных организмов. Один из них обитает на урезе литорали (зона заплеска) – это *Diacyclops eulitoralis* Alekseev, Arov, 1986. Наиболее предпочитаемые глубины для байкальских циклопов, по данным Г. Ф. Мазеповой – это литораль и сублитораль (Мазепова, 1978). Менее разнообразна фауна циклопов на глубинах более 250 м. В недавно опубликованной работе по байкальским циклопам отмечены в сборах 4 вида, обитающих на глубинах от 830 м до 1425 м (Шевелева, 2012). Это *Acanthocyclops profundus profundus* Mazepova, 1950, *Diacyclops talievi* (Mazepova, 1970), *Diacyclops konstantini* (Mazepova, 1962), *Paracyclops baicalensis* Mazepova, 1962. Специальные сборы циклопов с помощью аквалангистов и исследование тонкой морфологии подтвердили предположение об обитании пяти видов (*D. spongicola* (Mazepova, 1962), *D. arenosus* (Mazepova, 1950), *D. incolotaenia* (Mazepova, 1950), *D. jasnitskii* (Mazepova, 1950), *D. intermedius* (Mazepova, 1952)) на губках.

1.3 Таксономические проблемы комплекса «*Diacyclops* / *Acanthocyclops*»

Род *Diacyclops* включает более чем 100 видов и является самым многочисленным и разнообразным родом среди всех циклопообразных (Монченко, 2003; Stoch, 2001). Род распространен во всем мире, с несколькими

космополитическими видами. Большинство представителей широко распространены в Евразии и Северной Америке, несколько видов и подвидов известны из тропиков и умеренного Южного полушария (Hołyńska, 2009). Род *Acanthocyclops* состоит из 75 видов, большая часть которых населяет Голарктику. Общее количество видов для этих родов является приблизительным числом, так как в настоящее время таксоны из одного рода переносятся в другой и обратно (Gallassi, 2003). Род *Diacyclops* можно также назвать самым проблематичным в семействе Cyclopidae (Monchenko 2000; Stoch, 2001). Систематический статус рода *Diacyclops* вызывал дискуссию среди ученых с начала его описания. В связи с морфологическим сходством родов *Diacyclops* и *Acanthocyclops* В.М. Рылов и некоторые другие авторы (Rylov, 1948; Damian-Georgescu, 1963) сводил их в один род *Acanthocyclops*. Используя 5 ногу (P5) в качестве основного родового признака в семействе Cyclopidae, Kiefer (1927, 1967) разделил род *Acanthocyclops* на два рода: *Acanthocyclops*, с подродом *Acanthocyclops s.str.* и *Megacyclops*, и *Diacyclops*. Монченко (1985), Dussart и Deffae (1985) и Einsle (1993) согласно системе Kiefer приняли *Acanthocyclops* и *Diacyclops*, как валидные таксоны. В обоих родах P5 состоит из отдельного базиподального членика, который не срастается (иногда срастается в *Diacyclops* согласно Kiefer (1929)) с сомитом, несущего одну внешнюю щетинку и одного свободного дистального членика, несущего один шип и одну щетинку. В роде *Acanthocyclops* шип короткий и приблизительно равен длине дистального членика P5, и занимает субапикальную внутреннюю позицию, тогда как в *Diacyclops* этот шипик длиннее дистального членика P5 и является апикальным или субапикальным (Laurentis, 2004). Тем не менее, недавний прогресс в исследовании циклопов в Северной Америке и описание новых видов с необычным строением и вооружением P5 (Boxshall, 1993; Reid, 1994) поставили под сомнение статусы и определение родов и отразили необходимость в ревизии систематических взаимоотношений в рамках семейства Cyclopidae. Вооружение P5, как оказалось, не является полным родовым диагностическим признаком. Reid (1999) перенесла *Diacyclops virginianus* Reid, 1993 в новый установленный род *Rheocyclops*; Reid и Ishida (2000) также перенесли *Diacyclops yezoensis* (ItoTak,

1953) в новый род *Itocyclops*; Karanovic (2000) установил новый род, *Rheidcyclops*, чтобы вместить виды *Diacyclops trajani* Reid, Strayer, 1994, *Diacyclops dimorphus* Reid, Strayer, 1994 и *Diacyclops imparilis* Monchenko, 1985, характеризующиеся 2-членистой P5 и половым диморфизмом во всех плавательных ногах. Учитывая своеобразное вооружение пятой ноги и специфическую форму антенны, Karanovic (2000) предположил, что виды *D. incolotaenia*, *D. jasnitskii*, *D. intermedius*, *D. spongicola* и *D. eulitoralis* из озера Байкал, могут формировать отдельный род, эндемичный для озера Байкал. Позже Karanovic (2005) описал два новых рода *Abdiocyclops* и *Zealandocyclops* из комплекса *Acanthocyclops/Diacyclops* и отнес к последнему байкальские виды *D. eulitoralis* и *D. biceri* Boxshall, Evstigneeva, Clark, 1993.

Г. Ф. Мазепова, описывая 16 новых видов и подвидов байкальских циклопов, отнесла их к роду *Acanthocyclops*, указывая на наличие признаков переходного характера между двумя родами (*Acanthocyclops / Diacyclops*) (Мазепова, 1978). И таким образом в вопросах систематики и таксономии придерживалась системы В.М. Рылова (1948). В современной систематике (Dussart, 2006) родовое название для большинства байкальских эндемичных видов указано, как *Diacyclops*.

Таким образом, таксономические трудности в определении группы «*Diacyclops / Acanthocyclops*» возникают вследствие их морфологического сходства и недостаточного стандартного описания большинства видов. Сложность комплекса *Acanthocyclops / Diacyclops* обусловлена также их относительно древним возрастом и богатым видовым составом. Ряд ученых предполагает, что ни *Diacyclops*, ни *Acanthocyclops* не являются монофилетическими, а возможно пара- или полифилетическими родами (Stoch, 2001; Hołyńska, 2011). В настоящее время комплекс "*Diacyclops / Acanthocyclops*" нуждается в таксономической ревизии.

1.4 Микроэволюционные процессы у веслоногих ракообразных.

Криптические виды

Thum и Harrison (2009) в своем исследовании *Skistodiaptomus* (Copepoda: Calanoida: Diaptomidae) отмечают, что у веслоногих ракообразных, появление новых видов часто сопровождается лишь небольшими морфологическими изменениями или их отсутствием. Среди работ по биоразнообразию копепод часто встречаются исследования, демонстрирующие примеры криптических видов (Lee, 2000; Monchenko, 2002; Goetze, 2003). Под криптическими видами понимают группу видов, которые соответствуют биологическому определению вида и репродуктивно изолированы друг от друга, но морфологически очень схожи. Причинами возникновения криптических видов у Copepoda могут служить давление отбора, поддерживающего постоянство данного морфотипа и характер полового поведения, слабо связанного с визуальными сигналами. Хеморецепция и механорецепция, видимо, играют решающую роль в распознавании при скрещивании у Copepoda. Самки копепод выделяют половые феромоны, которые воспринимаются самцами при помощи хемосенсорных щетинок (эстетасков) первых антенн (Ohtsuka, 2001). Существует мнение, что криптические виды являются эволюционно молодыми таксонами и находятся в процессе активного формообразования.

Виды - двойники могут встречаться, как среди широко распространенных, предполагаемых видов - космополитов (Grishanin, 2005), так и среди симпатрических видов (Marrone, 2013; Gutierrez-Aguierre 2014). Как правило, криптические виды находят случайно в ходе молекулярно - генетических исследований. Определяемые, как один вид по макроморфологическим признакам особи принадлежат к разным генетически изолированным линиям. Подобные результаты приводят к изучению тонких морфологических признаков для вида и в некоторых случаях обнаружению таксономически пригодных характеристик для

его разделения (Miracle, 2013). Такие виды принято считать, как «псевдокриптические» (Lajus, 2015).

1.5 Методы филогенетического анализа

Модели эволюции нуклеотидных последовательностей

Модель молекулярной эволюции описывает процессы генетических изменений посредством фиксированных мутаций и составляет основу эволюционного анализа генетических данных на молекулярном уровне (Arenas, 2015). В Таблице 1. отражены основные параметрические модели эволюции нуклеотидных последовательностей, вложенные в популярные пакеты филогенетических программ PHYLIP, PAUP*, MEGA, MRBAYES.

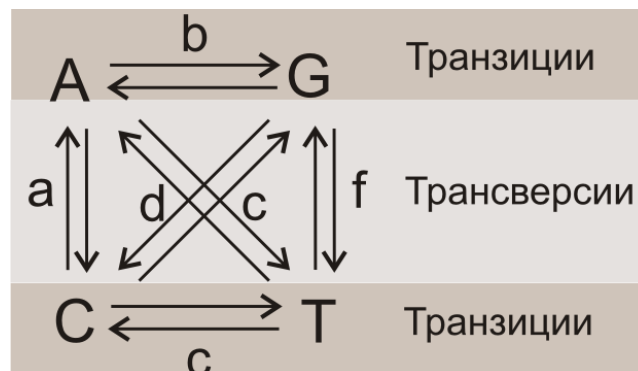


Рисунок 1. Матрица нуклеотидных замен (Boss, Posada, 2005).

Самая первая и простая модель Джукса и Кантора (JC) предполагает равные частоты нуклеотидов и однородную скорость всех типов замен. Модели Таджимы – Нея (TN84) и Фельзенштейна (F81) являются расширением модели JC и в их формулах есть корректировка, учитывающая разные частоты нуклеотидов. Факт большей частоты транзиций над трансверсиями в большинстве типов генов привел к развитию двухпараметрической модели Кимуры (K2P), учитывающей эти особенности, и ее расширению: модели Тамуры и Тамуры - Нея. Самой общей является эволюционная модель GTR (General Time Reversible Model), которая

учитывает различные частоты нуклеотидов (4 параметра) и все типы замен между ними (6 параметров). Модель LogDet корректирует возможные ассиметричные скорости нуклеотидных замен среди сравниваемых последовательностей (Lockhardt et al.,1994).

Таблица 1. Параметрические модели эволюции нуклеотидных последовательностей. Замены нуклеотидов обозначены согласно матрице нуклеотидных замен (Рисунок 1)

Модель нуклеотидных замен	Количество параметров	Частота нуклеотидов	Скорость замен нуклеотидов	Ссылка
JK69	1	$\pi_A = \pi_G = \pi_C = \pi_T = 0,25$	$a = b = c = d = e = f$	Jukes, Cantor, 1969
F81	4	$\pi_A, \pi_G, \pi_C, \pi_T$	$a = b = c = d = e = f$	Felsenstein, 1981
TN84	4	$\pi_A, \pi_G, \pi_C, \pi_T$	$a = c = d = f = b = e$	Tajima, Nei, 1984
K2P	2	$\pi_A = \pi_G = \pi_C = \pi_T = 0,25$	$a = c = d = f, b = e$	Kimura, 1981
Tr92	3	π_G, π_C	$a = c = d = f, b = e$	Tamura, 1992
TrN93	7	$\pi_A, \pi_G, \pi_C, \pi_T$	$a = c = d = f, b, e$	Tamura, Nei, 1993
HKY	6	$\pi_A, \pi_G, \pi_C, \pi_T$	$a = c = d = f, b = e$	Hasegawa, 1985
SYM	6	$\pi_A = \pi_G = \pi_C = \pi_T = 0,25$	a, b, c, d, e, f	Zharkih, 1994
GTR	10	$\pi_A, \pi_G, \pi_C, \pi_T$	a, b, c, d, e, f	Rodriguez et al., 1990

Эволюционные модели могут быть дополнены долей стабильных сайтов (I) и вариацией скоростей замен среди варьируемых сайтов (Лукашов, 2009). Гамма-распределение (G) используется для расчета данной вариации. Статистически гамма - распределение является независимой моделью и может быть добавлено к любой уже существующей эволюционной модели. Форма гамма - распределения определяется параметром α , установление которого для определенного набора последовательностей является отдельной задачей. При $\alpha < 1$, гамма-распределение имеет экспоненциальную форму. В этом случае большинство сайтов нуклеотидов не варьируемы или имеют очень низкие скорости замен. Увеличение параметра α приближает гамма-распределение к нормальному распределению, когда большинство сайтов имеют среднюю скорость эволюции и небольшое количество сайтов имеют очень высокие или очень низкие скорости эволюции. Вариация скоростей замен среди сайтов в этом случае становится все более несущественной (Boss, Posada, 2005).

Несмотря на существование большого количества эволюционных моделей, полученных из многочисленных комбинаций параметров, разрабатываются новые модели, которые могут привести к более точным филогенетическим выводам. Но эти модели еще не реализованы в большинстве популярных филогенетических пакетов (Arenas, 2015; Cao, 2016).

Использование одной конкретной эволюционной модели в сравнение с другой может изменить результат анализа, и выбор модели является очень важным этапом в филогенетической реконструкции. Рассматривая модели необходимо учитывать размер набора данных, количество различий в заменах между разными нуклеотидами и постоянство скорости эволюции и во времени, и вдоль последовательности (Boss, Posada, 2005). Статистическими подходами для выбора эволюционной модели являются тест отношения правдоподобия (LRT), информационный критерий Акаике (AIC), Байесовский информационный критерий (BIC).

Методы генетических расстояний

Методы генетических расстояний включают основные этапы: 1) выбор модели молекулярной эволюции; 2) создание матрицы попарных генетических расстояний между анализируемыми последовательностями; 3) построение филогенетического дерева.

Наиболее популярным методом генетических расстояний является метод присоединения соседей (NJ), разработанный Сайтоу и Неи (Saitou, Nei, 1987). Принципом метода является последовательный поиск пары операционных таксономических единиц (ОТЕ), которая минимизирует общую длину ветвей на каждой стадии кластеризации ОТЕ, начинающийся со звездоподобного дерева. Длины ветвей оцениваются методом Фитча и Марголиаша (Fitch, Margoliash, 1967). NJ строит топологию дерева, допуская наличие вариации скорости эволюции разных ветвей дерева. Выбранная пара ОТЕ на следующем этапе рассматриваются, как единая ОТЕ и количество таксонов уменьшается на единицу ($N - 1$), строится новая матрица сумм длин ветвей и процедура поиска продолжается, пока все ($N - 3$) внутренние ветви не будут найдены. Таким образом, строится дерево без корня. Важным этапом в филогенетической реконструкции является укоренение дерева. Это можно сделать, добавив внешнюю группу, тогда корнем будет узел, соединяющий внешнюю и анализируемые группы или принять за корень середину самой длинной ветви дерева.

Преимуществами данного метода являются простота; низкие вычислительные требования; использование полученного дерева, в качестве начальной точки в других вычислительных подходах; пригодность для данных с варьирующими эволюционными скоростями; анализ больших количеств последовательностей (Mount, 2008; Лукашов, 2009; Лухтанов, 2013; Сао, 2016). Слабыми сторонами являются сокращение анализируемой информации, построение единственного возможного конечного дерева и зависимость от корректного выбора эволюционной модели.

Методы анализа дискретных признаков

Методы анализа дискретных признаков рассматривают непосредственные различия между последовательностями в определенных позициях. Таким образом,

данные методы используют всю доступную информацию в каждом гомологичном сайте анализируемой группы последовательностей (De Bruyn, 2014). Среди этих методов широко используют метод максимальной экономии MP (maximum parsimony) (Fitch, 1971), метод максимального правдоподобия ML (maximum likelihood) (Felsenstein, 1981) и метод Байесовской вероятности (Huelsenbeck, Ronquist, 2001).

Метод максимальной экономии

Принципом метода максимальной экономии является поиск филогенетического дерева (или набора деревьев), требующего минимального количества эволюционных изменений во время дивергенций анализируемых последовательностей. Программы, использующие MP, строят в основном бескорневые деревья. Алгоритм метода максимальной экономии включает 1) поиск всех филогенетически информативных позиций; 2) для каждого дерева вычисление минимального количества замен в каждой информативной позиции и их суммирование для всех позиций; 3) выбор наиболее экономного дерева (или набора деревьев) с минимальным значением суммы замен. Филогенетически информативной считается позиция, в которой у рассматриваемых последовательностей ДНК есть два или более отличающихся нуклеотида, каждый вариант которого представлен, как минимум в двух последовательностях (Лукашов, 2009). Чем больше филогенетически информативных позиций, тем надежнее будет построенное дерево. Недостаток информативных позиций влечет чрезмерно большой набор альтернативных равновероятных деревьев.

Возможность сравнить альтернативные топологии сгенерированного набора деревьев методом максимальной экономии является его преимуществом. Метод MP подходит для анализа небольшого количества близких последовательностей (Mount, 2008). Если в наборе данных есть обратные или параллельные замены, неравные скорости эволюции среди последовательностей, то метод MP может генерировать ошибочную топологию филогенетического дерева (Nei, Kumar, 2000; Felsenstein, 2004; Лухтанов, 2013, Bryant, 2017).

Метод максимального правдоподобия

Метод максимального правдоподобия является широко используемым статистическим методом оценки параметров, в том числе и в биологии (Nei, Haeseler, 2009). Фельзенштейн разработал алгоритм реконструкции филогенетических деревьев по аминокислотным и нуклеотидным последовательностям с использованием метода максимального правдоподобия (ML) (Felsenstein, 1973, 1981). Метод ML позволяет рассчитать максимальную функцию правдоподобия заданного набора последовательностей для каждой топологии дерева. Топология с наивысшим значением максимального правдоподобия выбирается, как окончательное дерево.

Согласно выбранной эволюционной модели для каждого дерева постепенно оценивается вероятность $P_{ij}(t)$ замещения за определенное время одного нуклеотида i на другой j в данном сайте, где $i, j \in \{A, G, C, T\}$, на протяжении всей последовательности. Далее производится максимизация функции правдоподобия дерева путем варьирования длин ветвей.

В анализе выполняются два важных предположения: 1) изменения в различных сайтах в последовательности независимы и представляют вероятностные случаи; 2) в дивергентных линиях эволюция происходит независимо.

Метод максимального правдоподобия более точный и менее подверженный эффекту притяжения длинных ветвей в отличие от MP (Nei, Kumar, 2000; Лухтанов, 2013). Он позволяет анализировать линии с отличающимися эволюционными скоростями. Слабыми сторонами метода ML являются зависимость от корректного выбора модели молекулярной эволюции и продолжительность анализа (Dhar, Minin, 2015).

Метод Байеса

Метод Байеса (BI) для построения филогенетических деревьев был предложен в 90-е гг. XX в. и реализован в программе MRBAYES (Huelsenbeck et al., 2001). Принципом данного подхода в филогенетической реконструкции является определение распределения апостериорных вероятностей для филогенетических деревьев и выбор конечного древа (или набора деревьев) с

максимальной апостериорной вероятностью. Апостериорная вероятность определяет вероятность конкретного дерева с учетом априорного распределения параметров филогенетического анализа – эволюционной модели, топологии дерева, длин ветвей; и наблюдаемых молекулярных данных. В MRBAYES используется алгоритм Монте - Карло по схеме Марковской цепи (MCMC) и алгоритм Метрополиса в сочетании с MCMC (MC³) для оценки распределения апостериорных вероятностей деревьев, что уменьшает вычислительную сложность метода. Главной идеей MCMC является повторяющееся создание небольших случайных изменений некоторых текущих значений параметров с последующим принятием или отклонением этих изменений в соответствии с их оцененными апостериорными вероятностями (Ronquist et al, 2009).

Преимуществами метода Байеса являются простая интерпретация результатов; возможность включить априорную информацию; некоторые вычислительные преимущества; возможность получить апостериорное распределение в любом случае; использование сложных многопараметровых эволюционных моделей (Huelsenbeck et al., 2001; Ronquist et al., 2012). Как и метод ML, метод Байеса оказывается зависимым от правильного выбора эволюционной модели и требует больших объемов вычислений.

1.6 Эволюционные маркеры в филогении веслоногих ракообразных (Copepoda)

В настоящее время, количество молекулярных маркеров, используемых для филогенетических исследований веслоногих ракообразных (Copepoda), остается небольшим по сравнению с таковыми для других эукариотических животных. Большинство исследований по молекулярной систематике посвящено анализу на разных таксономических уровнях: от популяционного до уровня семейств, с использованием митохондриальных генов COI и 16S или ядерных генов,

кодирующих 18S рРНК и 28S рРНК, их внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1, ITS2), а также фактора элонгации трансляции - 1 альфа (Lee, 2000; Goetze, 2003; Machida, 2006; Adamovicz, 2007; Thum, Harrison, 2009, Figueroa, 2010). Из этого ряда выделяется исследование Regier с соавт. (2010), так как в нем использованы 62 уникальных ядерных протеин-кодирующих гена для глубокой филогенетической реконструкции членистоногих, включая отряды Cyclopoida и Calanoida.

Митохондриальные гены

Полные митохондриальные геномы прочитаны для ряда представителей Copepoda (Machida, 2002; Ki, 2009; Minxiao, 2011; Austin, 2014; Su, 2014; Fenc, 2015). Показано, что длина мтДНК составляет в среднем 14 – 15 т.п.н. Только мтДНК *Calanus sinicus*, Brodsky, 1962 имеет размер 20460 п.н. (Minxiao, 2011). Количество генов у представителей *Paracyclopina nana* Smirnov, 1935 (Cyclopoida), *C. sinicus* (Calanoida), *Pandarus rhincodonicus norman* Newbound, Knott, 2000 (Siphonostomatoida) отличается от типичного набора митохондриального генома ракообразных. В мтДНК *P. nana* есть 23 тРНК, но нет гена АТФ-синтазы 8. У *C. sinicus* - 20 тРНК, а у *P. rhincodonicus norman* - 12 белок-кодирующих генов. Отличительной чертой также является и измененный порядок генов в мтДНК у *P. nana*, *Tigriopus japonicus* Mori, 1938, *C. sinicus*, *Sinergasilus polycolpus* (Markevich, 1940) (Copepoda: Poecilostomatoida). Klippert, Podsiadlowski (2006) еще ранее предположили, что перестановка генов в мтДНК встречается у ракообразных и может использоваться в филогенетических исследованиях. Результаты исследования полного митохондриального генома пресноводного циклопа *P. nana* показывают высокую степень дивергенции нуклеотидных последовательностей всех белок-кодирующих генов при сравнении с другими веслоногими ракообразными. Последовательности генов COI и цитохрома *b* оказались самыми консервативными (Ki, 2009).

Исследования показывают филогенетическую информативность последовательности гена COI и 16S рРНК на видовом уровне, в частности и для

Crustacea (Bucklin, 2003; Adamowicz, 2006). Так, к примеру, Bucklin (2003) определила филогенетические взаимоотношения 34 видов, входящих в 10 родов и 2 семейства подотряда Calanoida (Copepoda), анализируя участок COI длиной 639 пн. Было показано, что различия последовательностей COI между видами разных родов составляет 12 - 25%, между видами одного рода – 9 - 24%. Эти значения намного больше полученной внутривидовой вариации (1 - 4%). Для большинства анализируемых видов, последовательности COI двух или трех особей различались 1 - 2 % оснований. Более высокие значения вариации (>2%) были в основном результатом сравнения экологически или географически изолированных популяций. Также встречаются работы с использованием параллельно двух генетических маркеров мтДНК (Goetze, 2003).

Таким образом, фрагменты мтДНК широко используются в качестве эволюционных маркеров в филогенетических исследованиях веслоногих ракообразных. Однако использование информации только по мтДНК может привести к ошибочным результатам, вследствие эффекта отбора, амплификации псевдогенов, межвидовой гибридизации (Harst, 2005). Параллельное использование ядерных эволюционных маркеров помогает получить более правдивую филогенетическую картину.

Рибосомные гены

Гены эукариот, 18S, 5.8S, 28S, кодирующие рРНК представляют собой массив из tandemно повторяющихся транскрипционных единиц и нетранскрибируемого спейсера (IGS), локализованный в определенных сайтах хромосом – ядрышковых организаторах. В транскрипционной единице гены рРНК разделены двумя внутренними спейсерами (ITS1 и ITS2) (Hillis, Dixon, 1991; Moss, Stefanovsky, 1995). Для некоторых членистоногих животных, в том числе веслоногих ракообразных, показан необычный порядок генов рРНК в транскрипционной единице. У *Calanus finmarchicus* (Gunnerus, 1770) и *C. glacialis* (Copepoda: Calanoida) обнаружены четыре кодирующих рРНК гена в tandemном повторе в следующем порядке 5' 18S - 5.8S - 28S - 5S 3' (Drouin, 1992; Wingaard, 1995). Разная скорость эволюции среди фрагментов рДНК, позволяет сравнивать

близкие и далекие таксоны в филогенетическом анализе. Гены рРНК показывают медленную скорость эволюции, тогда как внутренние транскрибируемые спейсеры полиморфны. Еще одним преимуществом рДНК, в качестве эволюционного маркера, является ее генетическая гомогенность. Степень сходства копий из массива рРНК внутри геномов и между особями одного вида высока, тогда как между видами накапливаются различия. В процессе гомогенизации рДНК, названном согласованной эволюцией, участвуют неравный кроссинговер и генная конверсия (Hillis, Dixon, 1991; Odorico, Miller, 1997). В изучении филогении *Copepoda* ряд ученых использовали рибосомные гены для анализа таксонов высокого (Rocha-Olivares, 2001; Kiesling, 2002; Goetze, 2003; Yamauchi, 2005; Huyis, 2006). Внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 использовали в исследованиях взаимоотношений близких видов *Copepoda*, в том числе циклопов (Ki, 20009; Zagoskin, 2014; Capua, 2017). Однако, известны примеры несогласованной эволюции ядерной рДНК среди ракообразных (Ko, Jang, 2002; Harpke, Peterson, 2006). Внутригеномные различия среди рДНК могут быть вызваны локализацией повторов рДНК на негомологичных хромосомах, превышением скорости мутации, над скоростью гомогенизации, интрогрессией. В случае с несогласованной эволюцией могут быть затруднения прямого определения нуклеотидной последовательности рДНК из ПЦР-продуктов и интерпретации данных.

Использование в филогенетическом анализе нескольких независимых генетических маркеров позволяет получить более полную информацию, что показано во многих работах. Так, например, при исследовании семейства *Eucaliniidae* (*Copepoda*) Goetze (2003) параллельно анализировала дивергенцию мтДНК и ядерной рибосомной ДНК. В результате было показано, что три генетических локуса (16S рРНК мтДНК, ITS2, 18S рДНК) сильно отличаются по скорости эволюции, и каждый полезен в разрешении различных вопросов филогении семейства. Из них локус 16S рРНК мтДНК является самым вариабельным и его уровень дивергенции (1.6 – 42%) более подходит для дифференциации видов и подвидов. Использование нескольких генетических

маркеров необходимо также и для видов с достаточно низкой скоростью эволюции рДНК при установлении взаимоотношений. Так в исследовании Kiesling (2002) показано, что последовательность региона 28S рДНК достаточно вариабельна для сравнения большинства видов Copepoda. Но два исследуемых вида имели идентичные последовательности этого региона. Для дифференциации этих видов были получены последовательности ITS1, ITS2, гена 5.8S рРНК. В результате они также были идентичны для двух видов. Возможно, что эти виды на самом деле являются лишь морфологическими вариантами одного вида. В другом случае в этих двух видах, может быть, рДНК эволюционирует более медленно, чем у других исследуемых видов Calanoida (Copepoda).

Таким образом, мтДНК на сегодняшний день является уникальным маркером для эволюционных и популяционно-генетических исследований. Информация, полученная с помощью мтДНК, является фундаментом, который позволяет оценить необходимость использования дополнительных, независимых маркеров с разными моделями наследования и разной скоростью эволюции. Параллельное использование нескольких независимых маркеров дает возможность не только получить максимум информации, но и протестировать данные, полученные по каждому типу маркеров.

1.7 Гипотеза молекулярных часов. Эволюционное датирование у Copepoda

Гипотеза молекулярных часов

В 1960-х гг. Цукеркандл и Полинг обнаружили статистическую пропорциональность между количеством аминокислотных различий в гомологичных белковых последовательностях и временем их дивергенции от общего предка. Позднее ученые сформулировали концепцию «молекулярных эволюционных часов», согласно которой скорость эволюции в определенных белковых молекулах приблизительно постоянна во времени. (Zuckerkandl,

Pauling, 1962; Zuckerkandl, Pauling, 1965). Примерно в то же время Кимура разработал нейтральную теорию молекулярной эволюции. В первом ее принципе он выделил постоянство скорости молекулярной эволюции (Kimura, 1985). Скорость эволюции любого белка, выраженная через число аминокислотных замен на сайт в год, приблизительно постоянна и одинакова в разных филогенетических линиях, если только функция и третичная структура этого белка остаются в основном неизменными.

На сегодняшний день тысячи исследователей в своих работах упоминают использование молекулярных часов для установления времени дивергенции видов (например, в исследовании ракообразных (Chen, 2001; Regier, 2005; Corn, 2013)). Применение гипотезы молекулярных часов дало возможность получать данные о времени расхождения организмов, палеонтологическая летопись которых ограничена или отсутствует – большая часть беспозвоночных животных, бактерии, вирусы, а также эволюционно молодые таксоны (подвиды) (Arbogast et al., 2002).

Первая модель молекулярных часов – строгие (глобальные) молекулярные часы - предполагает наличие одинаковой и постоянной во времени эволюционной скорости для определенного гена среди всех линий (Zuckerkandl, Pauling, 1962). Однако развитие методов определения нуклеотидных последовательностей ДНК и полученные данные привели к пониманию, что разные части генома (site effect) и филогенетические линии (lineage effect) могут эволюционировать с разной скоростью. Исследования вируса гриппа показало увеличение темпов его эволюции в 1990 г., что выявило еще и временной эффект гетерогенности скорости эволюции (epoch effect) (Drummond, 2010; Lee, 2016). На скорость эволюции в филогенетических линиях могут влиять следующие факторы: время генерации; размер популяции; скорость и качество репликации и репарации ДНК; изменение коэффициента селекции; жизненный цикл вида; масса тела; температура тела (Wilke, 2009; Nabholz, 2016). Gilloly (2005) многие эти факторы связал в две большие гипотезы, объясняющие гетерогенность эволюционной скорости: гипотеза скорости метаболизма и гипотеза времени генерации. Гипотеза

скорости метаболизма предполагает, что большинство мутаций вызвано генетическими повреждениями в результате действия свободных радикалов, образующихся в ходе метаболизма и ускоренным синтезом ДНК у организмов с высокой метаболической скоростью (Martin, Palumbi, 1993). Согласно второй гипотезе времени генерации большинство мутаций вызвано ошибками в репликации ДНК во время клеточного деления. Таким образом, скорость мутации должна быть связана с числом делений в линиях зародышевых клеток и временем генерации соответственно.

Для установления соответствия эволюции анализируемого участка генома определенной группы организмов модели молекулярных часов, был развит тест относительных скоростей эволюции (*relative-rate test*) (Sarich, Wilson, 1973). Этот тест основан на использовании внешней группы и проверяет наличие статистически достоверных различий между длинами ветвей анализируемых последовательностей (Лукашов, 2009). Разработаны также и другие тесты на установление молекулярных часов: тест отношения правдоподобий (*likelihood ratio test*) (Felsenstein, 1988), информационный критерий Акаике (Akaike, 1974) и Байесовский информационный критерий (Bollbas, 2005).

Если строгие часы отклоняются, то одной из дальнейших стратегий в анализе можно считать исключение генов и видов из дерева, которые возможно увеличивают гетерогенность эволюционной скорости. Далее были разработаны более сложные модели молекулярных часов, которые смогли обрабатывать различные формы гетерогенности эволюционной скорости, а также быстро проводить анализ больших, на уровне геномов, объемов генетических данных (Таблица 2) (Britton et al., 2002; Lepage et al., 2007; Drummond, 2010; Lee, 2016; To et al., 2016; Kumar, Hedges, 2016). Временные оценки расхождения одних и тех же таксонов, посчитанные даже методами третьего поколения могут отличаться в разных молекулярных исследованиях (Kumar, 2012). Предполагают, что эти различия могут быть из-за использования различного количества точек калибровки, различного размера набора последовательностей, различных

филогений, используемых для оценки времени и различные модели вариации скорости эволюции.

Калибровка молекулярных часов

Молекулярные часы сами по себе дают только относительную оценку времени дивергенции таксонов. Как отмечает Tamura (2012), относительное время дивергенции, посчитанное методом RelTime, можно успешно использовать несколькими способами. Во-первых, относительное время может непосредственно использоваться для определения интервалов эволюционных случаев в филогении. Во-вторых, полученное распространение эволюционных скоростей (относительных) на древе показывает клады и линии с существенно более низкими или высокими скоростями. В-третьих, относительные времена, полученные из молекулярных данных можно напрямую сравнивать с имеющимися временными оценками, посчитанными по немолекулярным данным, например, палеонтологическим. В-четвертых, сравнивая относительное время дивергенции, полученное методом RelTime и время, посчитанное Баесовским и др. методами с использованием различных калибровок, можно диагностировать эффект калибровки молекулярных часов на абсолютное время дивергенции. В-пятых, относительное время может быть переведено в абсолютное время. Для этого необходимо калибровать молекулярные часы по внешним данным: предковая ДНК, ископаемые остатки, биогеографические события (Аверьянов, 2013; Wilke, 2009). Можно также использовать скорость молекулярных часов, посчитанную в других исследованиях близкородственных организмов. Калибровка часов, наряду с правильным выбором модели вариации эволюционной скорости, считается одним из самых чувствительных моментов в оценке времени дивергенции. Непосредственно предковую ДНК можно получить из ископаемых остатков и музейных образцов. В последнем случае эта ДНК будет предковой для быстро эволюционирующих организмов, таких как вирусы и бактерии.

Ископаемые остатки трудно вставить в современную филогению, и они ограничены для многих групп организмов. В анализе молекулярных часов данные

по ископаемым остаткам лучше использовать, как нижнюю границу. Так как эти данные говорят о существовании морфологического вида, а не дивергенции его или тем более его нуклеотидных последовательностей. Проблемы биографических событий, связаны с определением точного возраста геологических событий и специфической оценкой геологического события в контексте биологии соответствующего вида (Wilke, 2009).

Таблица 2. Краткое сравнение моделей молекулярных часов

Модель молекулярных часов	Принципы	Преимущества	Недостатки
Первое поколение: Строгие (глобальные) молекулярные часы	Предположение о постоянной скорости эволюции вдоль всего филогенетического древа.	Простой и быстрый анализ небольшого количества данных для близкородственных таксонов.	При вариации скорости эволюции модель отклоняется.
Второе поколение: Коррекционная модель (Takezaki, 1995; Hedges, 1996)	Исключение из анализа ветвей и генов (в комбинированном анализе по нескольким генам) с отличающимися скоростями эволюции.	Глобальные часы могут быть приняты.	Потеря информации.
Третье поколение: Непараметрическая модель (Sanderson, 1997; Sanderson, 2002)	Алгоритм оптимизации, чтобы минимизировать изменения в скоростях среди линий. Предположено, что скорости эволюции между близкими видами более схожи, чем между кладами (Kimura, Hedges, 2016).	Быстро анализирует наборы данных, включающих большое количество таксонов (Simon, 2014).	Требует фиксированное филогенетическое древо.
Третье поколение:	Скорости замен оптимизируются	Обрабатывают сложные	Избыток параметров

Параметрические модели. (Thorne, 1998).	с помощью Баесовские моделирования одновременно с оценкой длин ветвей дерева.	эволюционные модели, используют множественные точки калибровки (Simon, 2014).	для оценки. Требуют выбор модели вариации скорости.
Четвертое поколение: RelTime метод (Tamura et al., 2012)	Оценка возраста в два этапа: 1) Вычисление относительного возраста узлов; 2) Использование надежных калибровочных анкером (с максимальной и минимальной границами) для вычисления абсолютного возраста узлов.	Относительное время дивергенции может интерпретироваться отдельно. Анализ не требует предварительного установления модели вариации скорости эволюции и точек калибровки. Более быстрый анализ больших наборов данных (Mello, 2017).	

Молекулярные часы у Copepoda

При оценке времени расхождения близких таксонов для Copepoda наиболее часто используют внешние скорости эволюции гена 1 субъединицы цитохром-с-оксидазы мтДНК у прибрежных крабов (Schubart, 1998) и раков-щелкунов (Knowlton, 1998), составляющие 1,66 – 2,33% и 1,4% за млн. л., соответственно (Miracle et al., 2013; Yong et al., 2014; Barrero-Mareno et al., 2015). Корнильс и Хелд в своем исследовании комплекса видов *Paracalanus parvus* Claus, 1863 (Copepoda: Calanoida) также использовали скорость эволюции 1,4% для гена COI, но подчеркнули, как и мы, что полученный возраст может быть недооценен вследствие часто наблюдаемого наличия эффекта насыщения замен в мтДНК (Cornils, Held, 2014). В датировании дивергенции рода *Acanthocyclops* Блага для гена 12S мтДНК применял скорость эволюции 1,2% (Blaha, 2011). Калибровку молекулярных часов Шубарт и Кноултон проводили на основе биогеографических данных: геологическое закрытие Панамского перешейка 3,1 млн. л.н. (Shubart, 1998; Knowlton, 1998). По современным изотопно-минералогическим, палеонтологическим и молекулярным данным Панамский перешеек существовал уже 13-15 млн. л.н. (Marco, 2002; Montes et al., 2015; Hoorn, Flantua, 2015). Из этого следует, что значение скорости эволюции митохондриальных генов, широко используемой в исследованиях ракообразных, завышено как минимум в четыре раза.

Вингаард с соавт. вообще отказались использовать молекулярные часы для оценки возраста циклопов рода *Mesocyclops*, ссылаясь на исключительно высокую скорость эволюции митохондриального генома и отсутствие достаточных палеонтологических данных для калибровки (Wingaard et al., 2010).

Модели строгих и ослабленных (relaxed molecular clock) молекулярных часов использовали в тестировании биогеографических гипотез для креветок рода *Nyctiphaes* (Malacostraca: Euphausiacea) на основе гена COI. Полученные оценки времени дивергенции ближайшего общего предка с помощью данных моделей были схожи, что свидетельствует о пригодности обеих моделей молекулярных часов (D'amato et al., 2008).

Одной из интересных работ по филогении далеких таксонов, включающих ракообразных, является анализ Gaunt, Miles (2002) 5 отрядов насекомых и 2 классов ракообразных (Branchiopoda и Malacostraca). Ген COI, был одним из пяти анализируемых генов, для которого были откалиброваны молекулярные часы по палеонтологическим данным о времени расхождения представителей отрядов Blattaria и Orthoptera. Авторы вычислили две скорости эволюции: во второй позиции кодона и аминокислотной последовательности.

К настоящему времени описано несколько находок ископаемых остатков веслоногих ракообразных, что ограничивает изучение эволюции и калибровку молекулярных часов у данной группы. Ископаемые остатки фрагментов мандибул веслоногих ракообразных, датируемые средним/поздним кембрийским периодом были найдены в мелководных морских аргиллитах в формации Дэдвуд в Саскчеване и Альберте, Канада (488 - 510 млн. л.н.) и в сланцах Ноличаки, штат Теннесси США (495 – 500 млн. л.н.) (Harvey et al., 2012; Harvey, Pedder, 2013). На основе комбинации признаков, в том числе относительно крупных мандибул, авторы предполагают принадлежность найденных фрагментов к стволовой (stem-) или группе-короне (crown-group) Copepoda. Хотя, как отмечает Хьюс, отсутствие других идентифицируемых частей тела у этих находок, ставит под сомнение подобные выводы (Huys et. al., 2016). Тысячи фрагментов ракообразных, в том числе и Copepoda, были экстрагированы из одного обломка битумной породы в ледниковом диамиктите, относящегося к позднему каменноугольному периоду (примерно 303 млн. л.н.), найденного в восточном Омане (Sleden, 2010). Установлено, что часть фрагментов принадлежат к современному космополитическому семейству гарпактицид Canthocamptidae. Находки доказывают существование современных копепод и их инвазию внутренних вод в Палеозойскую эру, предположенную ранее Бокшеллом и Джумом (Boxshall, 2000).

В Бразилии паразитические веслоногие ракообразные найдены на жабрах костистых рыб *Cladocycclus gardneri* Agassiz, 1841 позднего мелового периода (110 – 120 млн. л.н.) (Gressey, 1973). Позднее образцы были описаны, как вид

Kabatarina pettersoni Gressey, Boxshall, 1989 морского семейства Dichelesthidae отряда Siphonostomatoida (Gressey, 1989; Huys 1991).

В Мексике впервые в янтаре найдены образцы почти полностью сохранившихся особей гарпактицид, датируемые ранним Миоценом (22.8 млн. л. н.). Это самая богатая по таксономическому составу археологическая находка веслоногих ракообразных: предположительно 10 видов, принадлежащих пяти современным семействам гарпактицид Canthocamptidae, Cletodidae, Darcythompsoniidae, Ectinosomatidae, Laophontidae (Huys et al., 2016). Гарпактициды были найдены наряду с другими ракообразными: остракоды, изоподы и амфиподы.

Ископаемые копеподы, близкие к семейству Cyclopidae, впервые были найдены в Калифорнии в формации, относящейся к среднему и позднему Миоцену (23.8 – 5.3 млн. л.). Среди образцов были особи гарпактицид и циклопов (Palmer, 1960). Гарпактициды были отнесены к современному роду *Cletocamptus* Shmankewich, 1875, а циклопы не были определены. В той же формации недавно обнаружены сохранившиеся трехмерно остатки копепод, возраст которых оценен примерно 16 млн. л. (Wilkinson et al., 2010). Большинство образцов относятся к одному виду современного рода *Apocyclops* Lindberg, 1942, описанному, как *Apocyclops californicus* Hołyńska, Leggitt, Kotov, 2016, часть образцов принадлежат одному из самых многочисленных современных родов циклопов *Acanthocyclops*, а три образца определили до уровня семейства Cyclopidae (Hołyńska et al., 2016). Авторы однозначно связывают найденный вид *A. californicus* с группой из 8 видов *A. panamensis* (Marsh, 1913), допуская минимальную оценку возраста 16 млн. л. для ее дивергенции.

Таким образом, несмотря на остающиеся проблемы, молекулярные часы продолжают играть важнейшую роль в нашем понимании эволюции жизни. У Соперода абсолютное датирование дивергенции таксонов с использованием молекулярных часов ограничено скудностью калибровочных данных, и интерпретация полученных временных оценок должна быть с большой долей предположения.

1.8 Диминуция хроматина. Методы оценки размеров геномов у пресноводных ракообразных

Диминуция хроматина (ДХ) - запрограммированная элиминация части генетического материала соматическими клетками или ядрами клеток на ранних стадиях эмбриогенеза, встречающаяся в различных не связанных таксономических группах одно- и многоклеточных животных. Полный геном сохраняется в клетках зародышевого пути. Впервые процесс ДХ обнаружен при цитологическом изучении поведения хромосом в ходе митотического деления у паразитической нематоды *Parascaris univalens* (Boveri, 1887). Диминуция хроматина описана для инфузорий, некоторых паразитических нематод, циклопов, хрящевых рыб *Hydrolagus colliei* (Lay, Bennett, 1839), миксин и миног (Гришанин и др., 2006; Wang, Davis, 2014; Lin, 2016). Количество удаляемого хроматина варьирует и является видоспецифичной характеристикой: у нематоды *Ascaris suum* Goeze, 1782 ~ 13%, тогда как у другого вида нематоды *P. univalens* ~ 90%, морской миноги *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758 ~ 20%, у циклопов 45-96% (Иванкина и др., 2013; Grishanin, 2014; Streit, Davis, 2016). Применение высокопроизводительного секвенирования и ПЦР с оценкой результатов в режиме реального времени позволило сравнивать геномы соматических и зародышевых клеток. Подавляющую часть элиминируемого генетического материала у изученных видов представляют повторяющиеся последовательности, включая транспозоны (Degtyarev, 2004; McKinnon, Drouin, 2013; Sun, 2014). Кроме того в ходе ДХ у миног и нематод удаляются однокопийные гены, которые экспрессируются только в клетках зародышевого пути и ранних эмбрионов (Wang, 2012; Bryant, 2016); у копепоид уменьшается количество копий генов рРНК (Zagoskin, 2010). Существуют предположения, что биологическая роль процесса ДХ связана с формированием макронуклеуса (инфузории); определением пола (нематода *Strongyloides papillosus* (Wedl, 1856)); подавлением экспрессии генов (аскариды, *S. papillosus*, миноги); освобождением соматических клеток от

нагрузки «мусорной» ДНК, дозовой компенсацией генов (аскариды, циклопы, миноги); регуляцией клеточной дифференциации; контролем нагрузки соматических клеток повторяющимися элементами; количеством копий генов рРНК (циклопы) (Wang, Davis, 2014; Sun, 2014; Streit, 2016; Streit, Davis, 2016). Тем не менее, до сих пор биологическая роль и закономерности ДХ остаются в значительной степени неясными.

У циклопов ДХ обнаружена у 23 видов из 40 изученных (Grishanin, 2014). Два вида с ДХ *D. galbinus* и *D. incolotaenia* являются байкальскими эндемичным циклопами. При этом только семейство Cyclopidae насчитывает около 1000 видов и подвидов (Dussart, Defaye, 2006). Таким образом, расширение знаний о распространении и величине ДХ у этой группы животных, сопоставление этих данных с филогенетическими, может способствовать изучению закономерностей и эволюционной роли ДХ.

В настоящее время основным подходом для определения количества ДНК в ядре являются цитометрические методы, такие, как флуоресцентная проточная цитометрия, цитофотометрия ядер, окрашенных фуксином, флуоресцентная сканирующая цитометрия и цифровая цитофотометрия (Пальчикова и др., 2010; Семешин и др., 2011). Эти же методы применяются для оценки изменения размера генома в онтогенезе циклопов. Показателем наличия процесса ДХ является присутствие гранул элиминируемого хроматина и явные различия в количестве ядерной ДНК в эмбриональных клетках на ранних стадиях деления и клетках зародышевой линии с одной стороны и в соматических клетках взрослых особей и эмбрионов на поздних стадиях деления с другой стороны. Использование такого подхода связано с рядом затруднений. Так для оценки количества ДНК цитометрическими методами необходимо использовать серию калибраторов с разными и известными размерами генома, в диапазоне, покрывающем размер генома исследуемого организма. Кроме этого, особенности анализа предполагают обработку достаточно большой выборки образцов (несколько десятков) для получения достоверных данных.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор материала

Пробы отбирали в оз. Байкал с глубин до 40 м в 2008 - 2011 гг., в Иркутском водохранилище и в малых озерках, расположенных на берегу Байкала, с глубин до 7 м. Также были собраны циклопы из других мест, что отражено в Таблице 5. Часть проб была собрана аквалангистами, в остальных случаях орудием лова служили сеть Джели и сачок Апштейна. Пробы с живыми рачками разбирали в лабораторных условиях, самок циклопов с яйцевыми мешками фиксировали в 96% этаноле. Суммарную ДНК для молекулярного анализа выделяли из яйцевых мешков, что позволило сохранить самих особей в коллекции. При таксономическом определении циклопов использовали ключ для определения по Мазеповой (1978), ключ для определения циклопов из группы *Acanthocyclops robustus-vernalis-americanus*, предложенный в статье Miracle с соавт. (2013) и мировой каталог по веслоногим ракообразным (Crustacea: Copepoda) внутренних вод (Dussart, Defaye, 2006).

2.2 Выделение тотальной ДНК циклопов

После определения видовой принадлежности особям присваивали порядковый номер и фиксировали в 96% этаноле с последующим хранением при -20°C или выделяли тотальную ДНК из живых особей. На первом этапе выделения тотальной ДНК из фиксированных образцов, особь выдерживали в течение 10 - 15 мин. в дистиллированной воде, чтобы удалить остатки спирта, и затем отделяли яйцевые мешки. Суммарную ДНК выделяли с помощью комплекта «РИБО-сорб» (AmpliSens) вариант 100 для выделения РНК/ДНК согласно инструкции производителя или использовали лизат яйцевых мешков в буфере для ПЦР для

последующей амплификации целевых фрагментов. Лизат получали в 10 мкл: 2-кратный буфер для ПЦР, содержащий 32 мМ (NH₄)₂SO₄, 130 мМ Трис-НСl рН 8,8 (25°C), 0,2% Tween 20, 0,1 мг/мл протеиназы К, 1 - 2 яйцевых мешка от одной самки циклопа. Смесь инкубировали при температуре 65°C в течение 1 часа, далее прогревали при 94°C в течение 10 мин. для инактивации протеиназы К. Лизат хранили при -20°C.

2.3 Амплификация генетических маркеров

Для амплификации фрагмента митохондриального гена COI использовали праймеры LCO-1490, HCO-2198 (Folmer, 1994); L1384, H2612 (Machida, 2004) и LCO-142, HCO-1156. Праймеры LCO-142 (5'-CCGGGATCTCTAATAGGGGACGACC-3'), HCO-1156 (5'-AGCGAACACCGCCCCCTATTCT-3') впервые сконструированы на основе нуклеотидных последовательностей, амплифицированных с помощью праймеров L1384, H2612.

Фрагмент гена 18S рРНК получали в ходе «гнездовой» ПЦР: первую реакцию проводили с праймерами 18Sf (5' -TACCTGGTTGATCCTGCCAG-3') и 18Sr (5'-TAATGATCCTTCCGCAGGTTTCAC-3') и полученный продукт использовали во второй реакции с праймерами 554f (5'-AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC-3') и 1282r (5'-TCACTCCACCAACTAAGAAGGGC-3') (Huys, 2006). ПЦР проводили с использованием наборов для ПЦР ООО "НТИ-Байкал". Реакция проходила в присутствии 5 мкМ каждого праймера, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого дНТФ и 0,5 ед. активности Taq ДНК-полимеразы, 1 мкл лизата. Для амплификации участков рДНК использовали смеси для высокоточной ПЦР High Fidelity PCR Enzyme Mix производства Fermentas. Программа амплификации отражена в Таблице 3. Во всех случаях перед началом ПЦР реакционную смесь прогревали при 94°C 4 мин., а по окончании последнего цикла выдерживали при 72°C 10 мин.

Таблица 3. Программа амплификации

Праймеры	Денатурация	Отжиг	Элонгация	Количество циклов
LCO-1490, HCO-2198	94°C - 30 сек.	46 - 50°C* – 30 сек.	72°C - 70 сек.	30 - 40
L1384, H2612	94°C - 30 сек.	50°C – 30 сек.	72°C - 70 сек.	35
LCO-142, HCO-1156	94°C - 30 сек.	58°C – 30 сек.	72°C - 70 сек.	30 - 40
18Sf, 18Sr	94°C - 40 сек.	51°C - 40 сек.	72°C - 140 сек.	25 - 30
554f, 1282r	94°C - 40 сек.	62°C - 40 сек.	72°C - 60 сек.	25 - 30

* - Температура плавления праймеров указана в диапазоне, так как для разных видов это значение подбирали экспериментально по результатам ПЦР с градиентом температур отжига праймеров.

Разделение ампликонов проводили с помощью гель - электрофореза в 1-кратном трис-ацетатном буфере без добавления ЭДТА (0,04 М трис-ацетат, pH=7,6). Кусочки, содержащие ампликоны, вырезали из 0,6% агарозного геля, замораживали при -20°C, оттаивали и центрифугировали 10 мин. при 12000 g. Полученный элюат использовали в реакции секвенирования или клонирования. Фрагмент 18S рДНК клонировали с использованием системы pGEM-T Easy Vector (Promega). Компетентные клетки *Escherichia coli* готовили согласно протоколу, описанному Иноуэ с соавт. (Inoue, 1990). Трансформацию осуществляли методом электропорации с помощью ячеек Bio-Rad соответственно инструкции к прибору и методом теплового шока, согласно протоколу производителя системы клонирования (Promega). Параметры электропорации: 1,7 кВ, зазор ячейки 0,1 см, время импульса 3,9 - 4,6 мсек. Клетки выращивали на твердой (1,5% агар-агара) среде LB с добавлением ампицилина (100 мг/мл) (Маниатис и др., 1984) при температуре 37°C в течение 16 - 20 часов. Скрининг клонов со вставкой

проводили с помощью ПЦР, используя праймеры 554f, 1282r или универсальные плазмидные праймеры T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ - 3') и SP6 (5'-АТТТАГГТГАСАСТАТАГ - 3'). Клетки, которые содержали плазмиду с целевым фрагментом выращивали в 5 мл среды LB (37°C – сутки) и выделяли методом щелочного лизиса (Lee, 1990) с последующим секвенированием.

2.4 Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК

Для определения нуклеотидных последовательностей плазмидной ДНК со вставкой использовали те же праймеры, что и для ПЦР, а также универсальные плазмидные праймеры T7 и SP6. Нуклеотидные последовательности фрагмента COI определяли с использованием тех же праймеров, что и для ПЦР. Разделение и визуализацию фрагментов проводили в однокапиллярном анализаторе ДНК ABI310A (Applied Biosystems) в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН, г. Новосибирск и в восьмиккапиллярном анализаторе CEQ8800 (Beckman Coulter).

2.5 Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей ДНК

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и первичный анализ.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили, используя программы ClustalW, вложенную в программу MEGA 6 (Tamura, 2013) и CLC Sequence Viewer 7.5 (CLC, 2015). Полиморфизм ДНК оценивали в программе DnaSP 5.10.01 (Rozas, 2003). Эволюционную модель выбирали в программе Mega 6 и MrBayes 3.1.2, 3.2.6 (Ronquist, 2003; Ronquist et al., 2012). Генетические расстояния в анализе фрагмента COI рассчитывали модифицированным методом Ней и Годжобори (Nei-Gojobori) с учетом несинонимичных замен. Генетические расстояния в анализе нуклеотидных последовательностей COI для представителей

A. americanus (Marsh, 1893) и всех полученных нуклеотидных последовательностей 18S рДНК рассчитывали методом K2P. Наличие эффекта насыщения нуклеотидных замен определяли, оценивая корреляцию между количеством накопленных синонимичных/несинонимичных замен для гена COI и в программе DAMBE 6.4.67 (Xia, 2017).

Построение филогенетических деревьев

Филогенетические деревья строили методами объединения ближайших соседей (NJ) и максимального правдоподобия (ML) с помощью программы MEGA 6. Программу MrBayes 3.1.2, 3.2.6 использовали для построения филогенетического дерева методом Байеса. Во избежание ошибок, связанных с влиянием возвратных замен в нуклеотидных последовательностях COI мтДНК, при подсчете генетических расстояний и построении филогенетического древа использовали первую и вторую позиции кодона, несинонимичные замены и замены аминокислот. Оценку достоверности узлов проводили бут-стреп анализом с 1000 повторов и с использованием апостериорного критерия в программе MrBayes. В набор анализируемых данных включены также последовательности из банка данных GenBank некоторых представителей *Copepoda*.

Полученные нами нуклеотидные последовательности ДНК были помещены в GenBank, инвентарные номера приведены в Таблице 5.

Оценка возраста исследуемых видов с помощью молекулярных часов

Соответствие эволюции анализируемого набора данных по гену COI гипотезе «молекулярных часов» проводили в программе MrBayes 3.2.6. При оценке возраста исследуемых видов циклопов использовали внешнюю скорость замен нуклеотидов во второй позиции кодона 0,022% в млн. л. Скорость посчитана Gaunt, Miles (2002) и использовалась в анализе 5 отрядов насекомых и 2 классов ракообразных.

2.6. Молекулярно-генетический метод относительной оценки изменений размера генома с использованием ПЦР с оценкой результатов в режиме реального времени

Фиксация материала и выделение ДНК.

Циклопов и яйцевые мешки фиксировали в 96% этаноле. Перед фиксацией у живых самок с яйцевыми мешками под световым микроскопом определяли стадии деления зародыша. Яйцевые мешки с зародышами на стадии 2 - 8 клеток, т.е. до 4-го деления дробления, использовали как додминуционный (ESD-) материал. Яйцевые мешки с зародышами циклопов на более поздних стадиях делений маркировали как постдминуционный материал (ESD+). В качестве постдминуционного материала использовали, также, соматические ткани взрослых особей циклопов плавательных конечностей (BD+). Выделение ДНК проводили с помощью набора DNA Micro Kit (Qiagen). ДНК для каждой пробы выделяли как минимум из трех особей или 6 мешков. Для выявления возможного влияния РНК на эффективность амплификации часть образцов ДНК в процессе ее выделения обрабатывали РНКазой (Thermo Scientific). Концентрации суммарной ДНК и РНК определяли на флуориметре Qubit с использованием Quant-iT™ dsDNA HS assay kit и Quant-iT™ RNA assay kit (Life Technologies), соответственно.

Праймеры и стандарты

В качестве генов-мишеней использовались гены «домашнего хозяйства» бета актина (Actb) и фактора элонгации трансляции EF-1альфа (EF-1 α). Для проведения ПЦР-РВ было протестировано пять пар праймеров, из которых три пары инициировали амплификацию фрагментов Actb и две - EF-1 α .

В результате тестов не удалось выбрать единого района амплификации, который позволял бы получать корректные данные для всех анализируемых видов циклопов. Для каждого вида был выбран отдельный ампликон. Структура праймеров и размеры амплифицируемого фрагмента для каждого вида представлены в Таблице 4.

В качестве стандарта использовались 4 серии 4-х кратных (4x4) разведений экстрактов ДНК из постдиминуционных соматических тканей. Концентрации подбирались таким образом, чтобы диапазон значений C_t стандартов перекрывал значения C_t образцов.

Таблица 4. Структура, последовательность и температура отжига праймеров, используемых в исследовании

Вид	Праймер	Нуклеотидная последовательность праймера (5'-3')	Температура отжига, °C	Размер ампликона (пн)
<i>C. kolensis</i> , <i>C. insignis</i>	act-48-L	CCACAGGAGTTGTCCTTGATTCAGGT	65	92
	act-117-H	CATCCTGAGAATGGCATGGGGCA		
<i>M. viridis</i>	EF-238-L	CATCTCCGGATGGCACGGAGACAAC	60	72
	EF-286-H	ACTTCCCATCCCTTGTACCATCCC		
<i>A. vernalis</i>	act-191-L	AGGGGCTACTCTTTCACAACAACAG	63	109
	act-274-H	C CTGCTGCAGTAGCCATTTCTGTTC		

Проведение ПЦР-РВ

ПЦР-РВ проводили на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen) в 10 мкл реакционной смеси следующего состава: 0,2 мМ каждого dNTP, 1-кратный буфер Encyclo (ООО «Евроген»), 1 - кратный SYBR Green I (BioDye), 0,1 - 0,2 ед. акт. Encyclo-полимеразы (ООО «Евроген»), 0,5 пмоль/мкл каждого праймера, 0,5 нг ДНК. Условия ПЦР-РВ были следующими: первичная денатурация - 3 мин. при 95°C, затем 40 циклов: 95°C - 10 сек., 60 - 65°C (Таблица 4) - 10 сек., 72°C - 10 сек.,

плавление ампликона с увеличением температуры от 72°C до 95°C с шагом в 1°C. ПЦР каждой пробы ДНК проводили в 2 - 3 повторях.

Проведение эксперимента

Для анализа изменений размера генома мы использовали метод, основанный на использовании стандартов и анализа калибровочной кривой. Схема эксперимента состояла из следующих основных этапов: 1. определение и выравнивание концентраций растворов ДНК из ESD+, BD+ и ESD-; 2. приготовление набора стандартов 4x4; 3. постановка ПЦР-РВ с пробами ДНК ESD+, BD+, ESD- и набором стандартов в одном запуске; 4. определение размера диминуций (%) осуществлялось с использованием калибровочной кривой и формулы $CD = \Delta Ct / (CtD+) * 100$, где $\Delta Ct = (CtD-) - (CtD+)$, (CtD-) и (CtD+) - значения Ct для (ESD-) и (ESD+, BD+), соответственно.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оптимизация условий ПЦР

Для оптимизации условий выделения ДНК и проведения ПЦР использовали яйцевые мешки циклопов московской популяции *Cyclops kolensis* и *Cyclops insignis*, в большом количестве собранные и любезно предоставленные Е. А. Иванкиной (ИХБиФМ СО РАН).

Подбор метода выделения ДНК

Выделение ДНК из яйцевых мешков позволило сохранить особь циклопа в научной коллекции для последующего ее изучения. На данном этапе сравнивали два альтернативных способа выделения суммарной ДНК: с помощью протеиназы К и комплекта «РИБО-сорб» (AmpliSens) вариант 100 для выделения РНК/ДНК из особей. При визуализации амплифицированных фрагментов методом электрофореза в агарозном геле принципиальной разницы между этими двумя способами для *C. kolensis* и *C. insignis* не было выявлено. Использование метода простого лизиса с протеиназой К является менее трудоемким и более быстрым, поэтому он применялся к представителям исследуемых видов. Выделенная ДНК из свежих образцов проявляет лучшее качество в ПЦР, чем ДНК из циклопов, хранившихся в спирте.

Оптимизация условий ПЦР

Оптимизацию условий ПЦР целевых фрагментов ДНК выполняли в три этапа. Во-первых, подбирали наиболее эффективно работающие пары праймеров для ПЦР. При амплификации рДНК сравнивали работу универсальных праймеров для беспозвоночных и для *Sorcerer* в частности. В сумме было проанализировано 12 праймеров, позиции которых отражены на Рисунке 2.

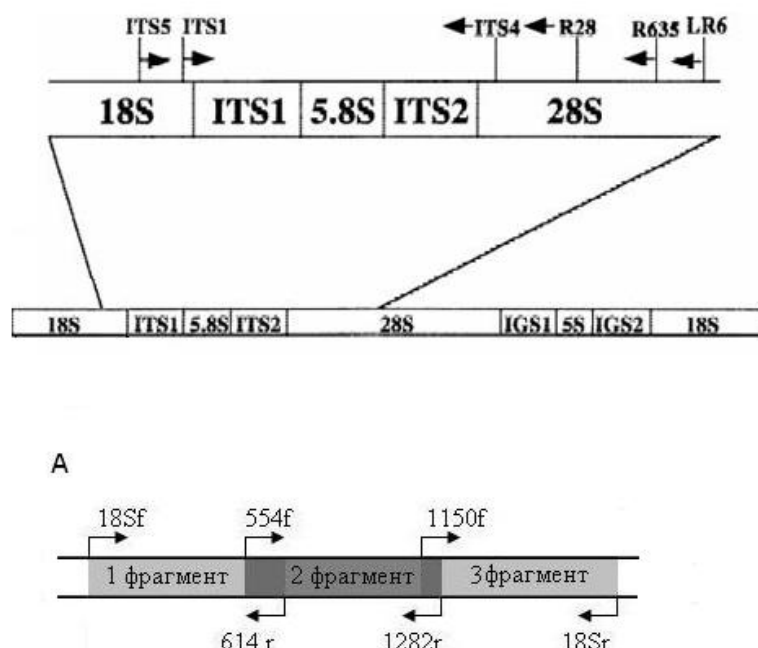


Рисунок 2. Позиции праймеров на рДНК. А - область гена 18S рРНК

Праймеры на участок рДНК, включающий области 18S, ITS1, ITS2, 5.8S и 28S, были выбраны так, что было возможно амплифицировать фрагменты, эволюционирующие с разной скоростью (Rocha-Olivares, 2001; Kiesling, 2002). Это особенно актуально согласно нашей цели при сравнении близких и далеких в эволюционном отношении таксонов. В ходе ПЦР с «гнездовыми» праймерами (ITS1, R635, ITS4) мы получали неспецифические продукты разной длины. Наблюдаемый полиморфизм фрагментов ITS может указывать на наличие нефункциональных копий (псевдогенов) рДНК в сочетании с функциональными генами (Harpke, 2006). Во избежание подобных проблем были протестированы на эффективность и специфичность амплификации еще 6 праймеров на участок гена 18S рДНК (Рисунок 2 А). Используя их в ПЦР, мы амплифицировали три последовательных фрагмента протяженностью ~700 п.н. Каждый из них мог быть выбран в качестве генетического маркера при сравнении видов, относящихся к разным родам исследуемой группы (Huys, 2006). Это заключение было также подтверждено в ходе нашего анализа нуклеотидных последовательностей 18S рДНК из банка данных GeneBank. Принципиальной разницы в работе праймеров

не было выявлено. Второй фрагмент был выбран в качестве генетического макера, так как его альтернативно можно было амплифицировать в гнездовой ПЦР, с имеющимися двумя парами праймеров: 18Sf,18Sr и 554f,1282r (Рисунок 2 А).

В амплификации фрагмента гена COI мтДНК сравнивали работу универсальных праймеров для беспозвоночных LCO1490, HCO2198 (Folmer, 1994) и таковых для веслоногих ракообразных L1384-COI, H2612-COI (Machida, 2004). Результаты ПЦР этого фрагмента у *C. kolensis* и *C. insignis* показали, более высокую эффективность и специфичность праймеров LCO1490, HCO2198 (Рисунок 3). Эта пара праймеров была выбрана для постановки ПЦР с другими исследуемыми видами, что позволю амплифицировать фрагмент мтДНК длиной около 600 п.н.

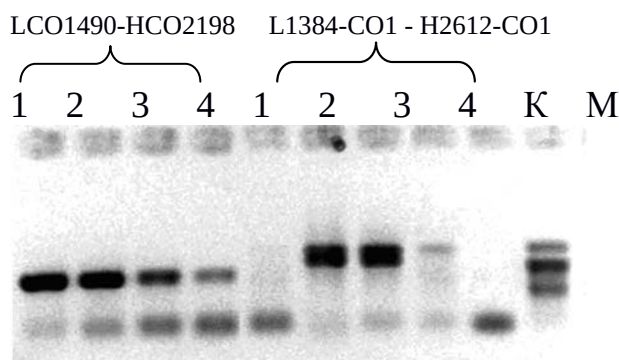


Рисунок 3. Электрофореграмма результатов ПЦР с 2 парами праймеров на COI мтДНК. 1, 2 - особи *C.insignis*; 3, 4 - особи *C.kolensis*, К- отрицательный контроль, М – маркер молекулярных масс (сверху вниз: 1500 - 100 пн)

В ходе исследования мы сконструировали специфичные для байкальских циклопов праймеры CO142, CO1156 и увеличили размер анализируемого фрагмента гена COI примерно до 1000 п.н. ПЦР протяженного фрагмента COI представителей следующих видов: *D.versutus*, *D. zhimulevi*, *A. americanus*, *A. rupestris signifler* проводили с праймерами L1384-COI, H2612-COI. Для представителей каждого нового в анализе вида экспериментально подбирали более эффективно работающие праймеры из этих двух пар.

Температуру отжига праймеров в ПЦР подбирали индивидуально для каждого вида. Особенно этот момент принципиален в амплификации гена COI, так как он является более полиморфным, чем фрагменты гена рРНК. Экспериментально подобранные значения температуры отжига праймеров LCO1490, HCO2198, варьируют от 46 до 50°C. Фотография электрофореза продуктов ПЦР с градиентом температур отжига представлена на Рисунке 4.

48°C 49°C 50°C 51°C 52°C К М

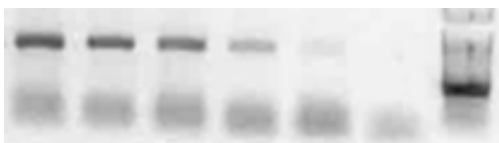


Рисунок 4. Электрофореграмма результатов ПЦР с градиентом температур отжига праймеров LCO1490, HCO2198 для *C. insignis*. Числа означают температуру отжига праймеров; К - контроль отрицательный в ПЦР, М - маркер молекулярных масс (сверху вниз: 1500-100 пн).

В случае со вторым эволюционным маркером, геном 18S рРНК, подобрать температуру отжига праймеров, при которой ПЦР-продукты были пригодны для прямого секвенирования не удалось. Несмотря на то, что фрагменты получали только желаемой длины, результаты секвенирования показывали их разнородность. По этой причине, температура отжига подбиралась с акцентом на получение фрагмента в большем количестве. Имея в наличии несколько пар праймеров на 18S рРНК, на третьем этапе оптимизации условий ПЦР мы составили наиболее удачную стратегию амплификации. Сначала получали протяженный фрагмент гена 18S рРНК с помощью праймеров 18Sf - 18Sr и далее использовали его в качестве матрицы для «гнездовой» ПЦР (Рисунок 5). Этот метод позволяет обойтись минимальным количеством выделенной суммарной ДНК в проводимом анализе. В случае ПЦР, минуя большой фрагмент, непосредственно с праймерами 554f – 1282г фрагмент синтезируются в гораздо меньшем количестве.

Как отмечалось выше, синтезированный фрагмент гена 18S рРНК был не достаточно специфичным для прямого секвенирования, поэтому мы выбрали метод клонирования для разделения уникальных последовательностей в смеси ПЦР-продуктов. Рисунок 5 отражает результаты скрининга трансформантов.

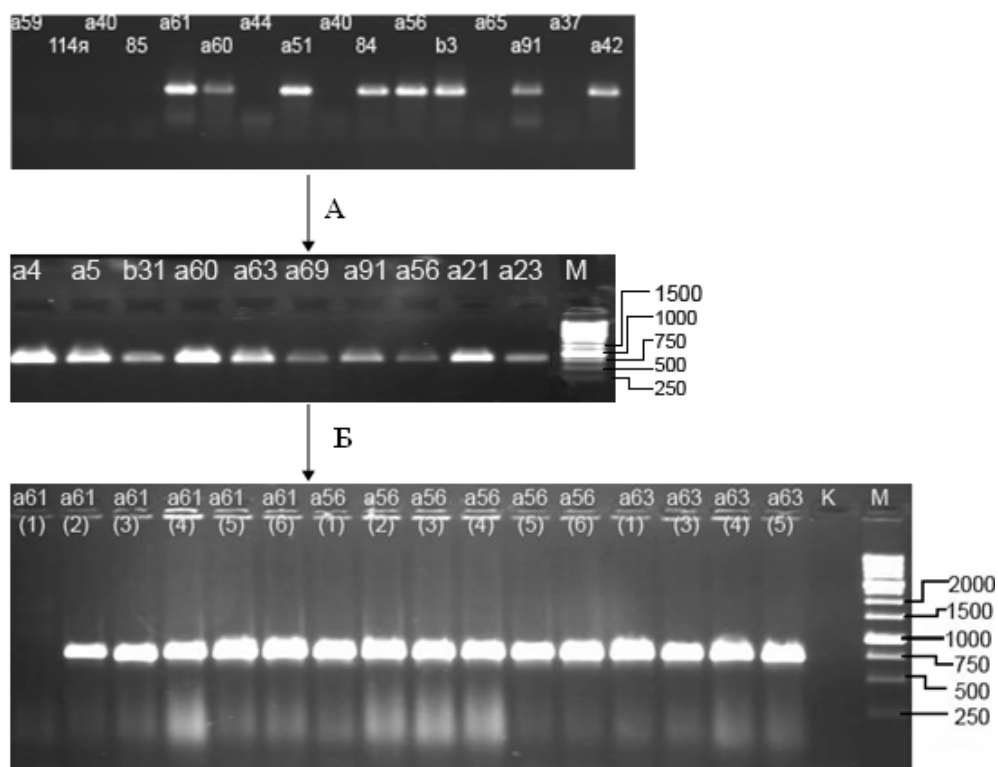


Рисунок 5. Электрофореграммы некоторых последовательных этапов клонирования. Полученный с помощью ПЦР фрагмент 18S рДНК, очищали с помощью QIAquick GelExtraction Kit (А). Далее фрагменты клонировали и проводили ПЦР с колоний с праймерами 554f и 1282г (Б). Номер дорожки соответствует номеру исследуемой особи. М – маркер молекулярного веса (числа означают количество пн); К – отрицательный контроль ПЦР

3.2 Определение нуклеотидных последовательностей

В ходе исследования получены 56 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI мт ДНК (584 - 1168 п.н.) для циклопов (Таблица 5). В анализ вошли представители мелкого псаммофильного циклопа *D. zhimulevi*, который

является последним из описанных видов в Байкале (Sheveleva, 2010). Часть особей циклопов определена только до рода *Diacyclops* и обозначена, как *D. species* (8 нуклеотидных последовательностей). Все анализируемые байкальские виды являются эндемиками озера Байкал за исключением *A. americanus* и *C. kolensis*. Для каждого вида определены нуклеотидные последовательности для 1 - 12 особей. Нуклеотидные последовательности MF150247 - MF150250 любезно предоставлены сотрудником лаб. ихтиологии ЛИН СО РАН И. Ю. Зайдыковым.

Нуклеотидные последовательности фрагмента гена 18S рРНК получены для 45 представителей 13 видов и 1 подвида циклопов, входящих в 6 родов (Таблица 5). Среди проанализированных циклопов 5 видов и 1 подвид – эндемики Байкала. Для каждого вида определены нуклеотидные последовательности ДНК от одной до четырех особей. Для каждой исследованной особи было определено от одной до четырех клонированных нуклеотидных последовательностей данного фрагмента.

Таблица 5. Список видов, для которых определены нуклеотидные последовательности фрагментов 18S рРНК и COI мтДНК

Вид	Зоогео- графия	Экология по Кожову*, Мазеповой	Место сбора	Координаты	Инвентарный номер COI в GenBank	Инвентарный номер 18S рДНК в GenBank
<i>Cyclops abyssorum</i> Sars, 1863	П	Планктонный	Богучанское водохранилище, Иркутская обл.	58°42'01" с. ш. 99°09'13" в. д	MF150248 – MF150250	-
<i>Cyclops insignis</i> Claus, 1857	П	Планктонный, трофогенный слой*	Андреевские пруды на Воробьевых горах, Москва	55°42' с.ш. 37°34' в.д.	GU055750 - GU055752	GU066282
<i>Cyclops kolensis</i> Lilljeborg, 1901	Г	Планктонный, верхняя граница абиссали	Дельта р.Селенга, Байкал	52°22' с.ш. 106°29' в.д.	GU055753; GU055754; MF150245 – MF150246	GU066284
			Андреевские пруды на Воробьевых горах, Москва	55°42' с.ш. 37°34' в.д.	GU055749, MF150251, MF150252	GU066283
			Озеро Тельбин, Киев	50°25'35" с. ш. 30°36'31" в. д.	MF150241 – MF150244	-
			Богучанское водохранилище, Иркутская обл.	58°42'01" с. ш. 99°09'13" в. д	MF150247	-
<i>Cyclops ochridanus</i> Kiefer, 1932	П	Планктонный	Озеро Охрид, Македония	41°05' с. ш. 20°45' в. д.	MF114111 - MF114115	-
<i>Diacyclops bicuspidatus</i> (Claus, 1857)	Г	Литоральный*	Малые озера, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	-	FJ825602, GU066268 - GU066272

<i>Diacyclops eulitoralis</i> Aleksseev et Arov, 1986	Э	Псаммофильный, зона заплеска	Байкал, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	GU055758	-
<i>Diacyclops improcerus</i> (Mazepova, 1950)	Э	Бентосный, Сублиторальный	Байкал, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	-	GU066277 - GU066279, GU066285
<i>Diacyclops incolotaenia</i> (Mazepova,1950)	Э	Симбиотический, сублиторальный	Байкал, с губки, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	KT075078; KT075079	GU066273 - GU066275
<i>Diacyclops jasnitskii</i> (Mazepova, 1950)	Э	Симбиотический, литоральный	Байкал, с губки, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	-	GU066280, GU066281
<i>Diacyclops konstantini</i> (Mazepova, 1962)	Э	Бентосный, супраабиссаль	Байкал, пос. Б. Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	GU055757	-
<i>Diacyclops galbinus</i> (Mazepova, 1962)	Э	Бентосный, супраабиссаль	Байкал, пр.Малое Море	53° 09' с.ш. 106° 56' в.д.	GU055755	FJ825590 - FJ825595, FJ825603, FJ825604, FJ825607, GU066263
<i>Diacyclops zhimulevi</i>	Э	Бентосный, литоральный	Байкал, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	GU055759, GU055760 KT075071; KT075072	-
<i>Diacyclops</i> sp. 2	Э	Бентосный, литоральный	Байкал, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	-	GU066286 - GU066289
<i>Diacyclops arenosus</i> (Mazepova,	Э	Симбиотический, литоральный	Байкал, пос. Листвянка	51°51'11" с.ш. 104°52'55" в.д.	KT075073 - KT075075	-

1950)						
<i>Diacyclops elegans</i> (Mazepova, 1962)	Э	Бентосный, эврибатный	Байкал, пос. Листвянка	51°51'11" с.ш. 104°52'55" в.д.	КТ075076; КТ075077	-
<i>Diacyclops versutus</i> (Mazepova, 1962)	Э	Бентосный, Сублиторальный	Байкал, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	КТ075066	-
<i>Diacyclops</i> sp. (VIG1)	Э	Бентосный, литоральный	Байкал, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	КТ075067 - КТ075070	-
<i>Diacyclops</i> sp. (VIG2)	Э	Бентосный, литоральный	Байкал, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	КТ075062 - КТ075065	-
<i>Acanthocyclops profundus tomilovi</i> Mazepova, 1950	Э	Бентосный, литоральный	Байкал, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	КТ075052 - КТ075057	-
<i>Acanthocyclops profundus profundus</i> Mazepova, 1950	Э	Бентосный, эврибатный	Байкал, пос. Листвянка	51°51'11" с.ш. 104°52'55" в. д.	КТ075058 - КТ075060	-
<i>Acanthocyclops rupestris signifera</i> Mazepova, 1952	Э	Бентосный, эврибатный	Байкал, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	КТ075050; КТ075051	-
<i>Acanthocyclops americanus</i> Marsh (1892)	Г	Планктонный	Байкал		КТ075049; КТ075061	-

<i>Eucyclops arcanus</i> Aleksseev, 1990	П	Бентосный, литоральный	Байкал, Чивыркуйский залив	53° 39' с.ш. 109°00' в.д.	-	GU066290
<i>Eucyclops serrulatus baicalocorrepus</i> Mazepova, 1955	Э	Бентосный, эврибатный	Байкал, Чивыркуйский залив	53° 39' с.ш. 109°00' в.д.	-	FJ825596
<i>Eucyclops serrulatus serrulatus</i> (Fischer, 1851)	К	Бентосный, эврибатный*	Малые озера, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	-	GU066264 - GU066267
<i>Mesocyclops leuckarti</i> (Claus, 1857)	К	Планктонный, трофогенный слой	Малые озера, пос. Б.Коты	51° 54' с.ш. 105° 4' в.д.	GU055748	FJ825599 - FJ825601, FJ825605, FJ825606
<i>Thermocyclops crassus</i> (Fischer, 1853)	К	Планктонный, трофогенный слой	Койморские болота, Тункинский район, Бурятия	51° 48' с.ш. 102° 2' в.д.	-	FJ825597, FJ825598

Примечание: К - космополит; Г- голаркт; П - палеаркт; Э - эндемик Байкала (Мазепова, 1978; Dussart, Deffae, 2006); литораль (0 - 20 м); сублитораль (20 - 70м); супраабиссаль (70 - 250м) (Кожов, 1962)

3.3 Разнообразие нуклеотидных последовательностей гена COI

При выравнивании нуклеотидных последовательностей протяженного фрагмента митохондриального гена COI общий фрагмент, исключаящий недостающие данные, для представителей рода *Acanthocyclops* составил 579 оснований, для представителей рода *Diacyclops* – 886 оснований. Анализ этого фрагмента показал наличие 168 переменных позиций, из которых 163 являются филогенетически информативными для представителей рода *Acanthocyclops* и 270 переменных позиций, из которых 265 являются филогенетически информативными для представителей рода *Diacyclops*. Внутри видов дивергенция последовательностей варьировала в пределах 0,000 - 0,006; между видами внутри одного рода 0,007 – 0,053, самое высокое значение соответствует дивергенции последовательностей *A. americanus* с байкальскими эндемичными представителями рода *Acanthocyclops*; между родами: 0,027 – 0,06. С другой стороны значение дивергенции нуклеотидных последовательностей между *A. americanus* и эндемичными представителями рода *Diacyclops* меньше и составляет 0,015 - 0,023.

Отсутствие различий между последовательностями ДНК некоторых особей, относящихся к разным видам, повлекло их повторное более подробное таксономическое определение. В результате 8 особей не было возможным достоверно определить до вида, они были в дальнейшем обозначены, как *Diacyclops* sp. и составили группы VIG 1 и VIG 2 (Таблица 6). Нуклеотидная последовательность под номером KT075066 вошла в группу VIG 2, но из-за отсутствия особи повторное таксономическое определение ее не проводилось.

Генетическая дивергенция, посчитанная методом K2P, составила 16% между, полученной нами последовательностью *A. americanus* и взятой из банка данных GeneBank *A. americanus* (KC617432) и 0% при том же сравнении с позаимствованной из GenBank последовательностью *A. robustus* (KC016187).

Таблица 6. Таксономическое определение циклопов на разных этапах исследования

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

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

3.4 Оценка насыщения нуклеотидных замен в 3 позиции кодона

Рисунок 6 показывает характер изменения количества синонимичных замен кодонов относительно несинонимичных замен. Отсутствие с определенного момента увеличения синонимичных замен при увеличении количества несинонимичных замен свидетельствует о наличии эффекта насыщения синонимичных замен в наборе нуклеотидных последовательностей гена COI для байкальских циклопов.

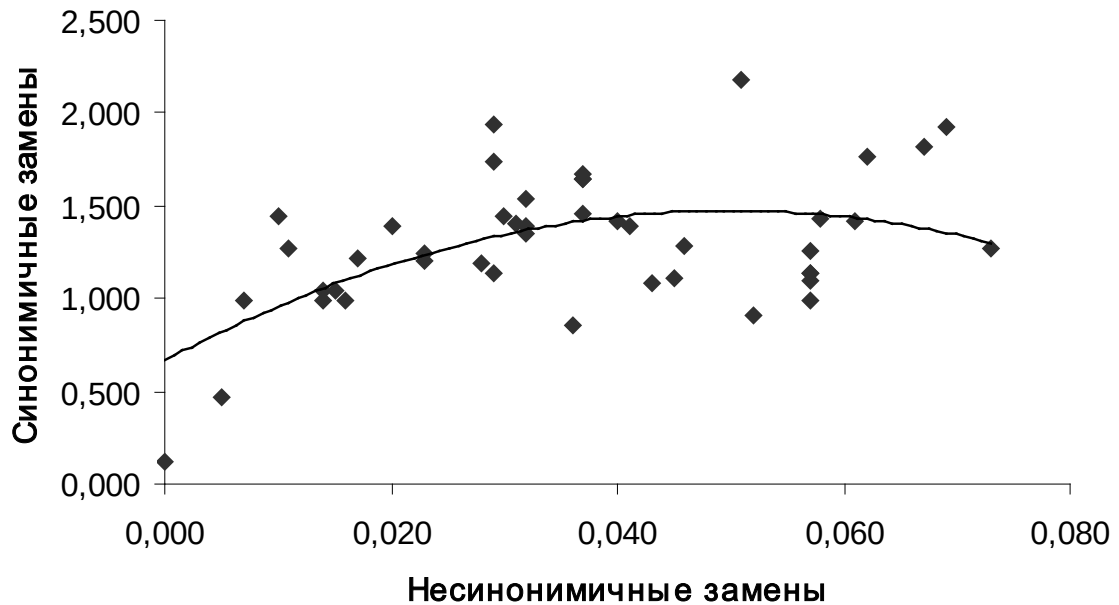


Рисунок 6. График, показывающий динамику накопления синонимичных и несинонимичных замен. По оси абсцисс – попарные генетические расстояния, рассчитанные модифицированным методом Ней и Годжобори (Nei-Gojobori) с учетом только несинонимичных замен; по оси ординат - попарные генетические расстояния, рассчитанные аналогично с учетом только синонимичных замен

Насыщение нуклеотидных замен в наборе данных (COI) показано для рода *Cyclops* с помощью теста Xia с соавт. (2003) в программе DAMBE. Индекс Iss (0.6194) незначительно меньше Iss.c (0.7333) для симметричных деревьев.

Наличие эффекта насыщения нуклеотидных замен в третьей позиции кодонов COI так же отмечает ряд авторов у представителей *Copepoda* (Lee, 2000; Goetze 2003; Roe, 2006; Lefebure, 2006). С другой стороны COI остается одним из самых популярных генетических маркеров мтДНК и использование его в нашей работе оправдано для сравнения с представителями других групп *Cyclopoida* и для оценки времени дивергенции.

3.5 Разнообразие нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК

Длина полученных последовательностей варьировала в пределах 658 - 713 п.н. При выравнивании последовательностей общий фрагмент, исключаящий недостающие данные, составил 630 оснований. Анализ этого фрагмента показал наличие 129 переменных позиций. Из них 62 позиции являются филогенетически информативными.

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

3.6 Филогения циклопов

Древа, полученные на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей «фолмеровского» фрагмента COI, незначительно различались при использовании разных методов. В древе, полученном методом MrBayes, представители *Mesocyclops leuckarti* и *Thermocyclops inversus* вошли в группу с представителями рода *Diacyclops*. На Рисунке 7 изображено NJ-древо, полученное с использованием несинонимичных замен. Топология COI древа согласуется с древом по 18S рДНК (Рисунок 14). Байкальские представители рода

Diacyclops образуют монофилетичную группу. Другой группой выделились представители рода *Cyclops*.

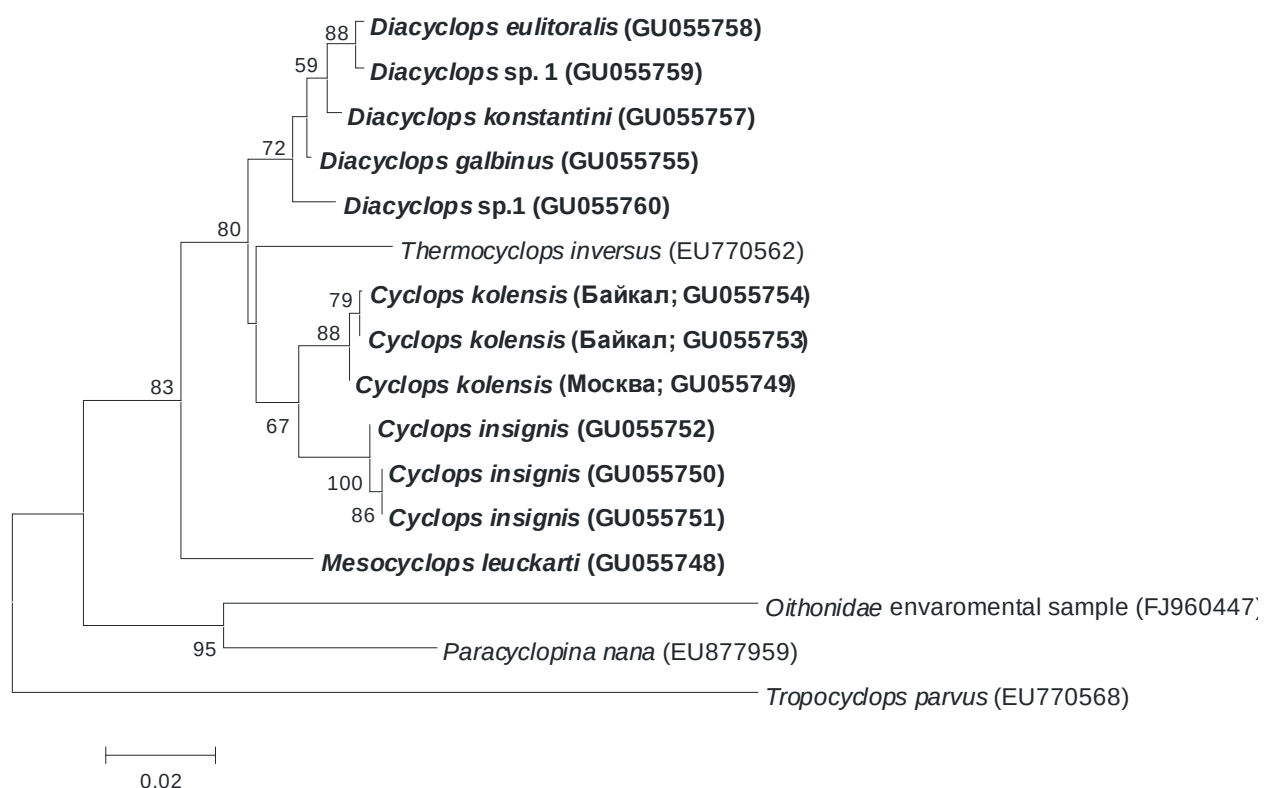


Рисунок 7. Филогенетическое дерево (NJ), построенное на основе последовательностей «фолмеровского» фрагмента гена COI. Число в узлах - значение бут-стреп поддержки узла ветвления. Число в скобках после видового названия – инвентарный номер в GenBank. *Dyacyclops* sp. 1 – *Diacyclops zhimulevi*. Жирным шрифтом выделены виды, для которых определены нуклеотидные последовательности в данной работе

На основе полученных данных по мтДНК для рода *Cyclops* проведен анализ филогенетических взаимоотношений (Рисунок 8). Два кластера на дереве NJ: 1) *C. abyssorum*, *C. ochridanus*; 2) *C. kolensis*, *C. abyssorum*, *C. insignis* соответствуют первой и второй кладам, полученным М. Крајісек с соавт. (2017) при анализе этого же рода, с использованием митохондриальных и ядерных генетических маркеров. Но, в отличие от этой работы, последовательность *C. strenuus* занимает обособленное положение и не вошла в кластер с другими анализируемыми

представителями рода *Cyclops*. Нуклеотидные последовательности *C. abyssorum* разделились на два кластера. В один из них вошли нуклеотидные последовательности циклопов из озера Улаагчны Хар (западная часть Монголии; KR704355) и Богучанского водохранилища (Иркутская область; MF150248-50). Положение *C. abyssorum* и *C. strenuus* на филогенетическом дереве подтверждает ранее выдвигаемое предположение о криптической природе этих видов (Nilssen 1979; Stella, 1988).

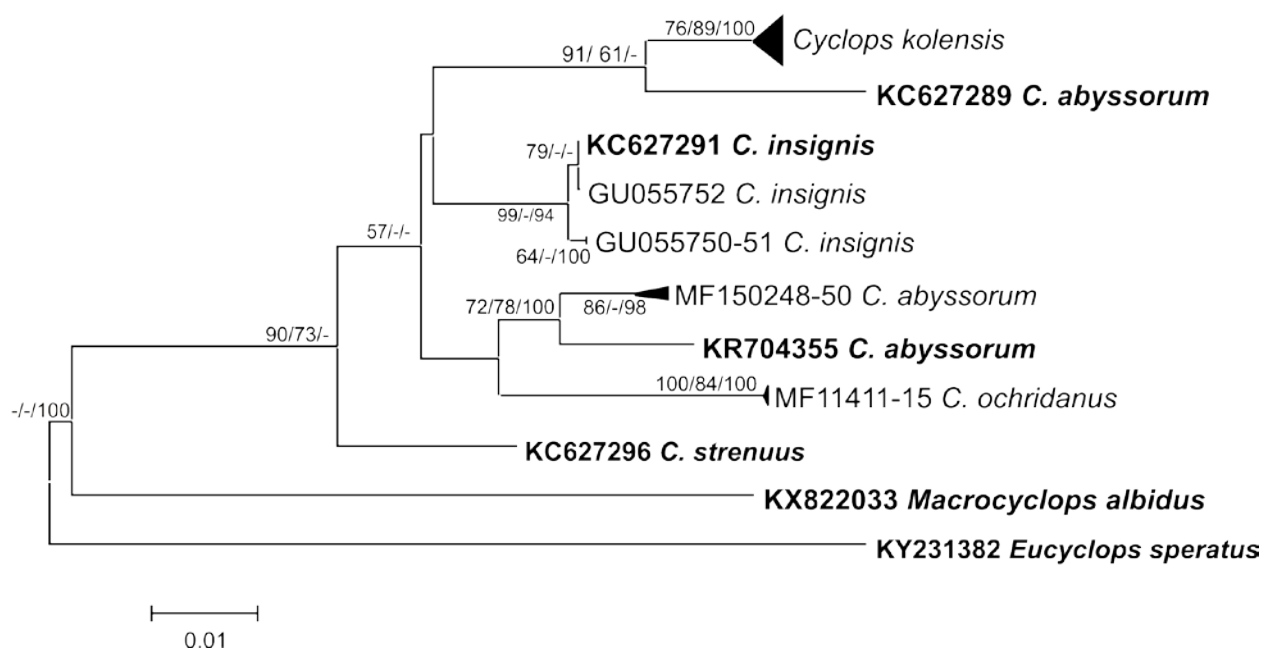
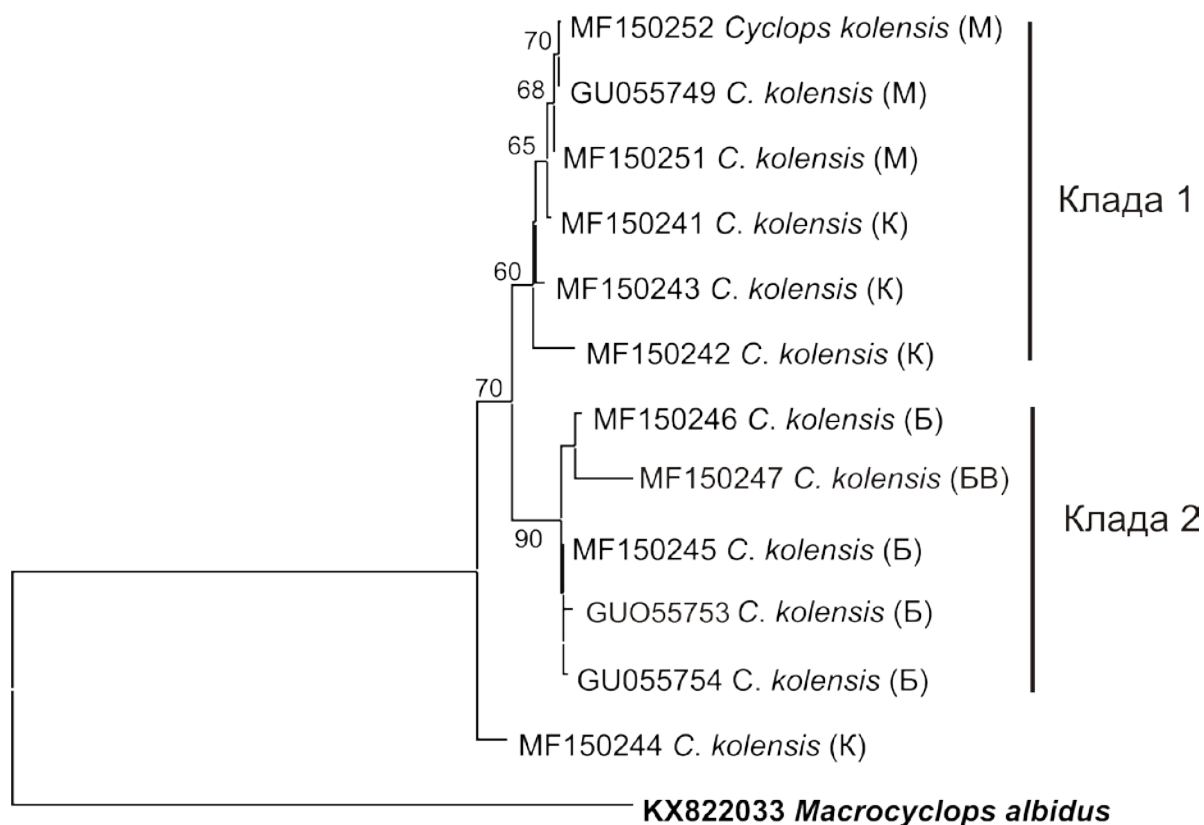


Рисунок 8. Филогенетическое дерево (NJ, K2P с учетом 1, 2 позиций кодона). Перед видовым названием указан инвентарный номер в GenBank. Для *C. kolensis* эти номера следующие: GU055749, GU055753-54, MF150241-47, MF150251-52. Числа в узлах - значения бут-стреп поддержек > 50% узлов ветвления NJ дерева / ML дерева / апостериорных вероятностей BI дерева в процентах. Жирным шрифтом выделены последовательности, позаимствованные из банка данных GeneBank

Особи *C. insignis* из двух популяций (Андреевские пруды на Воробьевых горах, Москва; пруд в Таврическом саду, Санкт-Петербург) генетически близки и объединились на дереве в один кластер.

На филогенетической схеме (Рисунок 9) *C. kolensis* из оз. Байкал и Богучанского водохранилища (Иркутская область) формируют отдельный кластер (клада 2) и показывают генетическую обособленность от представителей этого вида из отдаленных частей ареала (клада 1).



0.05

Рисунок 9. Филогенетическое дерево (NJ, K2P с учетом 1, 2, 3 позиций кодона), построенное на основе последовательностей фрагмента гена COI. Число в узле - значение бут-стреп поддержки узлов ветвления. Б – Байкал, БВ – Богучанское водохранилище, М – Москва, К – Киев. Жирным шрифтом выделена последовательность, позаимствованная из банка данных GeneBank

На Рисунках 10, 11 и в приложении А приведены филогенетические деревья для всех полученных нуклеотидных последовательностей расширенного митохондриального фрагмента COI для двух родов *Diacyclops* и *Acanthocyclops*, построенные методами NJ, BI и ML.

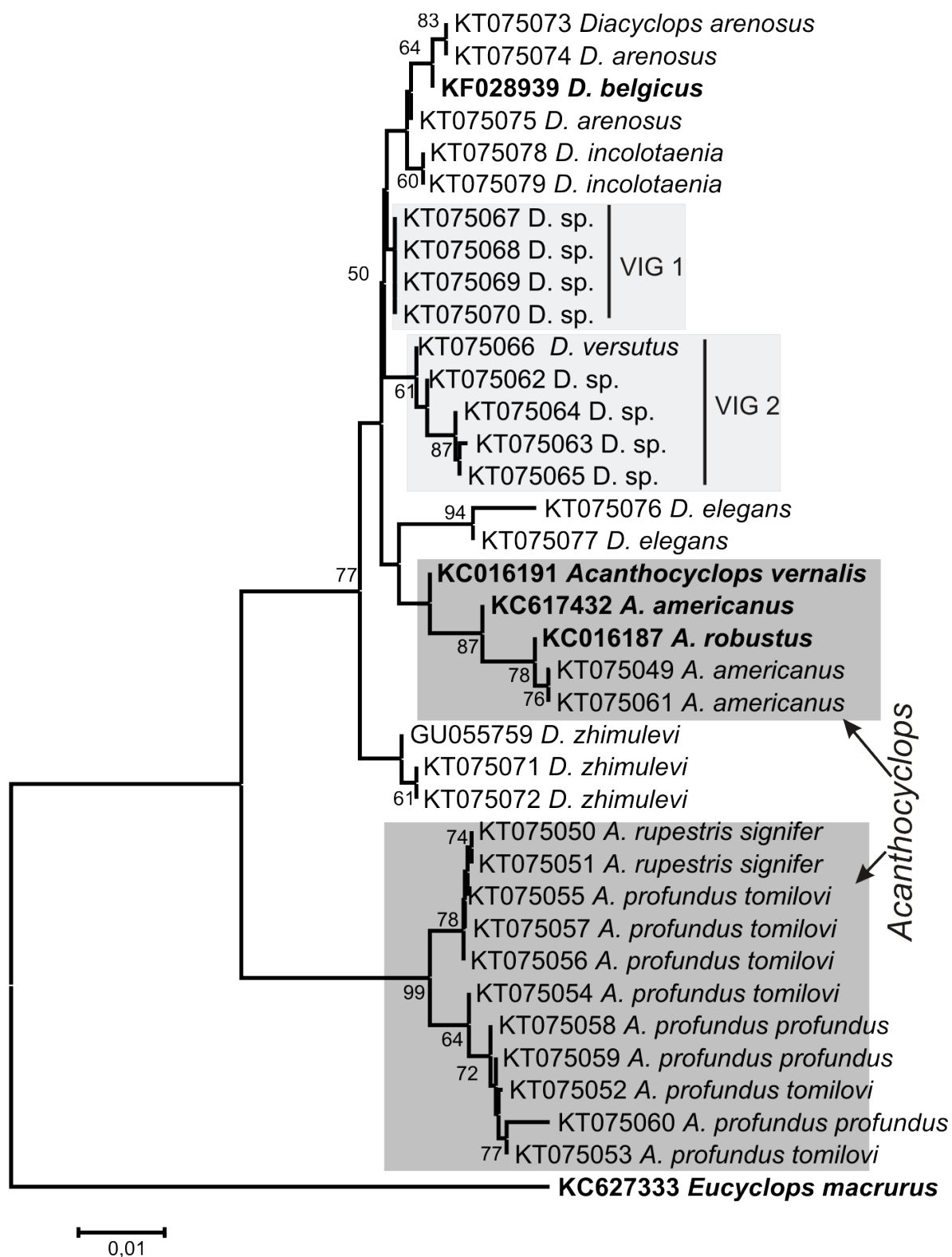


Рисунок 10. Филогенетическое древо (NJ), построенное на основе аминокислотных последовательностей COI. Числа в узлах - значение бут-стреп поддержки узлов ветвления. Числа перед видовым названием – номер в GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, позаимствованные из банка данных GenBank

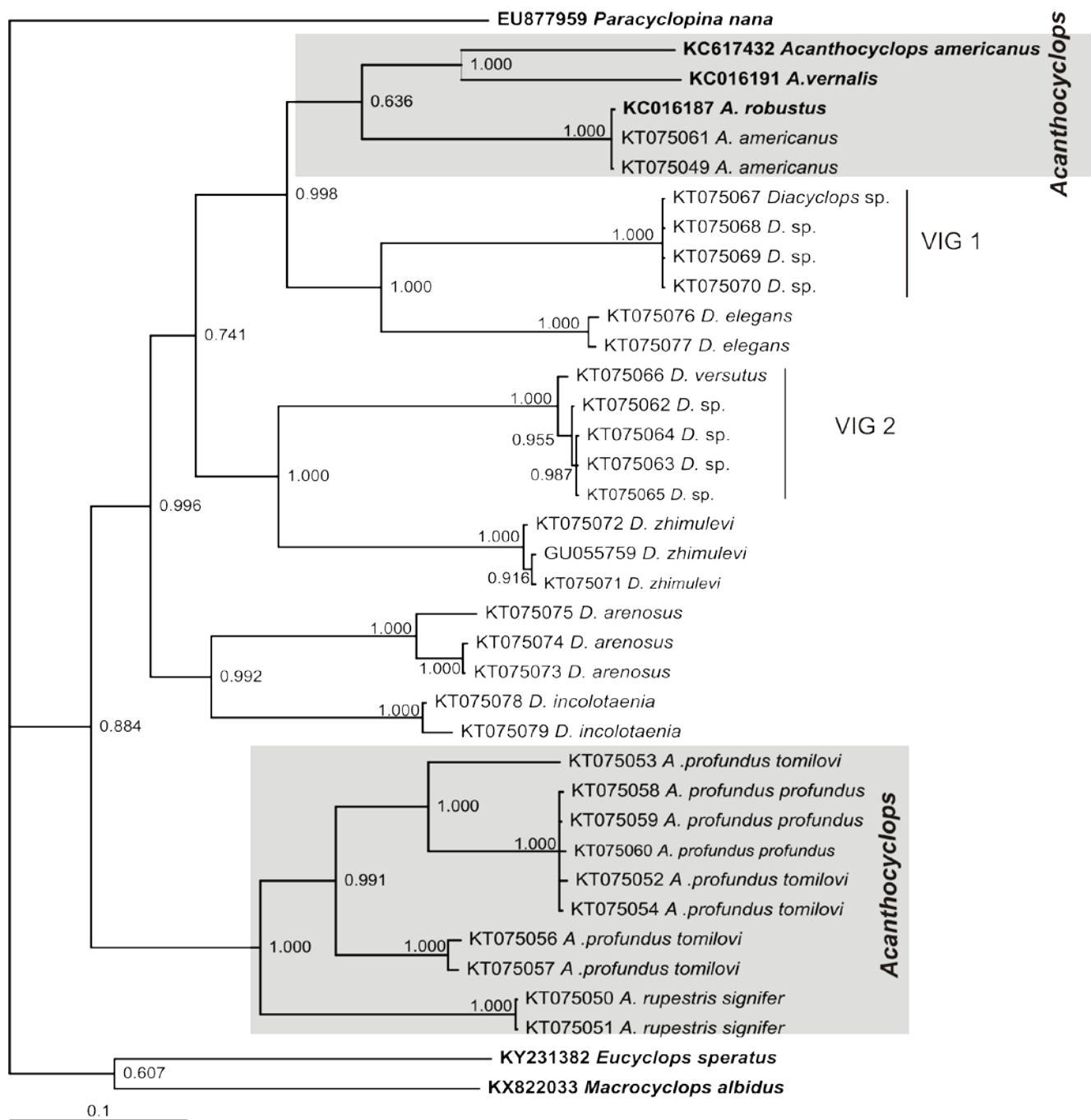


Рисунок 11. Филогенетическое древо (BI, F81, с учетом 1, 2 позиций кодона), построенное на основе нуклеотидных последовательностей COI. Число в узлах – апостериорная вероятность. Число перед видовым названием – номер в GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, позаимствованные из банка данных GenBank

На всех полученных деревьях есть два больших кластера. Первый составляют представители рода *Diacyclops* и три псевдокриптических вида рода *Acanthocyclops*, а второй - эндемичные байкальские представители рода *Acanthocyclops*. Также на всех филогенетических деревьях нуклеотидные последовательности особей, относящихся к группе VIG, образуют два кластера, обозначенные VIG 1 и VIG 2.

Появление филогенетических групп с неясным видовым статусом (VIG 1, VIG 2) отчасти вызвано недостаточно полным описанием байкальских циклопов. Кроме того, как отмечает Г. Ф. Мазепова, виды *D. versutus*, *D. improcerus*, *D. galbinus* характеризуются значительной индивидуальной изменчивостью и в то же время морфологическим сходством между собой (Мазепова, 1978). Разделение последовательностей этих видов на два кластера может свидетельствовать о наличии двух криптических или псевдокриптических видов, так как первоначально часть особей из разных кластеров VIG 1, VIG 2 определяли как один вид (Таблица 6). Тум и Харрисон (Thum, Harrison, 2009) в своем исследовании *Skistodiaptomus* отмечают, что у веслоногих ракообразных видообразование часто приводит к появлению новых форм - морфологически идентичных или с небольшими морфологическими отличиями. Этот феномен отражен и во многих других исследованиях по биоразнообразию копепоид (Lee, 200; Goetze, 2003). Но некоторые особи, вошедшие в один кластер VIG 1 или VIG 2, настолько отличались друг от друга, что были отнесены к разным видам: *D. versutus* / *D. improcerus* / *D. galbinus*. Возможно, таксономические признаки, применяемые для разделения этих видов, являются слишком вариабельными на популяционном уровне и, таким образом, малоинформативными. Выявленный случай также можно объяснить наличием митохондриальной интрогрессии в группе видов *D. versutus* / *D. improcerus* / *D. galbinus*, описываемой и у других групп организмов (McGuire, 2007; Husley, 2013; Darras, 2015).

На филогенетических деревьях, построенных методами ML и BI (приложение А, Рисунок 11) представители группы VIG 1 и *D. elegans* объединены

в один кластер. На ВІ древе с высокими значениями апостериорных вероятностей еще есть два кластера: 1) виды, обитающие на губках *D. arenosus* и *D. incolotaenia*; 2) группа VIG 2 и мелкий псаммофильный циклоп *D. zhimulevi*.

При построении филогенетических древ отдельно для каждого рода устойчивость основных ветвей, рассчитанная для NJ / ML методом бут-стреп была выше (Рисунок 12, 13).

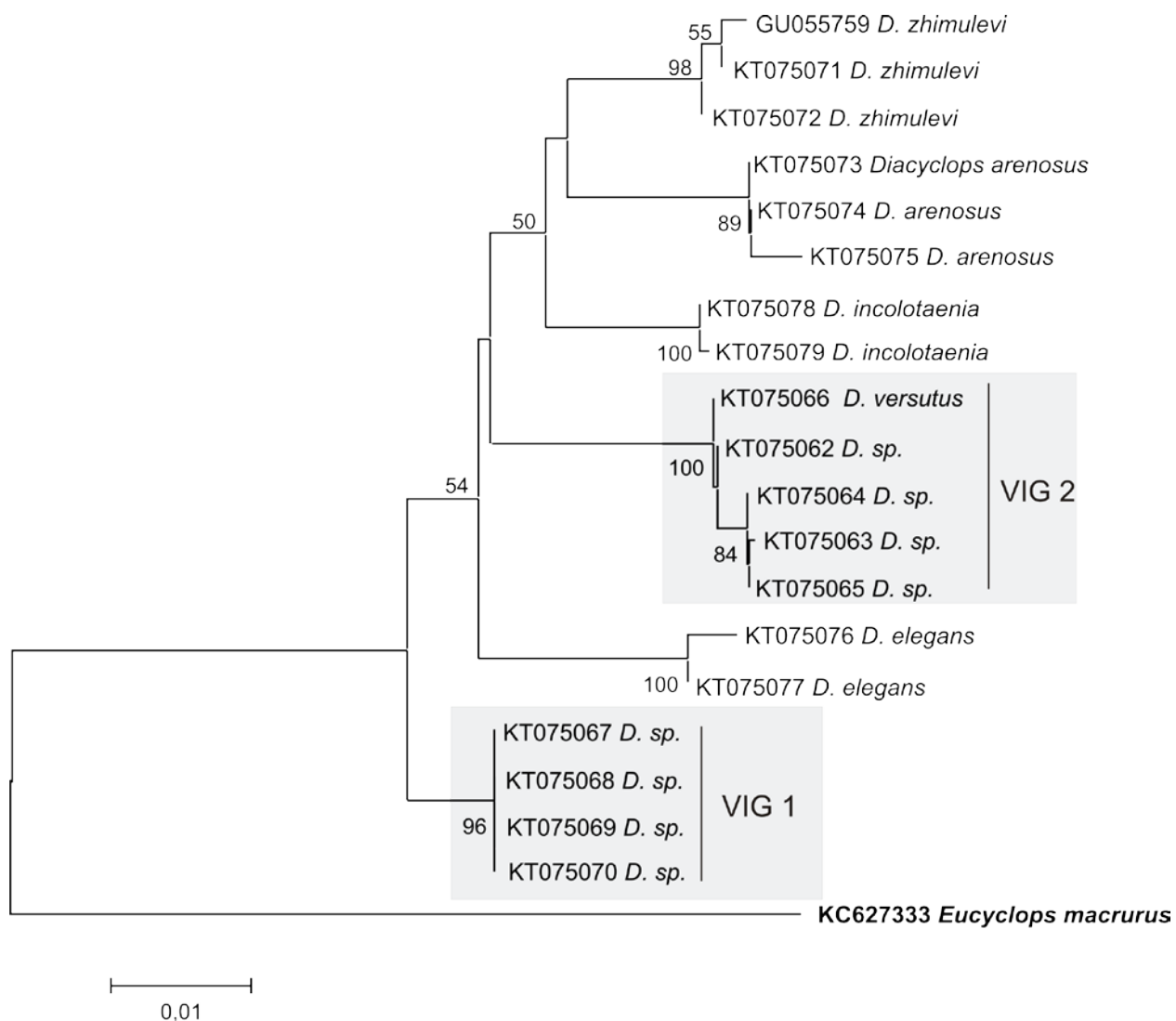


Рисунок 12. Филогенетическое древо (NJ), построенное на основе 1, 2 позиций кодона нуклеотидных последовательностей COI для представителей рода *Diacyclops*. Число в узлах - значение бут-стреп поддержки узлов ветвления. Число перед видовым названием – номер в GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, позаимствованные из банка данных GenBank

Увеличение длины анализируемого фрагмента COI в среднем до 900 п.о. показало его эффективность для разрешения филогенетических отношений между последовательностями представителей байкальских видов в рамках одного рода. Исследования митохондриальных геномов веслоногих ракообразных, в частности свободноживущего циклопа *Paracyclops nana* Smirnov, 1935, показали, что ген COI и митохондриальный ген цитохрома b (Cytb) являются одними из самых консервативных участков (Ki, 2009). Возможно, параллельный анализ гена Cytb и полного гена COI позволит с большей степенью достоверности построить филогенетические схемы для эндемичных байкальских циклопов.

Виды *Acanthocyclops rupestris signifera* и *A. profundus* достоверно сестринские в данной выборке, а два подвида последнего вида не монофилетичны (Рисунок 13). Нуклеотидные последовательности двух представителей *A. americanus* с высокой степенью бут-стреп поддержки (93%) объединились с таковой *A. robustus* (Sars, 1892), взятой из GeneBank (KC016187). Генетическая дивергенция, посчитанная с помощью K2P, составила 16% между полученной нами последовательностью *A. americanus* и взятой из банка данных GeneBank *A. americanus* (KC617432) и 0% при том же сравнении с позаимствованной из банка данных GenBank последовательностью *A. robustus* (KC016187).

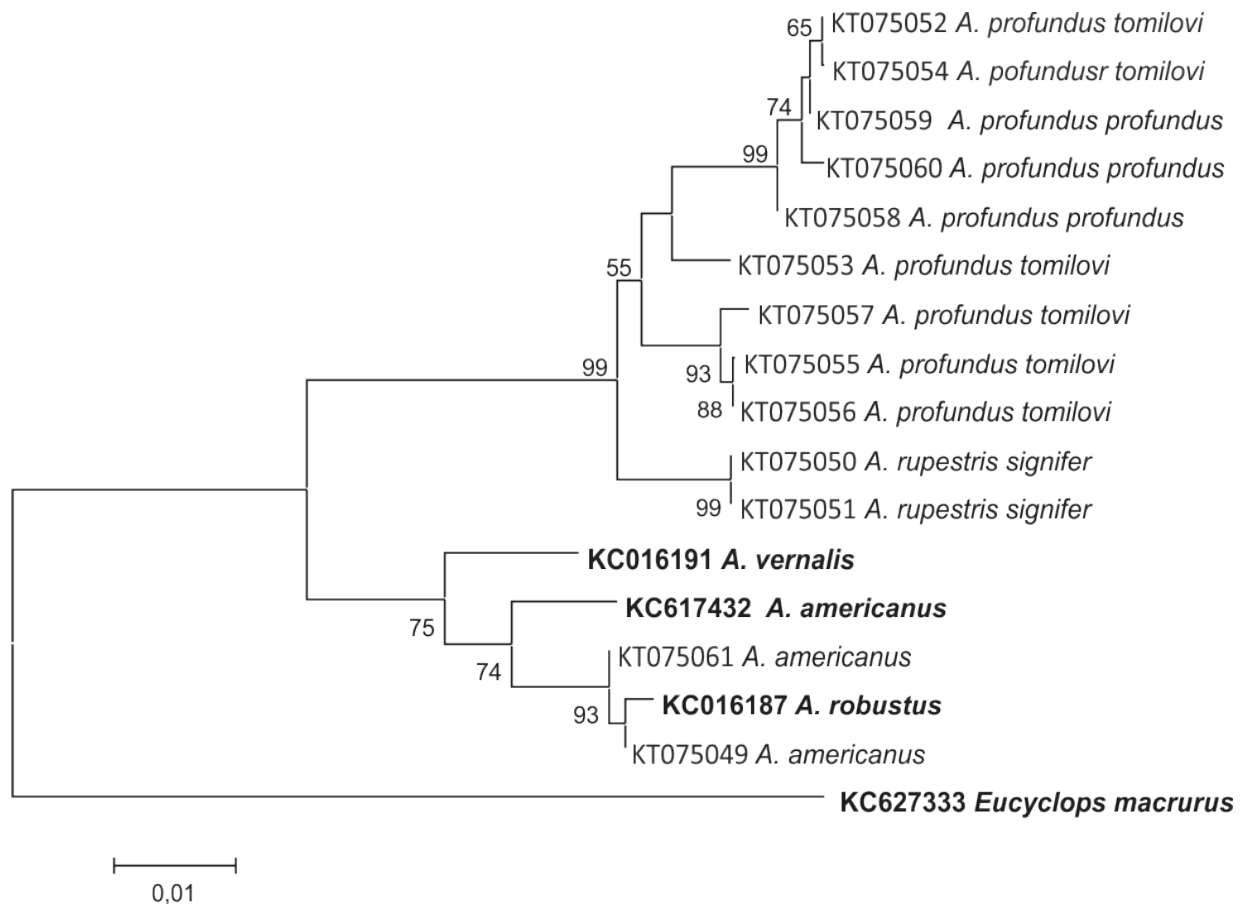


Рисунок 13. Филогенетическое древо (NJ), построенное на основе 1, 2 позиций кодона нуклеотидных последовательностей COI для представителей рода *Acanthocyclops*. Число в узлах - значение бут-стреп поддержки узлов ветвления. Число перед видовым названием – номер в GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, позаимствованные из банка данных GenBank

Разделение представителей рода *Acanthocyclops* и объединение последовательностей части видов этого рода с последовательностями рода *Diascyclops* на филогенетическом древе (Рисунок 10, 11) подтверждают предположение о полифилетичности рода *Acanthocyclops*, сделанное на основе анализа морфологических признаков (Stoch, 2011; Hołyńska, 2011). Комплекс псевдокриптических видов *A. vernalis*, *A. robustus*, *A. americanus* необходимо исследовать далее с привлечением морфологических и молекулярных методов.

Последовательности вида *A. profundus* на древе, изображенном на Рисунке 13, достоверно разделились на две группы, однако это разделение не соответствует двум подвидам *A. profundus profundus* и *A. profundus tomilovi*. Более запутанная ситуация отражена на том же филогенетическом древе с последовательностями группы *americanus-robustus-vernalis*. Полученные нами две нуклеотидные последовательности вида, ранее определяемого как *A. vernalis* (Fischer, 1853), на древе объединяются с высокой степенью поддержки (74% и 93%) с последовательностью ДНК *A. robustus*, полученной Майракл с соавт. (Miracle, 2013). Морфологические признаки двух исследованных нами особей (закругленный в верхней части генитальный сегмент) и биометрические измерения, а именно: фуркальный индекс 5; латеральная щетинка почти в 2 раза короче внешней апикальной щетинки (37,5 мкм: 72,5 мкм соответственно); удлинённый (длина 220 мкм, ширина 200 мкм) генитальный сегмент; внутренний апикальный шип endP4 длиннее внешнего апикального (77,5 и 72, 5 мкм соответственно) позволяют отнести этот вид к *A. americanus* (Marsh, 1892). Основываясь на молекулярных данных, анализируемые особи в нашей работе (KT075049, KT075061) можно было бы отнести к *A. robustus*. Для разрешения неопределенной ситуации с таксономическим определением байкальских циклопов группы *americanus – robustus - vernalis* требуется дальнейшее изучение этой группы.

Топологии древ, полученные на основе нуклеотидных последовательностей 18S рДНК с помощью NJ, MP, ML методов, были идентичны для всех статистически достоверных узлов. На филогенетической схеме, построенной по фрагменту 18S рДНК два представителя голарктического вида *D. bicuspidatus* и два представителя нового байкальского вида *D. zhimulevi* формируют отдельный кластер (Рисунок14). Нуклеотидные последовательности еще одного представителя *D. bicuspidatus* и двух представителей *D. zhimulevi* в этот кластер не входят и генетически близки группе других видов *Diacyclops*.

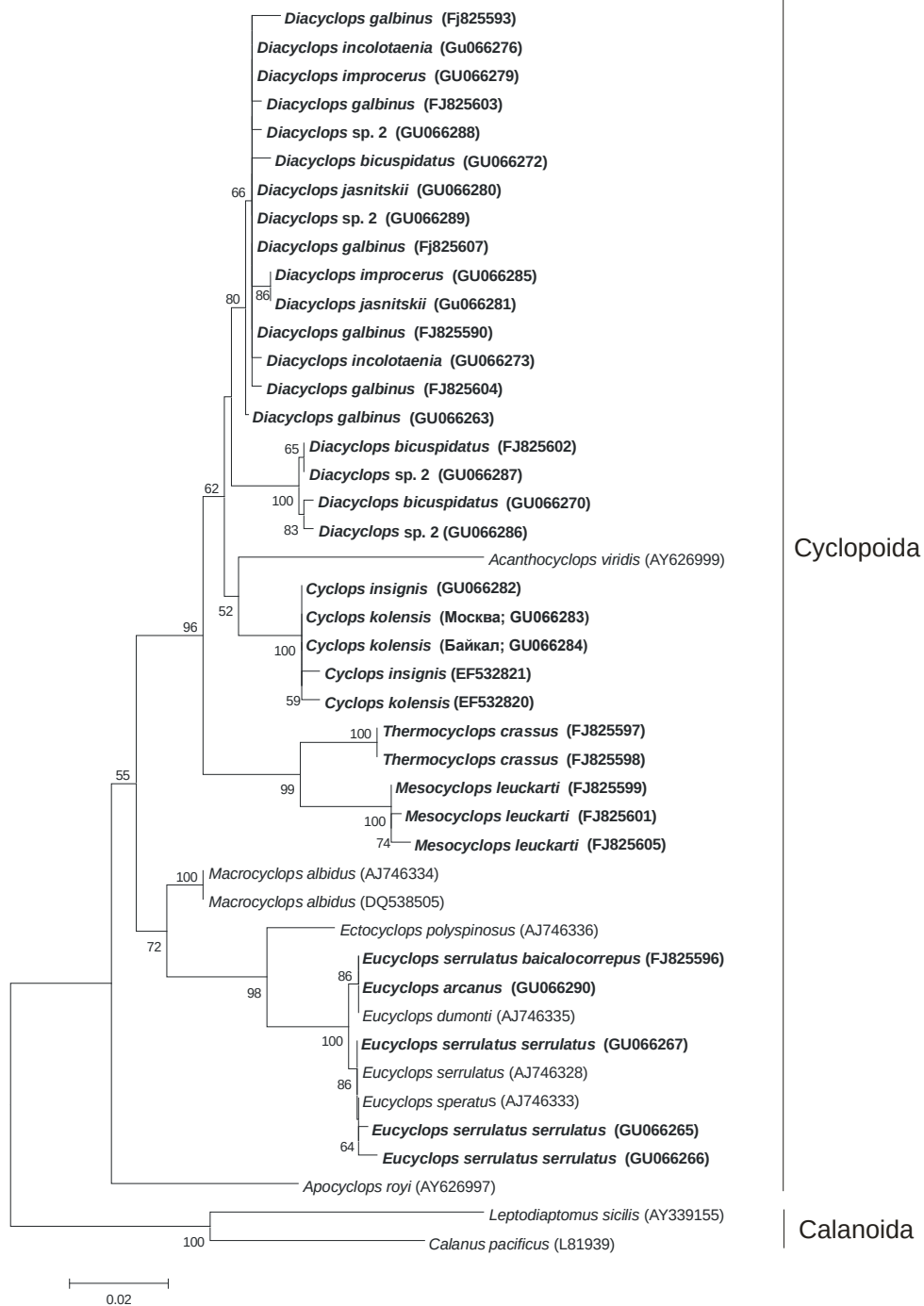


Рисунок 14. Филогенетическая схема (NJ - древо), построенная на основе последовательностей фрагмента гена 18S рРНК. Число в узлах - значение бутстреп поддержки узлов ветвления. Число в скобках после видового названия - номер доступа в GenBank. Название в скобках - место сбора. Жирным шрифтом выделены виды, для которых определены нуклеотидные последовательности в данной работе. *Dyascyclops* sp. 2 – *D. zhimulevi*

Ранее в исследовании с использованием гибридизации В. И. Монченко выявил присутствие криптических видов в группе *D. bicuspidatus* (Monchenko, 2000). Похоже, что результаты наших исследований также демонстрируют наличие криптических видов среди байкальских циклопов. Вместе с тем, для достоверного выявления криптических видов необходим анализ большего количества представителей видов циклопов при параллельном исследовании тонкой морфологии. Количество нуклеотидных замен в данном фрагменте низко и не позволяет определить строгое расположения видов в рассматриваемой группе.

В отдельный кластер выделились представители родов *Thermocyclops* и *Mesocyclops*. Палеарктические виды *Eucyclops serrulatus serrulatus*, *Eucyclops arcanus* и подвид *Eucyclops serrulatus baicalocorrepus* вошли в группу с представителями этого же рода, чьи последовательности получены из GenBank.

На филогенетической схеме по консервативному эволюционному маркеру 18S рРНК байкальские представители рода *Diacyclops* образуют монофилетичную группу, что свидетельствует об их происхождении от общей предковой формы.

3.7 Оценка возраста исследуемых видов

Сравнение предельных вероятностей двух моделей (не-часы и строгие молекулярные часы) в наборе данных по фрагменту COI для родов *Acanthocyclops*, *Diacyclops*, *Cyclops* показало преимущество модели строгих молекулярных часов. В наборе данных для *Acanthocyclops*, *Diacyclops* модель строгих молекулярных часов лучше на 75 логарифмических единиц правдоподобия, для *Cyclops* - на 16 логарифмических единиц правдоподобия. Разница, превышающая 5 единиц логарифмического правдоподобия, обычно считаются сильным доказательством в пользу лучшей модели (Kass, Raftery, 1995).

В эволюционном датировании веслоногих ракообразных наиболее часто используют оценки общей скорости эволюции гена COI у прибрежных крабов

(Schubart, 1998) и раков-щелкунов (Knowlton, 1998), составляющие 1,66 – 2,33% и 1,4% за млн. л., соответственно. Так как для исследованных байкальских циклопов показан эффект насыщения нуклеотидных замен в третьей позиции кодона по COI, то использование вышеуказанных скоростей может дать заниженную оценку возраста видов. В связи с этим в анализе использовали скорость замен нуклеотидов во второй позиции кодона 0,022% в млн. л. Эта скорость была откалибрована по палеонтологическим данным о времени расхождения представителей отрядов Blattaria и Orthoptera. Скорость использовали в анализе 5 отрядов насекомых (Blattaria, Orthoptera, Hemiptera, Diptera, Lepidoptera) и 2 классов ракообразных (Branchiopoda, Malacostraca).

Возраст группы эндемичных видов родов *Diacyclops/Acanthocyclops* приблизительно 20 млн. л. н. Время расхождения голарктического вида *C. kolensis* от общего предка с видами *E. speratus* и *M. albidus* - 9 млн. л. (приложение Б, В). Следует подчеркнуть, что данные оценки, относящиеся к раннему и среднему Миоцену (23,8 – 5,3 млн. л.), являются приблизительными по причине малого количества палеонтологической информации для Copepoda и соответственно специфических калибровок скорости накопления замен (Gressey, 1973; Huys, 1991). В геологической истории Байкальской впадины 20 и 8 млн. л. н. соответствует протобайкальскому этапу (30 – 3,5 млн. л. н.). В это время происходило общее похолодание, поднятие окружающих пространств и углубление (до 400 - 500 м) озерных бассейнов, инициировавшее зоогеографическую изоляцию Байкальской впадины и формирование эндемичного байкальского комплекса гидробионтов (Мац и др., 2011). Согласно молекулярному датированию с протобайкальским этапом связано начало дивергенции и других байкальских групп: семейство Lumbriculidae (30-28 млн. л. н), амфиподы рода *Eulimnogammarus* Bazikalova, 1945 (8,5млн. л. н.), эндемичные виды хирономид рода *Sergentia* Kieffer, 1922 (Кайгородова, 2000; Щербаков, 2003; Papousheva, 2003).

Вычисленный возраст байкальских циклопов не противоречит также имеющейся палеонтологической информации для *Сорепода*, подробно рассмотренной выше в параграфе 1.7 обзора литературы. Среди ископаемых остатков, относящихся к среднему и позднему Миоцену, найдены циклопы рода *Acanthocyclops*. По молекулярным данным митохондриального гена 12S Блаха с соавт. (2010) предварительно оценил время дивергенции 4 генетических линий близких видов *Acanthocyclops vernalis*, *A. Trajani* и *A. einslei* 10 - 15 млн. л. н. и время дивергенции этих видов с *Megacyclops viridis* от общего предка приблизительно 21 – 22,6 млн. л. н. В другой работе по этой группе видов: *A. vernalis*, *A. americanus*, *A. robustus* оценено время их дивергенции по COI в 10 – 14 млн. л. н. (Miracle et al., 2013). Приведенные оценки возраста дивергенции представителей рода *Acanthocyclops* относятся к эпохе Миоцена и близки к полученным нами оценкам для *Diacyclops* / *Acanthocyclops*. В исследовании европейских видов рода *Cyclops* авторы относят время дивергенции анализируемых видов (в том числе *C. kolensis*) к среднему и позднему Миоцену, что также согласуется с нашей эволюционной оценкой для представителей *C. kolensis*.

3.8 Метод относительной оценки изменений размера генома с использованием ПЦР с оценкой результатов в режиме реального времени

Оценка степени диминуций хроматина

При оценке изменений размера генома мы исходили из того, что в процессе ДХ количество копий генов-мишеней в клетках зародышевого пути и соматических клетках остается одинаковым. Соответственно, при уменьшении размера генома вследствие ДХ, концентрация копий этих генов должна возрастать пропорционально степени диминуции, увеличивая значения C_t в ПЦР-РВ. Как показали результаты тестов, кривые флуоресценции для образцов ESD+ и BD+

демонстрируют очень близкие показатели C_t (Рисунок 15, Таблица 7). При этом между (ESD-) и (ESD+, BD+) для всех исследуемых видов циклопов прослеживаются значительные различия. Это свидетельствует о том, что разная степень ДХ характерна для каждого вида.

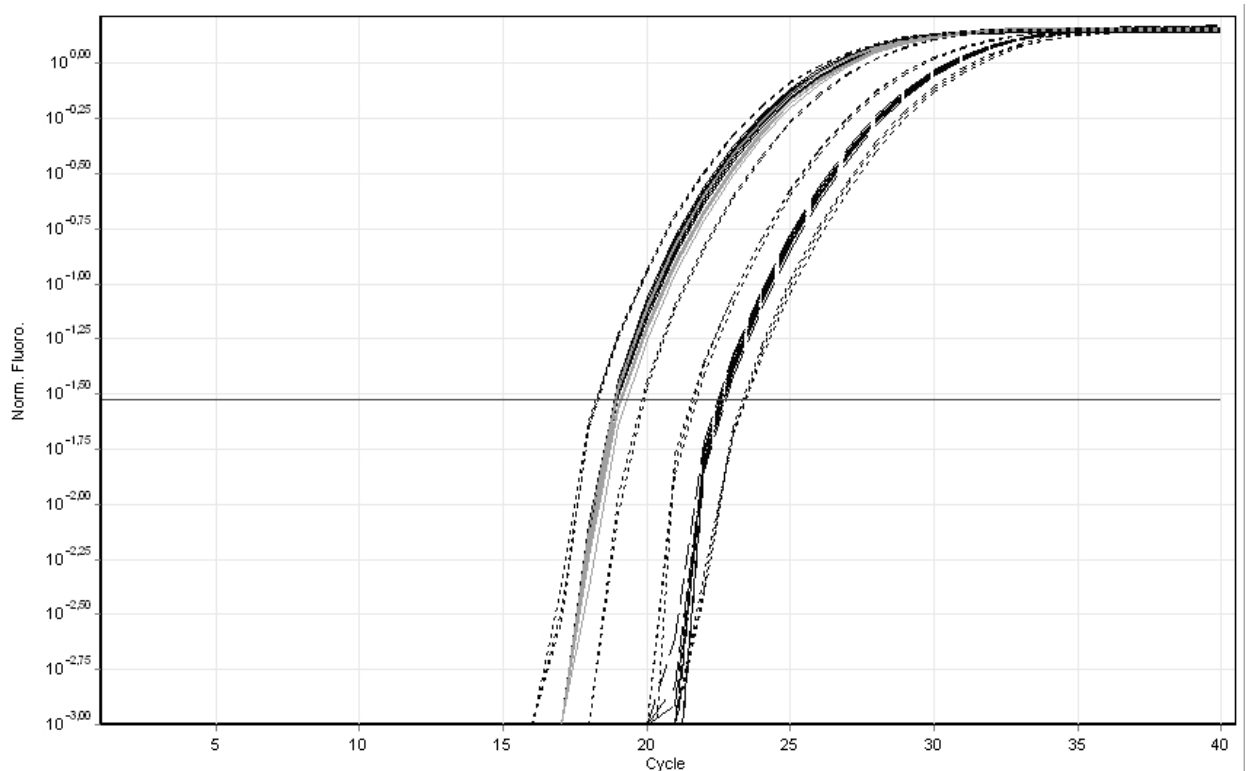


Рисунок 15. Результаты ПЦР-РВ фрагмента *Actb* образцов *A. vernalis*. Короткие пунктирные линии - 4x4 стандарт; сплошные линии - ESD+ (черные) и BD+ (серые) (по 3 образца, по 3 повтора каждого); длинные пунктирные линии - ESD- (4 образца по 3 повтора)

Таблица 7. Результаты анализа изменений размера генома в онтогенезе циклопов с помощью ПЦР-РВ

Вид	Размер ДХ (%)	Калибровочные кривые	
		Slope (M)	Коэффициент корреляции (R ²)
<i>C. kolensis</i>	96,5 ± 0,4	-3,26	0,998
<i>M. viridis</i>	93,8 ± 1,3	-3,24	0,999
<i>A. vernalis</i>	94,5 ± 0,8	-3,04	0,998
<i>C. insignis</i>	74,3 ± 7,0	-3,93	0,995

Оценка влияния РНК

Пробы ESD-, ESD+ и BD+ содержали разное количество РНК. Например, концентрации РНК в клетках ESD- и ESD+ *C.kolensis* превышала концентрации ДНК в 11 - 16 и 3 - 6 раз, соответственно, а в пробах BD+ концентрация РНК была ниже порога чувствительности набора RNA assay kit. Для проверки влияния РНК на результаты оценки ДХ были проведены тесты с пробами обработанными (R+) и необработанными (R-) РНКзой. Как показали результаты разница в степени ДХ между R- и R+ пробами колебалась в пределах 1,1% - 3,9%, и в двух случаях из четырех была меньше величины стандартного отклонения (Таблица 8).

Предложенный нами подход прост и, в сравнении с методом Вильгельма с соавт. (Wilhelm et al., 2003), имеет дополнительный критерий оценки достоверности результатов, связанный с процедурой выравнивания концентраций ДНК. Проведенные нами эксперименты показали, что при несоблюдении некоторых рекомендаций пробоподготовки (см. ниже) можно получить значительные расхождения в показателях Ct в пределах как пост- (D+), так и додимируционного (D-) материала. Использование нормализации по концентрации ДНК позволяет оценить величину таких расхождений.

Таблица 8. Результаты кПЦР фрагментов Actb у *C.kolensis*. (R-) - необработанные РНКазой пробы, (R+) - обработанные РНКазой пробы

Праймеры	Размер ДХ в %	
	R-	R+
act-48-L act-117-H	94,5 ± 1,5	93,4 ± 0,5
	96,8 ± 1,1	93,8 ± 1,7
	97,6 ± 0,6	93,7 ± 1,7
act-191-L act-274-H	96,0 ± 1,2	93,6 ± 2,2

Еще одна особенность предложенного нами подхода состоит в том, что единственным критерием выбора гена - мишени является присутствие одинакового количества копий гена в клетках D+ и D-. В качестве таких мишеней могут быть выбраны многокопийные гены, что увеличит чувствительность ПЦР. Очевидно, что частичная элиминация генов-мишеней в образцах D+ будет приводить к недооценке размера ДХ.

Как показали эксперименты, воспроизводимость и степень расхождение результатов в значительной степени зависят от условий пробоподготовки. Для получения корректных данных необходимо: i) выделение и определение концентрации ДНК для всех проб D+ и D- проводить единовременно, с использованием одних и тех же смесей реагентов и процедур; ii) экстракцию ДНК необходимо проводить с помощью наборов, предназначенных для работы с малым количеством ДНК. Использование неочищенной лизирующей смеси приводит к увеличению величины стандартного отклонения St и ухудшает воспроизводимость результатов. iii) Концентрация ДНК должна определяться флуорометрически; iv) не допускается длительное хранение или замораживание экстрактов ДНК.

Предложенный нами метод показал сходные результаты с известными данными по *C. kolensis* - одному из наиболее изученных видов в отношении ДХ среди циклопов. Оценки степени ДХ, полученные цитофотометрическими методами, для московской популяции этого вида варьируют от 94% (Гришанин, 2006; Семешин, 2011) до 98% (Wyngaard, 2011). Цитологические исследования байкальской популяции *C. kolensis*, показали, что в процессе ДХ теряется более 96% генетического материала (Гришанин, 2006; Семешин, 2011). Сходность литературных данных с нашими результатами подтверждает корректность последних, а также свидетельствует о правомерности использования ПЦР-РВ для исследования ДХ.

Много исследований посвящено изучению ДХ у *A. vernalis*, однако результаты, полученные в них противоречивы. Так, у популяции *A. vernalis*, исследованной А.П. Акифьевым (1974) и у популяции из штата Огайо (США) (Standiford, 1989) ДХ была обнаружена, однако её размер определен не был. В исследованиях других авторов у популяций из штата Висконсин и Огайо (США) ДХ не обнаружена (Grishanin, 2005; Rasch, Wyngaard, 2006). Причиной противоречивости результатов, по мнению авторов, может быть то, что исследованные популяции *A. vernalis* относятся не к одному виду, а являться морфологически сходными криптическими видами. Эти виды отличаются по числу хромосом, величине генома, а также наличию или отсутствию ДХ, которая и может являться механизмом генетической изоляции между такими видами-двойниками. У исследованной нами методом ПЦР-РВ выборке *A. vernalis* обнаружена ДХ в размере более 94%.

M. viridis является малоизученным видом в отношении ДХ и ранее у данного вида она обнаружена не была. Цитологическими методами была исследована только популяция из Германии, у которой количество хромосом и ДНК в соматических клетках и клетках эмбриона на стадии 6-го деления было равным (Grishanin, 2004). У популяции исследованной нами с помощью молекулярно-генетических методов, ДХ составила около 91%.

Наличие ДХ у *C. insignis* также остается под вопросом. Айнсле (Einsle, 1993) изучая германскую популяцию *C. insignis* наблюдал гранулы элиминируемого хроматина во время 5-го деления дробления. В исследованиях российской популяции *C. insignis* гранул хроматина обнаружено не было (Grishanin, 2004). Определение количества ДНК у российских представителей *C. insignis* на ранних и поздних стадиях дробления, а также в соматических клетках циклопов не выявило достоверных различий между ними (Семешин, 2011). Вместе с тем, следует отметить, что оценки содержания ДНК в диплоидных ядрах клеток российских *C. insignis* у разных авторов расходятся в 6 - 10 раз (Гришанин, 2008; Семешин, 2011). Согласно данным, полученным нами у *C. insignis* в процессе ДХ удаляется около 82% ДНК.

На Рисунке 16 показаны филогенетические взаимоотношения нескольких видов циклопов в сочетании с полученными в нашей работе значениями ДХ для трех видов из этой группы.

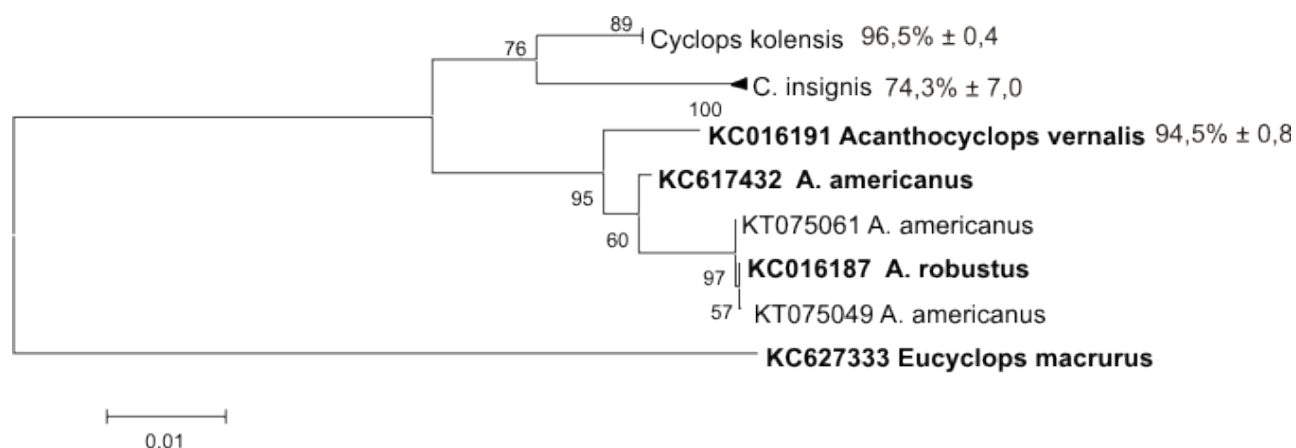


Рисунок 16. Филогенетическое древо (NJ), построенное на основе нуклеотидных последовательностей COI. Число в узле - значение бут-стреп поддержки узлов ветвления. Число перед видовым названием – инвентарный номер в GenBank. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, позаимствованные из банка данных GenBank. Число после видового названия – полученное значение ДХ для этого вида.

Отсутствие вектора изменения в количестве ДХ в соответствие с топологией дерева, говорит об эволюционной несогласованности между изменением количества элиминируемого хроматина и филогенией циклопов, что расширяет понимание биологической роли ДХ. Таким образом, результаты исследований показывают возможность применения метода ПЦР-РВ для оценки степени ДХ. Достоинства предложенного нами подхода состоят в его быстроте, простоте и невысокой требовательности к количеству исследуемого материала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

В рамках диссертационной работы заложены основы для изучения филогении циклопов из оз. Байкал молекулярными методами. С одной стороны филогенетическое древо, полученное по консервативному фрагменту 18S рРНК, отразило современные представления в систематике рассмотренных семейств циклопов: взаимоотношения родов, подсемейств. С другой стороны анализ фрагмента мтДНК показал высокую степень различий между полученными последовательностями видов в пределах одного рода: *Diacyclops*, *Cyclops*; позволил обнаружить две филогенетические группы последовательностей, относящихся к особям по морфологическим признакам близким к трем эндемичным видам *D. galbinus*, *D. improcerus*, *D. versutus*; выявил несоответствие деления вида *A. profundus* с современной систематикой и его разделением на два подвида *A. profundus tomilovi*, *A. profundus profundus*. Так же филогенетическое

древо по COI показало полифилетичность рода *Acanthocyclops* и обособленное положение байкальских эндемичных видов этого рода *A. profundus* и *A. rupestris*, от представителей рода *Diacyclops*.

Возраст представителей комплекса *Diacyclops / Acanthocyclops* и вида *Cyclops kolensis* оценен в 20 млн. л. н. и 9 млн. л. н. соответственно. В работе проведен анализ полученных оценок и имеющихся палеонтологических данных, и молекулярных датировок для Copepoda.

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

ВЫВОДЫ

1. Изучены филогенетические взаимоотношения байкальских циклопов, входящих в 6 родов и 2 подсемейства Cyclopinae и Eucyclopinae.
2. Молекулярно-филогенетические данные, полученные для вида *A. profundus*, не согласуются с современной систематикой и его разделением на два подвида *A. profundus tomilovi*, *A. profundus profundus*.
3. Молекулярные данные показали, что род *Acanthocyclops* является полифилетическим.
4. Выявлены две филогенетические группы, по морфологическим признакам сходные с тремя эндемичными байкальскими видами *D. versutus*, *D. improcerus* и *D. galbinus*.
5. Оценка возраста эндемичных байкальских видов родов *Diacyclops* и *Acanthocyclops* составляет 20 млн. л.
6. Предложен и апробирован на 4 видах циклопов простой и эффективный метод относительной оценки изменений размера генома с использованием количественной ПЦР.
7. Впервые обнаружена диминуция хроматина у *Megacyclops viridis* в размере 91%.
8. Показана эволюционная несогласованность между изменением размера диминуции хроматина и филогенией циклопов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянов А.О. Значение ископаемых для реконструкции филогении // Труды Зоологического института РАН. 2013. Т. 317. № Приложение 2. С. 75-82.
2. Акифьев А. П. «Молчащая» ДНК и ее роль в эволюции // Природа. 1974. №9. С. 49-54.
3. Гришанин А.К. Консерватизм структуры генома в двух популяциях *Cyclops kolensis* (Copepoda, Crustacea), обитающих в прудах г. Москва и о. Байкал // Доклады РАН. 2006. Т. 408. № 5. С. 684 - 687.
4. Гришанин А.К. Цитогенетическое исследование диминуции хроматина у пресноводных ракообразных – новый подход к изучению парадокса размера генома эукариот: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15 // Гришанин Андрей Константинович. М., 2008. 37 с.
5. Иванкина Е.А., Алексеева А.Л., Семешин В.Ф., Омелянчук Л.В., Пальчикова И.Г., Шевелева Н.Г., Кирильчик С.В., Жимулев И.Ф. Цитофотометрическое определение размера генома в онтогенезе трех видов циклопов озера Байкал (Crustacea: Copepoda: Cyclopoida) // Цитология. 2013. Т. 1, № 55. С. 52-59.
6. Кайгородова И.А. Молекулярно-филогенетическое исследование эволюционной истории байкальских люмбрикулид (Oligochaeta, Annelida): Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.15 // Кайгородова Ирина Александровна. Новосибирск, 2000. 17 с.
7. Кимура М. Молекулярная эволюция: Теория нейтральности / М. Кимура. М.: Мир, 1985. 398 с.
8. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 256 с.: ил.
9. Лухтанов В. А. Принципы реконструкции филогенезов: признаки, модели эволюции и методы филогенетического анализа // Труды Зоологического института РАН. 2013. №2. С. 39 – 52.

10. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. М. : Мир, 1984. 478 с.
11. Мазепова Г.Ф. Циклопы озера Байкал. Труды Лимнологического института / Г.Ф. Мазепова. Новосибирск: Наука, 1978. 139 с.
12. Монченко В. И. Новый вид рода *Diacyclops* (Crustacea, Copepoda) из Закавказья // Вестник Зоологии. 1985. № 5. С. 19-24.
13. Монченко В.И. Свободноживущие циклопообразные копеподы Понто-Каспийского бассейна / В.И. Монченко. К.: Наукова думка, 2003. 350 с.
14. Пальчикова И.Г., Омелянчук Л.В., Семешин В.Ф., Алексеева А.Л., Жимулев И.Ф. Интегральный метод измерения количества ДНК в клетке с использованием цифровой микрофотографии // Цитология. 2010. Т. 52, №4. С. 349-353.
15. Ратнер В.А. Молекулярная эволюция / В.Ф. Ратнер // Современное естествознание: Энциклопедия. Т.2 Общая биология. М.: Наука-Флинта, 1999. С.63-68.
16. Рылов В.М. Cyclopoidea пресных вод / В.М. Рылов. В кн.: Фауна СССР. Т. 3. Вып. 3. Ракообразные. М. – Л., 1948. 312 с.
17. Сингер М. Гены и геномы в 2 томах / М. Сингер, П. Берг. М.: Мир, 1998. 391 с.
18. Семешин В. Ф. (и др.) Содержание ДНК в ядрах *Cyclops kolensis* и *C.insignis* (Crustacea, Copepoda) // Цитология. 2011. Т.53, №3. С. 285-289.
19. Тимошкин О.А. Атлас и определитель пелагобионтов Байкала / О.А. Тимошкин (и др.). Новосибирск: Наука, 1995. 694с.
20. Тимошкин О.А. Озеро Байкал: разнообразие фауны, проблемы ее несмешиваемости и происхождения, экология и «экзотические» сообщества // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: в 2 томах / ред. О. А. Тимошкин. Новосибирск: Наука, 2001. Т. 1. С. 16-74.
21. Шевелева Н.Г. (и др.) Видовой состав и экология циклопов в оз. Байкал // Сборник лекций и докладов международной школы-конференции «Актуальные проблемы изучения ракообразных континентальных вод». 2012. С. 319-322.

22. Шевелева Н.Г. Зоопланктон южной части пролива Малое Море (оз. Байкал) / Н.Г. Шевелева, О.Г. Пенькова // Биология внутренних вод. 2005. № 4. С. 42-49.
23. Щербаков Д.Ю. Сравнительное исследование эволюционных историй букетов видов байкальских беспозвоночных: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук: 03.00.08, 03.00.15 // Щербаков Дмитрий Юрьевич. М., 2003. 39 с.
24. Хедрик Ф. Генетика популяций / Ф. Хедрик. М.: Техносфера, 2003. 592с.
25. Adamowicz S.J., Menu-Marque S., Purvis A. Molecular systematics and patterns of morphological evolution in the Centropagidae (Copepoda: Calanoida) of Argentina // Biological Journal of the Linnean Society. 2007. Vol. 90. P. 279-292.
26. Akaike H. A new look at the statistical model identification // IEEE Transactions on Automatic Control. 1974. Vol. 19, №. 6. P. 716-723.
27. Alekseev V.R., Fefilova E., Dumont H.J. Some noteworthy free-living copepods from surface freshwater in Belgium // Belg. J Zool. 2002. Vol. 132. P. 133-139.
28. Arbogast B. S., Edwards S. V., Wakeley J., Beerli P., Slowinski J.B. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 2002. Vol. 33. P. 707–740.
29. Arenas M. Trends in substitution models of molecular evolution // Frontiers in Genetics. 2015. Vol. 6. P. 1- 9.
30. Austin C.M., Tan M.H., Croft L.J., Meekan M.G., Pierce S.J., Gan H.M. The complete mitogenome of the whale shark parasitic copepod *Pandarus rhincodonicus norman*, Newbound, Knott (Crustacea; Siphonostomatoida; Pandaridae) - a new gene order for the copepod // Mitochondrial DNA. 2014. Vol. 27, № 1. P. 694-695.
31. Barrera-Moreno O.A., Ciro-Pérez J., Ortega-Mayagoitia E., Alcántara-Rodríguez J. A., Piedra-Ibarra E. From Local Adaptation to Ecological Speciation in

Copepod Populations from Neighboring Lakes // PLoS ONE. 2015. Vol. 10, №. 4. e0125524.

32. Blaha M., Hulak M., Tistel J. Molecular and morphological patterns across *Acanthocyclops vernalis* – *robustus* species complex (Copepoda, Cyclopoida) // Zoologica Scripta. 2010. Vol. 39, №. 3. P. 259 – 268.

33. Blaha M. Molecular and morphological aspects within *Acanthocyclops* Kiefer, 1927. Ph.D. thesis...Czech Republic, Vodňany, 2011. 66 p.

34. Bollback J.P. Posterior mapping and predictive distributions // R. Nielsen, ed., Statistical Methods in Molecular Evolution. New York: Springer Verlag, 2005. P. 439-462.

35. Bos D. H., Posada D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees // Developmental and Comparative Immunology. 2005. Vol. 29. P. 211–227.

36. Boveri T. Über Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megalocephala* / T. Boveri. Anat. Anz. 1887. Vol. 2. P. 688–693.

37. Boxshall G. A., Evstigneeva G.A., Clark P.F. A new interstitial cyclopoid copepod from a sandy beach on the western shore of Lake Baikal, Siberia // Hydrobiologia. 1993. Vol. 268. P. 99-107.

38. Boxshall G. A., Jume D. Making waves: the repeated colonization of fresh water by copepod crustaceans // Advances in Ecological Research. 2000. Vol. 31. P. 61–79.

39. Britten R. J. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups // Science. 1986. Vol. 231. P. 1393-1398.

40. Bron J. E. (*et al.*) Observing copepods through a genomic lens // Frontiers in Zoology. 2011. Vol. 8. P. 22 – 36.

41. Britton T., Oxelman B., Vinnersten A., Bremer K. Phylogenetic dating with confidence intervals using mean path lengths // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2002. Vol. 24. P. 58-65.

42. Bryant S.A., Herdy J.R., Amemiya C.T., Smith J.J. Characterization of somatically-eliminated genes during development of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) // *Molecular Biology and Evolution*. 2016. Vol. 33. P. 2337-2344.
43. Bryant Cr., Fischerb M., Linzc S., Sempeld Ch. On the Quirks of Maximum Parsimony and Likelihood on Phylogenetic Networks [электронный ресурс] // *Journal of Theoretical Biology*. 2017. Vol. 417. Режим доступа: <https://arxiv.org/abs/1505.06898>
44. Bucklin A., Frost B., Bradford-Grieve J., Allen L., Copley N. Molecular systematic assessment of thirty-four calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae using DNA sequences of mtCOI and nuclear 18S rRNA // *Mar. Biol.* 2003. Vol. 142. P. 333-343.
45. Cao M. D., Allison L., Dix T. I. Boden M. Robust Estimation of Evolutionary Distances with Information Theory // *Mol. Biol. Evol.* 2016. Vol. 33, № 5. P. 1349 1357.
46. Capua I. D., Maffucci F., Pannone R., Mazzocchi M.G., Biffali E., Amato A. Molecular phylogeny of Oncaenidae (Copepoda) using nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS rDNA) [электронный ресурс] // *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, № 4. Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175662>.
47. CLC, CLC Genomics Workbench Manual—Trimming using the Trim tool. [электронный ресурс]. 2015. Режим доступа: http://www.clcsupport.com/clcgenomicsworkbench/800/index.php?manual=Trimming_using_Trim_tool.html.
48. Chen G., Hare M. Cryptic ecological diversification of a planktonic estuarine copepod, *Acartia tonsa* // *Molecular Ecology*. 2008. Vol. 17. P. 1451-1468.
49. Chen G., Hare M. Cryptic diversity and comparative phylogeography of the estuarine copepod *Acartia tonsa* on the US Atlantic coast // [Mol Ecol](#). 2011. Vol. 20, № 11. P. 2425-2441.

50. Cornils A., Held Ch. Evidence of cryptic and pseudocryptic speciation in the *Paracalanus parvus* species complex (Crustacea, Copepoda, Calanoida) // *Frontiers in Zoology*. 2014. Vol. 11. No. 19. P. 1-17.
51. D'Amato M.E. (et al.) Molecular dating and biogeography of the neritic krill *Nyctiphanes* // *Mar. Biol.* 2008. Vol. 155. P. 243-247.
52. Darras H., Aron S. Introgression of mitochondrial DNA among lineages in a hybridogenetic ant [электронный ресурс] // *Biology letters*. 2015. Vol. 11, № 2. P. Режим доступа: <http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/11/2/20140971>.
53. De Bruyn A. *Phylogenetic Reconstruction Methods: An Overview* / A. De Bruyn, D. P. Martin, P. Lefeuvre, ed. P. Besse // *Molecular Plant Taxonomy*. New York: Humana Press, 2014. P. 257-277.
54. Degtyarev S., Boykova T., Grishanin A., Belyakin S., Robutsov N., Karamysheva T., Makarevich G., Akifiev A., Zhimulev I. The molecular structure of the DNA fragments eliminated during chromatin diminution in *Cyclops kolensis* // *Genome Research*. 2004. Vol. 14. P. 2287 – 2294.
55. Dhar A. Maximum Likelihood Methods for Phylogenetic Inference [электронный ресурс] // 2015. Режим доступа: <https://www.stat.washington.edu/vminin/papers/Dhar2016.pdf>.
56. Drouin G. (et al.) Variable arrangement of 5S ribosomal genes within ribosomal DNA repeats of arthropods // *Mol. Biol. Evol.* 1992. Vol. 9. P. 826-835.
57. Drummond A.J., Suchard M.A. Bayesian random local clocks, or one rate to rule them all // *BMC Biology*. 2010. Vol. 8. P. 114.
58. Dussart B. *Repertoire Mondial des Copepodes Cyclopoides* / B. Dussart. – Paris : Editions du C.N.R.S., 1985. 236 p.
59. Dussart B. *World directory of Crustacea Copepoda of inland waters II. Cyclopiformes* / B. Dussart, D. Deffae. Leiden : Backhuys Publisher, 2006. 354 p.
60. Einsle U. *Crustacea: Copepoda: Calanoida und Cyclopoida. Subwasserfauna von Mitteleuropa Bd.8. Heft 4. Teil*: Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1993. 209 p.

61. Einsle U. Copepoda: Cyclopoida. Genera *Cyclops*, *Megacyclops*, *Acanthocyclops*. Guide to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World. SPB Academic Publishing, 1996. 81 p.
62. Felsenstein J. Maximum likelihood and Minimum-Steps Methods for Estimating Evolutionary Trees from Data on Discrete Characters // Systematic Zoology. 1973. Vol. 22, № 3. P. 240-249.
63. Felsenstein, J. «Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach» // Journal of molecular evolution. 1981. Vol. 17. No. 6. P. 368–376.
64. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. Vol. 39. P. 783-791.
65. Felsenstein J. Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability // Annual Review of Genetics. 1988. Vol. 22. P. 521-565.
66. Felsenstein J. Inferring Phylogenies / J. Felsenstein. Sunderland, USA: Sinauer Associates, 2004. 663 p.
67. Feng H.L., Wang L., Huang J., Jiang J., Tang D., Fang R., Su Y. Complete mitochondrial genome of *Sinergasilus polycolpus* (Copepoda: Poecilostomatoida) [электронный ресурс] // Mitochondrial DNA. 2015. Vol. 7. Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19401736.2015.1060460>
68. Figueroa D.F. Phylogenetic Analysis of *Ridgewayia* (Copepoda: Calanoida) from the Galapagos and of a New Species from the Florida Keys With a Reevaluation of the Phylogeny of Calanoida // Journal of Crustacean Biology. 2011. Vol. 31. No. 1. P.153-165.
69. Fitch W. M., Margoliash E. Construction of phylogenetic trees // Science. 1967. Vol. 155. P. 279-284.
70. Fitch W.M. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology // Syst. Zool. 1971. Vol. 20. P. 406-416.
71. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biotechnol. 1994. Vol. 3. P. 294-299.

72. Gallassi D. M. P., Laurentiis P. De Little-known cyclopoids from groundwater in Italy: re-validation of *Acanthocyclops agamus* and redescription of *Speocyclops Italicus* (Crustacea, Copepoda, Cyclopoida) // Vie et milieu. 2004. Vol. 54, № 4. P. 203-222.
73. Gaunt M. W., Miles M. A. An Insect Molecular Clock Dates the Origin of the Insects and Accords with Palaeontological and Biogeographic Landmarks // Mol. Biol. Evol. 2002. Vol. 19, № 5. P. 748-761.
74. Gillooly J.F., Allen A.P., West G.B., Brown J.H. The rate of DNA evolution: Effects of body size and temperature on the molecular clock // PNAS. 2005. Vol. 102, № 1. P. 140-145.
75. Goetze E. Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae // Proc. R. Soc. Lond. 2003. Vol. 270. P. 2321–2331.
76. Gressey R., Patterson C. Fossil Parasitic Copepods from a Lower Cretaceous Fish // Science. 1973. Vol. 180. P. 1283-1285.
77. Cressey R., Boxshall G. Kabatarina pattersoni, a fossil parasitic copepod (Dichelethiidae) from a Lower Cretaceous Fish // Micropaleontology. 1989. Vol. 35. P. 150–167.
78. Grishanin A.K., Akifyev A.P., Dahms H.U. Nuclear DNA and remarks on chromatin diminution of cyclopoid copepods // Zoological Studies. 2004. Vol. 43, № 2. P. 300-303.
79. Grishanin A. K., Rasch E.M., Dodson S.I., Wyngaard G.A. Variability in genetic architecture of the cryptic species complex of *Acanthocyclops vernalis* (Copepoda). I. Evidence from karyotypes, genome size, and ribosomal DNA sequences // Journal of Crustacean Biology. 2005. Vol. 25, № 3. P. 375 - 383.
80. Grishanin A.K. Chromatin diminution in Copepoda (Crustacea): pattern, biological role and evolutionary aspects // Comp Cytogenet. 2014. Vol. 8. P. 1–10.
81. Gutierrez-Aquirre M.A., Cervantes-Martinez A., Elias-Gutierrez M. An example of how barcodes can clarify cryptic species: the case of the Calanoid Copepod *Mastigodiptomus albuquerquensis* (Herrick) // PLoS ONE. 2014. Vol. 9, № 1. e85019.
82. Harpke D., Peterson A. [Non-concerted ITS evolution in Mammillaria](#)

[\(Cactaceae\)](#) // Molecular phylogenetics and evolution. 2006. Vol. 41, № 3. P. 579-593.

83. Harst G.D., Jiggins F.M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts// Proc Biol Sci.2005. Vol. 272, № 1572. P. 1525-1534.

84. Harvey T.H.P, Vélez M.I., Butterfield N.J. Exceptionally preserved crustaceans from western Canada reveal a cryptic Cambrian radiation// Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012. Vol.109. P.1589–1594.

85. Harvey T.H.P., B.E. Pedder. Copepod mandible palynomorphs from the Nolichucky Shale (Cambrian, Tennessee): Implications for the taphonomy and recovery of small carbonaceous fossils // PALAIOS. 2013. Vol. 28. P. 278–284.

86. Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA // J. Mol. Evol. 1985. Vol. 22. P. 160–174.

87. Hedges S.B., Parker P.H., Sibley C.G., Kumar S. Continental breakup and the ordinal diversification of birds and mammals // Nature. 1996. Vol. 381. P. 226-229.

88. Heiko A. Sh. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods / A. Sh. Heiko, A. von Haeseler, eds. Ph. Lemey, M. Salemi, A.M. Vandamme // The phylogenetic Handbook: A practical Approach to Phylogeny Analysis and Hypothesis Testing. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. 723 p.

89. Hillis D.M., Dixon M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference // Quart. Rev. Biol. 1991. Vol. 66. P. 411-453.

90. Hillis D.M., Moritz C. Molecular systematics // Sinauer Associates Inc, 1996. 588 p.

91. Hołyńska M. Latitudinal gradients in diversity of the freshwater copepod family Cyclopidae (Copepoda, Cyclopoida) / M. Hołyńska. In: D. Defaye, E. Suárez-Morales and C. von Vaupel Klein (Eds.) Studies on Freshwater Copepoda: A Volume in Honour of Bernard Dussart, Crustaceana Monographs 16. 2011. P. 245-269.

92. Hołyńska M., Leggitt L., Kotov A.A. Miocene cyclopoid copepod from a saline paleolake in Mojave, California // Acta Palaeontologica Polonica. 2016. Vol. 61, № 2. P. 345–361.

93. Hoorn C., Flantua S. An early start for the Panama land bridge // Science. 2015. Vol. 348. P. 186-187.
94. Huelsenbeck J., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics Applications Note. 2001. Vol. 17. P. 754-755.
95. Humes G. How many copepods? // Hydrobiologia. 1994. Vol. 292, № 293. P. 1-7.
96. Husley C.D., Gaecia-de-Leon F. J. Introgressive hybridization in a trophically polymorphic cichlid // Ecology and Evolution. 2013. Vol. 3, № 13. P. 4536-5447.
97. Huys R., Boxshall G. A. Copepod evolution. London : Ray Society, 1991. 468 p.
98. Huys R., Llewellyn-Hughes J., Olson P.D., Nagasawa K. Small subunit rDNA and Bayesian inference reveal *Pectenophilus ornatus* (Copepoda incertae sedis) as highly transformed Mytilicolidae, and support assignment of Chondracanthidae and Xarifiidae to Lichomolgoidea (Cyclopoida) // Biological Journal of the Linnean Society. 2006. Vol. 87. P. 403-425.
99. Huys R., Suárez-Moralis E., Serrano-Sánchez M.L., Centeno-García E., Vega F.J. Early Miocene amber inclusions from Mexico reveal antiquity of mangrove-associated copepods [электронный ресурс] // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. Режим доступа: <https://www.nature.com/articles/srep34872>.
100. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Gene. 1990. Vol. 96. P. 23-28.
101. Jukes T.H. Evolution of protein molecules. In: Mammalian protein metabolism / T.H. Jukes, C.R. Cantor, ed. H.N. Munro. Academic press. New York, 1996. P. 21 - 132.
102. Kass R.E., Raftery A.E. Bayes factors. // Journal of the American Statistical Association. 1995. Vol. 90. P. 773-795.
103. Karanovic T. On *Reidcyclops*, new genus (Crustacea, Copepoda), with the first description of the male of *Reidcyclops trajani* (Reid, Strayer, 1994), new combination // Beaufortia. 2000. Vol. 50, № 3. P. 79-88.

104. Karanovic T. Two new genera and three new species of subterranean cyclopoids (Crustacea, Copepoda) from New Zealand, with redescription of *Goniocyclops silvestris* Harding, 1958 // Contributions to Zoology. 2005. Vol. 74, № 3/4. P. 223-254.
105. Ki J.-S., Park H.G., Lee J.-S. The complete mitochondrial genome of the cyclopoid copepod *Paracyclopina nana*: a highly divergent genome with novel gene order and atypical gene numbers // Gene. 2009. Vol. 435. P. 13-22.
106. Ki J.-S., Lee K.W., Park H.G., Chullasorn S., Dahms H.U., Lee J.S. Phylogeography of the copepod *Tigriopus japonicus* along the Northwest Pacific rim // J. Plankton Research. 2009. Vol. 31, № 2. P. 209-221.
107. Kiefer F. Versus eines Systems der Cyclopiden // Zool. Anz. 1927. Vol. 73. P. 302-308.
108. Kiefer F. Cyclopoida Gnathostoma // Das Tierreich. – 1929. Vol. 53. P. 1-102.
109. Kiesling T. Rapid Identification of Adult and Naupliar Stages of Copepods Using DNA Hybridisation Metodology // Mar. Biotechnol. 2002. Vol.4. P. 30-39.
110. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution. 1980. Vol. 16. P. 111-120.
111. Kilpert F., Podsiadlowski L. The complete mitochondrial genome of the common sea slater, *Ligia oceanica* (Crustacea, Isopoda) bears a novel gene order and unusual control region features // BMC Genomics. 2006. Vol. 7. P. 241 - 258.
112. Knowlton N., Weight L.A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama // Proc. R. Soc. Lond. 1998. Vol. 265. P. 2257-2263.
113. Ko K.S., Jang H.S. Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum* // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2002. Vol. 23. P. 112-122.
114. [Korn M.](#), Rabet N., Ghaté H.V., Marrone F., Hundsdoerfer A.K. Molecular phylogeny of the Notostraca // [Mol. Phylogenet. Evol.](#) 2013. Vol. 69, № 3. P. 1159-1171.

115. Kumar S., Hedges S.B. Advances in Time Estimation Methods for Molecular Data // *Mol. Biol. Evol.* 2016. Vol. 33, № 4. P. 863-869.
116. Lajus D., Sukhikh N., Alekseev V. Cryptic or pseudocryptic: can morphological methods inform copepod taxonomy? An analysis of publications and a case study of the *Eurytemora affinis* species complex // *Ecology and Evolution*. – 2015. Vol. 5, № 12. P. 2374–2385.
117. Lee C. E. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate “populations” // *Evolution*. 2000. Vol. 54. P. 2014–2027.
118. Lee S.Y., S. Rasheed A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // *Biotechniques*. 1990. Vol. 6. P. 676-679.
119. Lefebure T., Douady C.J., Gouy M., Gibert J. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation // *Mol. Phyl. and Evol.* 2006. Vol. 40. P. 435-447.
120. Lee M.S.Y., Ho S.Y.W. Molecular clocks // *Current Biology*. – 2016. Vol. 26. P. R387-R407.
121. Lepage Th., Bryant D., Philippe H., Lartillot N. A General Comparison of Relaxed Molecular Clock Models // *Mol. Biol. Evol.* 2007. Vol. 24, № 12. P. 2669-2680
122. Lin C-YG., Lin I-T., Yao M-C. Programmed Minichromosome Elimination as a Mechanism for Somatic Genome Reduction in *Tetrahymena thermophile* // *PLoS Genet.* 2016. Vol. 12, № 11. P. e1006403.
123. Lockhart P. J., Steel M. A., Hendy M. D., Penny D. Recovering Evolutionary Trees under a More Realistic Model of Sequence Evolution // *Mol. Biol. Evol.* 1994. Vol. 11, № 4. P. 605-612.
124. Machida R.J., Miya M.U., Nishida M., Nishida S. Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicas* (Crustacea: Copepoda) // *Mar. Biotechnol.* 2002. Vol. 4, № 4. P. 406 – 417.

125. Machida R.J., Miya M.U., Nishida M., Nishida S. Large-scale gene arrangements in the mitochondrial genomes of two calanoid copepods *Eucalanus bungii* and *Neocalanus cristatus* (Crustacea), with notes on new versatile primers for the srRNA and COI genes // Gene. 2004. Vol. 332. P. 71–78.
126. Machida R.J., Miya M.U., Nishida M., Nishida S. Molecular phylogeny and evolution of the pelagic copepod genus *Neocalanus* (Crustacea: Copepoda) // Marine Biology. 2006. Vol. 148. P. 1071-1079.
127. Marrone F., Lo Brutto S., Hundsdoerfer A.K., Arculeo M. Overlooked cryptic endemism in copepods: Systematics and natural history of the calanoid subgenus *Occidiaptomus* Borutzky 1991 (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae) // Mol. Phyl. and Evol. 2013. Vol. 66. P. 190-202.
128. Martin A. P., Palumbi S.R. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock // Proc. Nat. Acad. Sci. 1993. Vol. 90. P. 4087 – 4091.
129. Marco P.B. Fossil Calibration of Molecular Clocks and the Divergence Times of Geminant Species Pairs Separated by the Isthmus of Panama // Mol. Biol. Evol. 2002. Vol. 19, № 11. P. 2005-2021.
130. McGuire J.A., Linkem C.W., Koo M.S., Hutchison D.W., Lappin A.K., Orange D.I., Lemos-Espinal J., Riddle B.R., Jaeger J.R. Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: phylogenetics of crotaphytid lizards // Evolution. 2007. Vol. 61, № 12. P. 2879-2897.
131. McKinnon Ch., Drouin G. Chromatin diminution in the copepod *Mesocyclops edax*: elimination of both highly repetitive and nonhighly repetitive DNA // Genome. 2013. Vol. 56, № 1. P. 1-8.
132. Mello B., Tao Q., Tamura K., Kumar S. Fast and accurate estimates of divergence times from big data // Molecular Biology and Evolution. 2017. Vol. 34, № 1. P. 45-50.
133. Minxiao W., Song S., Chaolun L., Xin Sh. Distinctive mitochondrial genome of the Calanoid copepod *Calanus sinicus* with multiple large non-coding regions and reshuffled gene order: Useful molecular markers for phylogenetic and

population studies [электронный ресурс] // BMC Genomics. 2011. Vol. 12. Режим доступа: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-73>

134. Miracle M.R., Alekseev V., Monchenko V., Vicente E. Molecular-genetic-based contribution to the taxonomy of the *Acanthocyclops robustus* group // Journal of Natural History. 2013. Vol. 47, № 5-12. P. 863-888.

135. Monchenko V.I. Cryptic species in *Diacyclops bicuspidatus* (Copepoda: Cyclopoida): evidence from crossbreeding studies // Hydrobiologia. 2000. Vol. 417, № 1. P. 101-107.

136. Montes C. (et al.) Middle Miocene closure of the Central American Seaway // Science. 2015. Vol. 348. P. 226-229.

137. Moss T. Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA Polymerase I / T. Moss, V.Y. Stefanovsky. In: Progress in Nucleic Acids and Molecular Biology (Cohn W.E. and Moldave K. eds). San Diego: Academic Press Inc., 1995. P. 25-66.

138. Mount D. W. Choosing a Method for Phylogenetic Prediction [электронный ресурс] // CSH Protocols. 2008. Vol. 3, № 4. Режим доступа: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2008/4/pdb.ip49.full.pdf+html>.

139. Mount D. W. Maximum Parsimony Method for Phylogenetic Prediction [электронный ресурс] // CSH Protocols. 2008. Vol. 5. Режим доступа: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2008/4/pdb.ip49.full.pdf+html>.

140. Nabholz B., Lanfear R., Fuchs J. Body mass-corrected molecular rate for bird mitochondrial DNA // Molecular Ecology. 2016. Vol. 25, № 18. P. 4438–4449.

141. Nei M. Molecular Evolution and Phylogenetics / M. Nei, S. Kumar. New York: Oxford University Press, 2000. 333 p.

142. Nilssen J.P. Problems of subspecies recognition in freshwater cyclopoid copepods // Z. zool. Syst. Evolut. Research. 1979. Vol. 17. P. 285-295.

143. Odorico D.M., Miller D.J. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): patterns of variation consistent with reticulate evolution // Mol Biol Evol. 1997. Vol. 14, № 5. P. 465-473.

144. Ohtsuka S., Huys R. Sexual dimorphism in calanoid copepods: morphology and function // *Hydrobiologia*. 2001. Vol. 453, № 54. P. 441-466.
145. Palmer A.R. Miocene Copepods from the Mojave desert, California // *J. Paleontology*. 1960. Vol. 34, № 3. P. 447-452.
146. Papousheva E., Proviz V., Lambkin Ch., Goddeeris B., Blinov A. Phylogeny of the endemic Baikalian Sergentia (Chironomidae, Diptera) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2003. Vol. 29. P. 120-125.
147. Rasch E.M., Wyngaard G.A. Genome sizes of cyclopoid copepods (Crustacea): evidence of evolutionary constraint // *Biol. J. Linn. Society*. 2006. Vol. 87. P. 625-635.
148. Rawson P.D., Burton R.S. Molecular adaptation at the cytochrome c oxidase subunit 2 gene among divergent populations of the intertidal copepod, *Tigriopus californicus* // *J. Molec. Evol.* 2006. Vol. 62. P. 753-764.
149. Regier J.C., Shultz J.W., Kambic R.E. Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crustaceans and maxillopods are not monophyletic // *Proc. Biol. Sci.* 2005. Vol. 272, № 1561. P. 395-401.
150. Regier J., Shultz J.W., Zwick A., Hussey A., Ball B., Wetzer R., Martin J.W., Cunningham C.W. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences // *Nature*. 2010. Vol. 463. P. 1079-1083.
151. Reid J. W. (*et al.*) *Rheocyclops*, a new genus of copepods from the southeastern and central U.S.A. (Copepoda: Cyclopoida: Cyclopidae) // *Journal of Crustacean Biology*. 1999. Vol. 19, № 2. P. 384-396.
152. Reid J. W., Ishida T. *Itocyclops*, a new genus proposed for *Speocyclops yezoensis* (Copepoda: Cyclopoida: Cyclopidae) // *Journ. Crust. Biol.* – 2000. Vol. 20. P. 589-596.
153. Reid J. W. Latitudinal diversity patterns of continental benthic copepod species assemblages in the Americas // *Hydrobiologia*. 2004. Vol. 292, № 293. P. 341-349.

154. Rocha-Olivares A., Fleege J. W., Foltz D. W. Decoupling of Molecular and Morphological Evolution in Deep Lineages of a Meiobenthic Harpacticoid Copepod // *Mol. Biol. Evol.* 2001. Vol. 18, № 6. P. 1088–1102.
155. Rodriguez F., Oliver J.F., Marin A., Medina J.R. The General Stochastic Model of Nucleotide Substitution // *J. theor. Biol.* 1990. Vol. 142. P. 485–501.
156. Roe A. D., Sperling F.A.H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2006. Vol. 44. P. 325–345.
157. Ronquist F., Huelsenbeck J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. 2003. Vol. 19. P. 1572-1574.
158. Ronquist F. Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes / F. Ronquist, P. van der Mark, J.P. Huelsenbeck, eds.: Ph. Lemey, M. Salemi, A.M. Vandamme // *The phylogenetic Handbook: A practical Approach to Phylogeny Analysis and Hypothesis Testing*. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. P. 210 - 266.
159. Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Hueslenbeck J.R. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space // *Systematic Biology*. 2012. Vol. 61, № 3. P. 539–542.
160. Rozas J. (*et al.*) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods // *Bioinformatics*. 2003. Vol. 19, № 18. P. 2496 – 2497.
161. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. Vol. 4. P. 406 -425.
162. Sanderson M.J. A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy // *Molecular Biology and Evolution*. 1997. Vol. 14. P. 1218-1231.
163. Sanderson M.J. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: A penalized likelihood approach // *Molecular Biology and Evolution*. 2002. Vol. 19. P. 101-109.
164. Sarich V.M., Wilson A.C. Generation time and genomic evolution in primates // *Science*. 1973. Vol. 179. P. 1144- 1147.

165. Sheveleva N.G. (*et al.*) A new psammophilic species of the genus *Diacyclops* (Crustacea: Cyclopoida) from the littoral zone of Lake Baikal (East Siberia) // *Invertebrate Zoology*. 2010. Vol. 7, № 1. P. 47-54.
166. Schubart C. D., Diesel R., Hedges B. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs // *Nature*. 1998. Vol. 393. P. 363-365.
167. Simon Y.W.H., Simon Y.W.H., Duchêne S. Molecular-clock models for estimating evolutionary rates and timescales // *Molecular Ecology*. 2014. Vol. 23, № 24. P. 5947–5965.
168. Sleden P. A., Huys R., Stephenson M.H., Heward A.P., Taylor P.N. Crustaceans from bitumen clast in Carboniferous glacial diamictite extend fossil record of copepods [электронный ресурс] // *Nature Communications*. 2010. Vol. 1, № 50. Режим доступа: <http://www.paulselden.net/uploads/7/5/3/2/7532217/copepods.pdf>.
169. Standiford D.M. The effect of chromatin diminution on the pattern of C-banding in the chromosomes of *Acanthocyclops vernalis* Fischer (Copepoda: Crustacea) // *Genetica*. 1989. Vol. 79. P. 207-214.
170. Stella E. Contribution to the taxonomy and distribution of *Cyclops abyssorum* Sars (Crustacea, Copepoda) in several lakes and ponds of central Italy // *Hydrobiology*. 1988. Vol. 167-168, № 1. P. 381-385.
171. Stoch F. How many species of *Diacyclops*? New taxonomic characters and species richness in a freshwater cyclopoid genus (Copepoda, Cyclopoida) // *Hydrobiologia*. 2001. Vol. 453/454. P. 525-531.
172. Streit A., Davis R., Richard E. Chromatin Diminution [электронный ресурс] // eLS. 2016. Режим доступа: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001181.html>.
173. Streit A., Wang J., Kang Yu., Davis R.E. Gene silencing and sex determination by programmed DNA elimination in parasitic nematodes // *Current Opinion in Microbiology*. 2016. Vol. 32. P. 120-127.
174. Sun Ch., Wyngaard G., Walton D.B., Wichman H.A., Mueller R.L. Billions of basepairs of recently expanded, repetitive sequences are eliminated from the somatic genome during copepod development // *BMC Genomics*. 2014. Vol. 15. P. 186.

175. Su Y.B. (*et al.*) Complete mitochondrial genome of *Lernaea cyprinacea* (Copepoda: Cyclopoida) // Mitochondrial DNA. 2014. Vol. 1. No. 2.
176. Tajima F., Nei M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences // Mol. Biol. Evol. 1984. Vol. 1. P. 269 – 285.
177. Takezaki N., Rzhetsky A., Nei M. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees // Molecular Biology and Evolution. 1995. Vol. 12. P. 823-833.
178. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases // Mol. Biol. Evol. 1992. Vol. 9. P. 678-687.
179. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. Vol. 10. P. 512–526.
180. Tamura K., Murillo O., Battistuzzi F.U., Kumar S. Estimating divergence times in large molecular phylogenies // PNAS. 2012. Vol. 109, № 47. P. 19333–19338.
181. Tamura K., Strecher G., Peterson D., Fillipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. and Evol. 2013. Vol. 30. P. 2725-2729.
182. Thum R. A., Harrison R.G. Deep genetic divergences among morphologically similar and parapatric *Skistodiaptomus* (Copepoda: Calanoida: Diaptomidae) challenge the hypothesis of Pleistocene speciation // Biological Journal of the Linnean Society. 2009. Vol. 96. P. 150 – 165.
183. To Th.H., Jung M., Lycett S., Cascuel O. Fast Dating Using Least-Squares Criteria and Algorithms // Syst. Biol. 2016. Vol. 65. No. 1. P. 82-97.
184. Thorne J.L., Kishino H., Painter I.S. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution // Mol. Biol. Evol. 1998. Vol. 15, № 12. P.1647-57.
185. Wang J., Mitreva M., Berriman M., Thorne A., Magrini V., Koutsovoulos G., Kumar S., Blaxter M.L., Davis R.E. Silencing of germline-expressed genes by DNA elimination in somatic cells // Dev. Cell. 2012. Vol. 23. P.1072-1080.
186. Wang J., Davis R.E. Programmed DNA elimination in multicellular organisms // Current Opinion in Genetics, Development. 2014. Vol. 27. P. 26–34.

187. Wilhelm J., Pingoud A., Hahn M. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31. e56.
188. Wilke T., Schultheiß R., Albrecht Ch. As time goes by: A simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates // *Amer. Malac. Bull.* – 2009. Vol. 27. P. 25-45.
189. Wilkinson I.P., Wilby P.R., Williams M., Riley D.A. Exceptionally preserved ostracodes from Middle Miocene paleolake, California, USA // *Journal of the Geological Society.* 2010. Vol. 167. P. 817-825.
190. Wolstenholme D.R. Animal Mitochondrial-DNA - Structure and Evolution // *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology.* – 1992. Vol. 141. P. 173–216.
191. Wingard G.A., McLaren I. A., White M.M., Seigny J.- M. Unusually high numbers of ribosomal RNA genes in copepods (Arthropoda: Crustacea) and their relationship to genome size // *Genome.* 1995. Vol. 38. P. 97-104.
192. Wingard G.A., Hołyńska M., Schulte II J.A. Phylogeny of the freshwater copepod *Mesocyclops* (Crustacea: Cyclopidae) based on combined molecular and morphological data, with notes on biogeography // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2010. Vol. 55. P. 753-764.
193. Wyngaard G.A., Rasch E.M., Connelly B.A. Unusual augmentation of germline genome size in *Cyclops kolensis* (Crustacea, Copepoda): further evidence in support of a revised model of chromatin diminution // *Chromosome Res.* 2011. Vol. 19, № 7. P. 911-923.
194. Xia X., Xie Zh., Salemi M., Chen L., Wang Y. An index of substitution saturation and its application // *Mol. Phyl. Evol.* 2003. Vol. 26, № 1. P. 1-7.
195. Xia X. DAMBE6: New tools for microbial genomics, phylogenetics and molecular evolution [электронный ресурс] // *J. Heredity.* 2017. Vol. 108, № 4. P. 431-437.
196. Young Sh.-S., Lee Y.-Y., Liu M.-Y. Genetic variability and divergence of *Neutrodiaptomus tumidus* Kiefer 1937 (Copepoda: Calanoida) among 10 subpopulations in the high mountain range of Taiwan and their phylogeographical

relationships indicated by mtDNA COI gene // Zoological Studies. 2014. V. 53. P. 22-32.

197. Zagoskin M.V., Marshak T.L., Mukha D.V., Grishanin A.K. Chromatin Diminution Process Regulates rRNA Gene Copy Number in Freshwater Copepods // Acta Nature. 2010. Vol. 2, № 4(7). P. 52-57.

198. Zagoskin M.V., Lazareva V.I., Grishanin A.K., Mukha D.V. Phylogenetic Information Content of Copepoda Ribosomal DNA Repeat Units: ITS1 and ITS2 Impact [электронный ресурс] // BioMed Research International. 2014. Vol. 2014. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/926342>

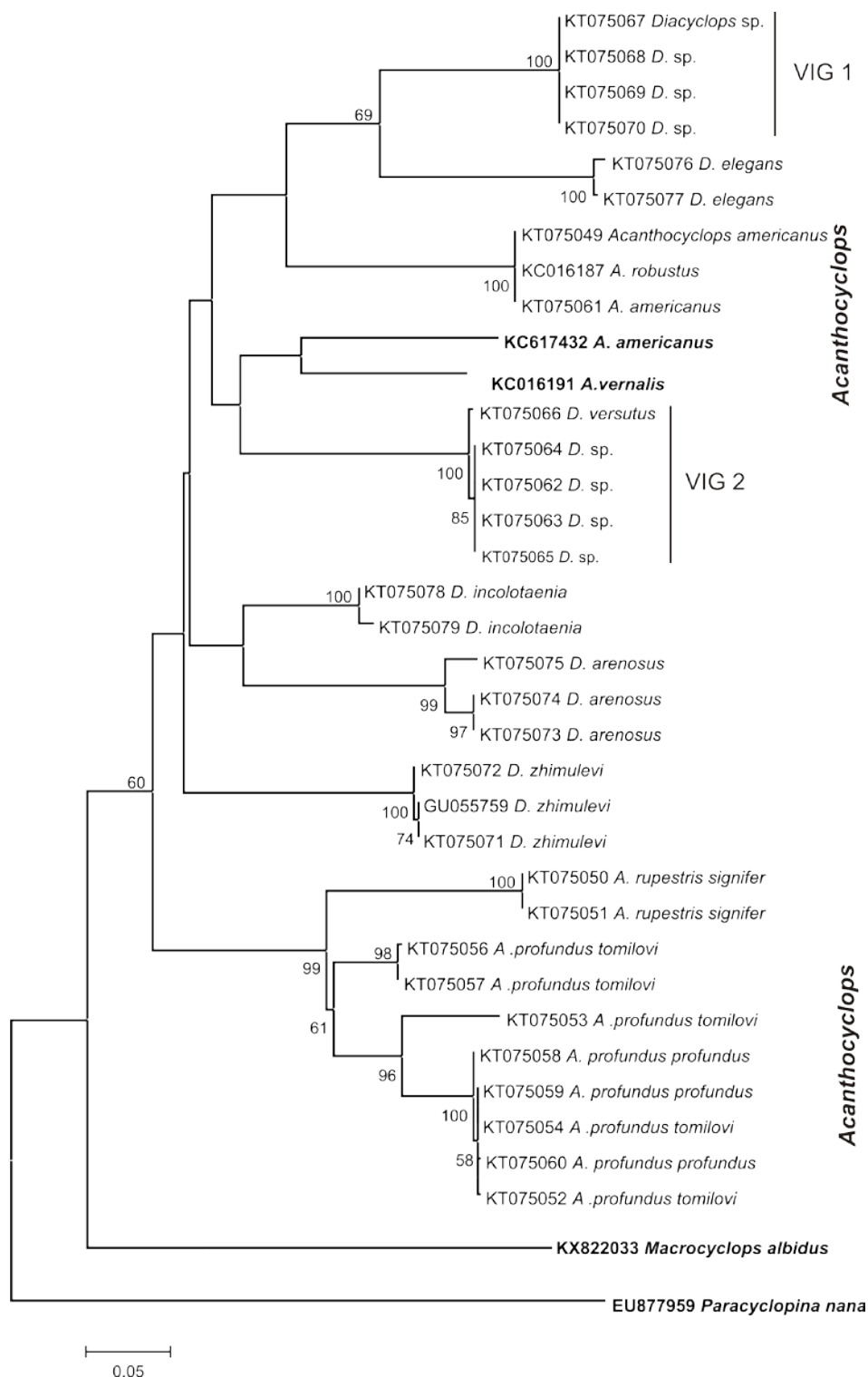
199. Zharkikh A. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences // Mol. Evol. 1994. Vol. 39. P. 315–329.

200. Zuckerkandl E., Pauling, L. Molecular disease, evolution and genetic heterogeneity // Horizons in Biochemistry. New York: Academic. 1962. P. 189–225.

201. Zuckerkandl E. Evolutionary divergence and convergence in proteins / E. Zuckerkandl, L. Pauling; edited by V. Bryson and H.J. Vogel. Evolving Genes and Proteins. New York : Academic Press, 1965. P. 97-166.

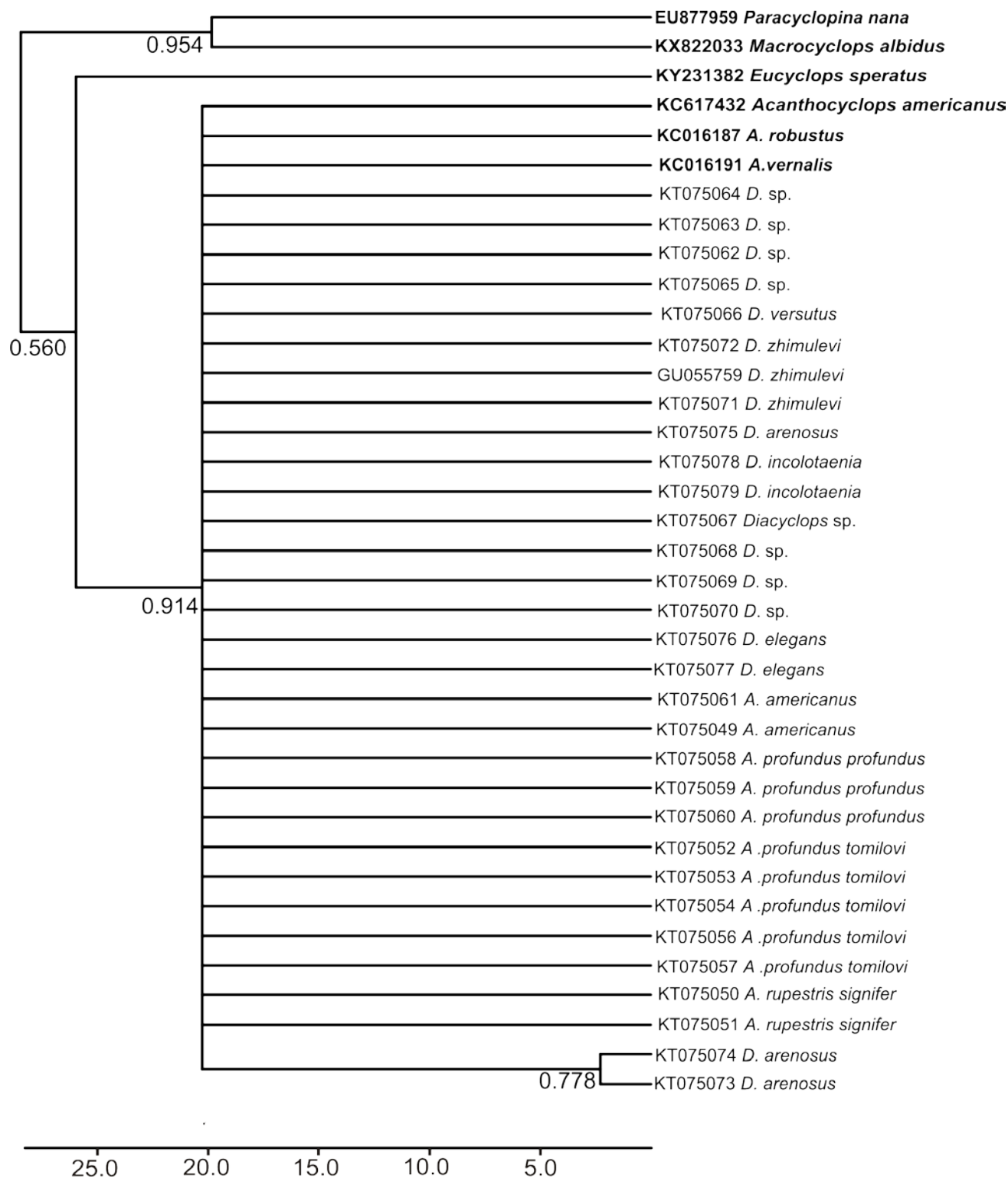
ПРИЛОЖЕНИЕ А

Филогенетическое древо (ML, K2P с учетом 1, 2 позиций кодона). Перед видовым названием указан инвентарный номер в GenBank. Числа в узлах - значения бут-стреп поддержек > 50% узлов ветвления. Жирным шрифтом выделены последовательности, позаимствованные из банка данных GeneBank



ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Филогенетическое дерево для родов *Diacyclops* / *Acanthocyclops* с наложением шкалы дивергенции в миллионах лет. Число в узле – значение апостериорной вероятности



ПРИЛОЖЕНИЕ В

Филогенетическое дерево для представителей *C. kolensis* с наложением шкалы дивергенции в миллионах лет. Число в узле – значение апостериорной вероятности

