

УДК 551.465

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КОПЕПОДЫ *LIMNOCALANUS MACRURUS* АРКТИЧЕСКИХ МОРЕЙ РОССИИ

© 2019 г. Н. В. Гордеева^{1, 2*}, А. В. Дриц², М. В. Флинт²¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия² Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Москва, Россия

*e-mail: ribka04@mail.ru

Поступила в редакцию 28.05.2019 г.

После доработки 11.06.2019 г.

Принята к публикации 18.06.2019 г.

Изменчивость, филогенетические связи и демографическая история реликтовой копеподы *Limnocalanus macrurus* из эстуарных зон крупнейших сибирских рек — Оби, Хатанги, Лены, Индигирки и Колымы — исследованы на основе фрагмента митохондриального гена цитохром-оксидазы *c* (CO I). Показано, что сибирские популяции *Limnocalanus macrurus* вместе с популяциями из прибрежных озер Канадской Арктики и Балтийского моря принадлежат к единой палеарктической филогенетической линии, которая, скорее всего, переживала последний ледниковый максимум в одном рефугиуме и быстро расселилась внутри обширного ареала примерно 21 000–7500 тыс. лет назад. Наличие общих гаплотипов у *L. macrurus* из трех арктических морей России и отсутствие различий между ними в гаплотипических частотах может быть связано с небольшим временем существования популяций или генетическим обменом между ними.

Ключевые слова: реликтовая копепода *Limnocalanus macrurus*, митохондриальный ген цитохром-оксидазы *c*, филогенетические связи и демографическая история, эстуарии сибирских рек

DOI: 10.31857/S0030-1574596998-1007

Каляноидная копепода *Limnocalanus macrurus* (сем. Centropagidae, Crustacea, Calanoida) имеет обширный циркумполярный ареал и является важным компонентом арктических экосистем. *L. macrurus* потребляет широкий спектр фито- и зоопланктонных организмов и, в свою очередь, благодаря довольно большим размерам и высокому содержанию липидов представляет ценный пищевой ресурс для планктоноядных рыб [28]. Изначально этот вид считался пресноводным ледниковым реликтом [29], но впоследствии был обнаружен в самых разнообразных местах обитания, свидетельствующих о его широкой осмотической толерантности. Помимо внутренних озер Североамериканского континента, Карелии, Польши, Скандинавии, куда он проник в результате множественных инвазий предположительно в периоды трансгрессии арктических морей [7], *L. macrurus* встречается также в меромиктических прибрежных озерах, подпруженных ледниками фьордовых заливах и эстуариях арктических побережий Канады, России и Аляски; единичные популяции были найдены также в Балтийском и Каспийском морях [11, 29, 43, 47, 49, 52]. Современный

ареал *L. macrurus*, как и у прочих арктических прибрежных видов, на протяжении плейстоцена периодически почти полностью покрывался льдом, а значительные участки шельфа осушались из-за снижения уровня Мирового океана [33, 36]. В высоких и умеренных широтах масштаб и динамика циклических оледенений, длящихся десятки и сотни тысяч лет, оказали непосредственное влияние на зоогеографические границы регионов, таксономическое и биологическое разнообразие внутри них, пространственное распределение животных и растительных видов, их генетическую изменчивость и филогеографическую структуру [26, 30, 47]. Наступление ледников приводило к сокращению и смещению ареалов к югу, снижению численности или вымиранию популяций и филогенетических линий. Оставшиеся выживали в свободных ото льда участках — рефугиумах, крупнейший среди которых находился на территории современных восточной Сибири и Аляски (т.н. Берингия). В ледниковые максимумы толщи льда создавали непреодолимые барьеры для миграции, запуская процессы

аллопатрической дивергенции и видообразования [8, 9, 10, 27, 50]).

Проведенное на североамериканской части ареала исследование молекулярно-генетической изменчивости *L. macrurus* [16] свидетельствует о том, что основная внутривидовая диверсификация происходила в плейстоцене и, скорее всего, связана с климатическими событиями в этот период. Была найдена существенная дивергенция между популяциями внутренних озер от долины реки Св. Лаврентия до побережья моря Бофорта и арктическими популяциями, населяющими многочисленные прибрежные озера на островах Канадского архипелага и севере материка, которые образовались в послеледниковый период в результате изостатических поднятий, отрезавших от моря участки депрессий. Всего же на основании изменчивости митохондриальной (мт)ДНК было выделены три филогенетические линии (группы) *L. macrurus*. Кроме арктической (линия А), включающей в себя также гаплотип единственного проанализированного экземпляра из Европы (Балтийское море) и населяющей внутренние озера линии В, в одном из древнейших озер Канадской Арктики симпатрически с линией А обнаружена эндемичная линия С. Предполагается, что основные филогенетические линии *L. macrurus* имеют морское происхождение и, судя по величине дивергенции 2.2% мтДНК, независимо эволюционируют по меньшей мере на протяжении 0.9–1.6 миллионов лет. Продвижение линии В вглубь материка началось приблизительно 500 тыс. лет назад, чему способствовали покровные оледенения, отеснившие прибрежных *L. macrurus* на юг в пресноводные приледниковые озера [7, 16].

В Евразийском секторе ареала *L. macrurus* исследований генетической изменчивости и филогеографии еще не проводилось, несмотря на доминирующую роль этого вида в прибрежных зоопланктонных сообществах ряда регионов. В морях Российской Арктики *L. macrurus* населяет районы внутреннего шельфа от Карского до Восточно-Сибирского моря, где его распределение связано с областями влияния стока крупных Сибирских рек — Оби, Енисея, Лены, Хатанги и Индигирки; в Баренцевом море и центральных водах Арктического бассейна он отсутствует [1–6, 17, 28]. Учитывая тесную связь *L. macrurus* с водами низкой солености и значительную пространственную разобщенность районов массового развития, можно предпо-

лагать ограниченную возможность миграции и вследствие этого накопление генетических различий между эстуарными популяциями. Актуальность исследований прибрежных популяций *L. macrurus*, в особенности их генетической изменчивости, определяется и тем, что этот холодноводный вид очень требователен к температурным условиям и содержанию кислорода в воде [45] и может рассматриваться как вид-индикатор состояния арктических экосистем на фоне климатических изменений в Арктике. Из-за таяния льдов некоторые места обитания *L. macrurus* могут быть утрачены [52], а происходящее на этом фоне увеличение стока речных вод в Северный Ледовитый океан [39], напротив, может способствовать расширению его ареала на Арктическом шельфе.

Цель настоящей работы — анализ генетической изменчивости и родственных связей *Limnocalanus macrurus* арктического побережья России с помощью секвенирования фрагмента гена 1-й субъединицы цитохром-оксидазы с мтДНК (CO I) в популяциях, населяющих районы вблизи устьев крупных сибирских рек (Обь, Лена, Хатанга, Индигирка и Колыма).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Происхождение выборок, выделение ДНК и секвенирование. Выборки *Limnocalanus macrurus* были отловлены в сентябре 2017 г. в ходе 69-го рейса НИС «Академик Мстислав Келдыш» (Институт океанологии им. П. П. Ширшова РАН) в приустьевых участках пяти сибирских рек: Оби, Лены, Хатанги, Индигирки и Колымы (рис. 1) с помощью планктонного конуса или сети Бонго. Материал фиксировался в 96% этаноле и хранился при 4°C. Тотальную геномную ДНК выделяли из единичных экземпляров с помощью коммерческого набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) согласно протоколу производителя, за исключением того, что лизис при 56°C проводился не менее 12 часов, а финальную элюцию ДНК из колонок проводили вдвое меньшим объемом буфера АЕ (100 мкл). Всего проанализировано 24 экземпляра (табл. 1). Выделенную ДНК (5 мкл) использовали в качестве матрицы для амплификации фрагмента гена CO I мтДНК длиной примерно 650 пар нуклеотидов (п. н.) с помощью праймеров LCO1490 и HCO2198 [19]. После проверки качества продуктов ПЦР в 1.5% агарозном геле их очищали с помощью осаждения

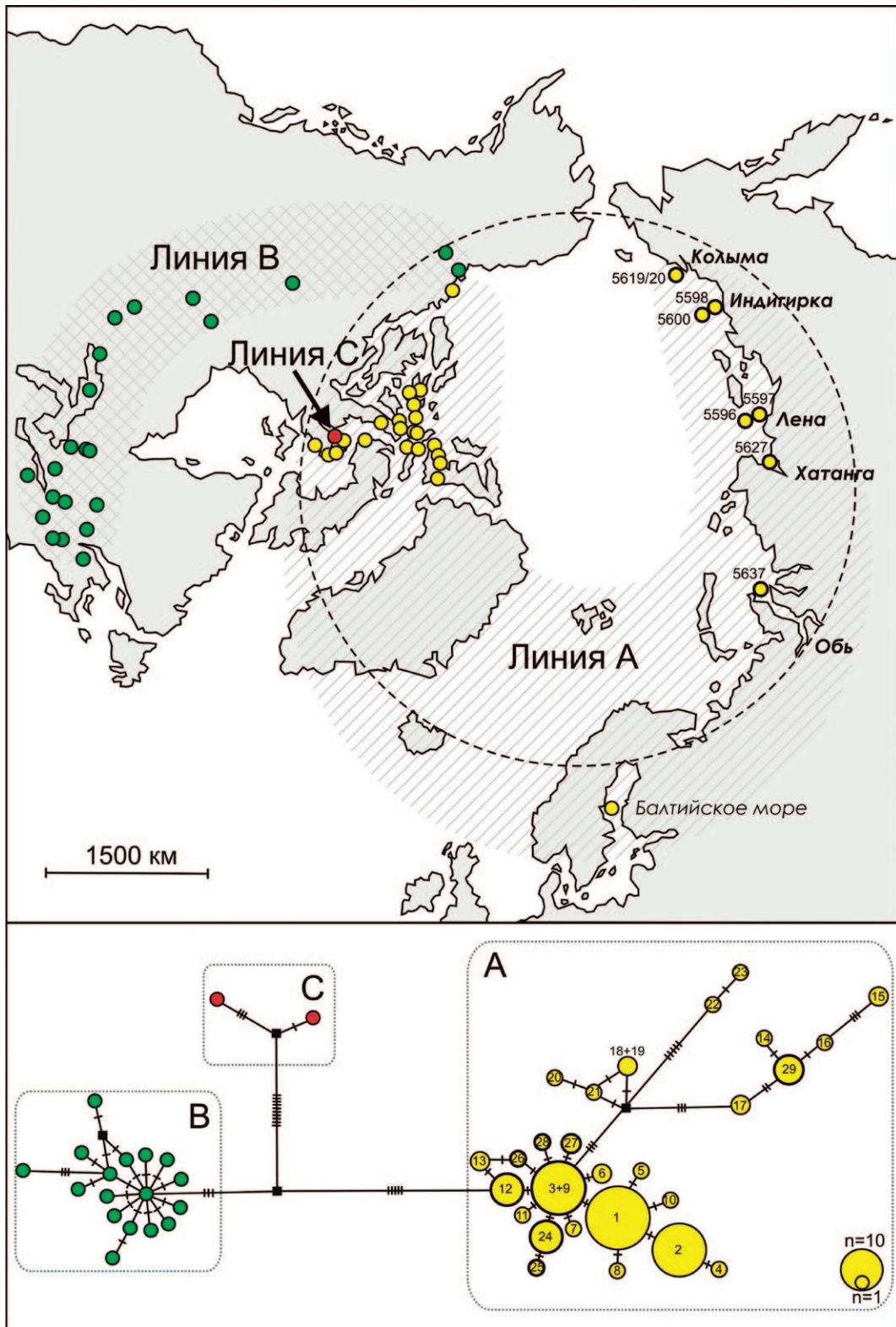


Рис. 1. Положение исследованных выборок *Limnocalanus macrurus* (вверху) и TCS сеть гаплотипов CO I мтДНК (внизу). Принадлежность гаплотипов и содержащих их выборок к одной из трех филогенетических клад отмечена разным цветом (желтые кружки — линия А, зеленые кружки — линия В, красные кружки — линия С) и штриховкой на карте. Выборки из Российской Арктики и найденные в них гаплотипы выделены жирной линией. На нижнем рисунке число мутаций между гаплотипами обозначены черточками на соединяющих их линиях; гипотетические промежуточные гаплотипы обозначены черными квадратами. Для гаплотипов линии А (LA) приведены номера: 1–23 из работы [16], 24–29 новые; размер кружков отражает численность особей, имеющих соответствующий гаплотип.

Таблица 1. Географическое положение выборок *Limnocalanus macrurus*, численность и состав гаплотипов CO I мтДНК

Эстуарий (море)	Станция	Географические координаты	Дата лова	N	Гаплотипы (экз.)
Обь (Карское)	5637	72°30' с.ш., 74°04' в.д.	23.09.2017	3	LA24 (2), LA28
Хатанга (Лаптевых)	5627	73°30' с.ш., 108°11' в.д.	17.09.2017	5	LA24 (2), LA29, LA3 , numt
Лена (Лаптевых)	5596	74°16' с.ш., 130°27' в.д.	14.09.2017	4	LA29 (2), LA27, LA3
	5597	73°42' с.ш., 130°34' в.д.	03.09.2017	1	LA27
Индибирка (Восточно-Сибирское)	5598	71°28' с.ш., 152°54' в.д.	05.09.2017	7	LA24 (2), LA29 (2), LA25, LA3 , LA12
	5600	72°19' с.ш., 154°30' в.д.	05.09.2017	2	LA12 , LA26
Колыма (Восточно-Сибирское)	5619	70°27' с.ш., 165°06' в.д.	09.09.2017	2	LA3 , LA12

Примечание. Жирным шрифтом выделены гаплотипы, обнаруженные ранее в прибрежных озерах Северной Америки [16].

этанолом и секвенировали как с прямого, так и с обратного праймера на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора реактивов BigDye v.1.1. Редактирование полученных хроматограмм, построение консенсусных последовательностей и их выравнивание проводилось в программе Geneious, v. R7 [31]. С целью выявления митохондриальных псевдогенов (т.н. ядерная мтДНК, или numts), вероятность которых высока у ракообразных [12], рассматривались хроматограммы только высокого качества, а нуклеотидная последовательность транслировалась в последовательность аминокислот для обнаружения вставок, делеций и/или наличия стоп-кодонов.

Анализ генетической изменчивости и филогении. Идентификация гаплотипов и поиск соответствия в базе данных GenBank/NCBI проводились с помощью BLAST (www.ncbi.nih.gov/BLAST/). Для совместного анализа были использованы данные Ду с соавторами [16], доступные в GenBank/NCBI под номерами EF609126-EF609129, EF609132, EF609134, EF609135, EF609137, EF609139, EF609140, EF609143, EF609146, EF609151, EF609153, EF609155, EF609156, EF609159, EF609161, EF609164-EF609168, EF609171, EF609175, EF609181-EF609185, EF609192, EF609196, EF609199, EF609209, EF609222, EF609224, EF609228, EF609230-EF609232, EF609234, EF609237. После выравнивания последовательностей с использованием алгоритма ClustalW в программе Genious их общая длина составила 582 п.н., и заимствованные последовательности

вошли в наш анализ в несколько укороченном виде (на 15 п.н.). Из-за этого число описанных Ду с соавторами гаплотипов сократилось на два — оказались идентичными гаплотипы LA3 и LA9, а также LA18 и LA19. Расчет индексов генетической изменчивости — гаплотипического (h) и нуклеотидного (π) разнообразия, среднего числа нуклеотидных различий (k) проводился в программе DNAsp 5.10 [34]. Реконструкция филогенетических связей гаплотипов выполнена с помощью алгоритма статистической парсимонии TCS в программе PopART (<http://popart.otago.ac.nz>). Достоверность различий частот гаплотипов CO I мтДНК оценивали при помощи точного теста дифференциации [42] в программе TFPGA [35].

Анализ исторической демографии. Поиск сигналов прошлых демографических событий в содержащейся внутри линий *Limnocalanus macrurus* нуклеотидной изменчивости мтДНК проводился с помощью двух подходов. Во-первых, тесты на нейтральность на основе распределения частот сайтов (*D*-тест Таджиджи [51] и R_2 тест [40]) и распределения частот гаплотипов (*F_s*-тест Фу [20]) помогают выявить отклонение от нейтрального эволюционного процесса (т.е. равновесия мутация-дрейф), которое будет свидетельствовать об избытке недавно возникших мутаций вследствие изменения размера популяции или отбора. Значимость тестов на нейтральность определяли с помощью 10 000 коалесцентных симуляций в программе DNAsp. Показатель *F_s*-статистики Фу считался значимым при $p < 0.02$ (вместо 0.05). Значительные отрицательные величины *D*- и *F_s*-статистик принимались как

свидетельства внезапного роста популяции (экспансии) в прошлом и/или положительного отбора, тогда как значимо положительные оценки D указывают на недавнее сокращение численности популяции (т.н. бутылочное горлышко), ее фрагментацию и/или балансирующий отбор. Из-за функциональной нейтральности мтДНК статистически значимые тесты, как правило, рассматривают в контексте демографических событий [23].

В дополнение к тестам на нейтральность было проанализировано распределение нуклеотидных различий между всеми парами последовательностей CO I мтДНК, форма которого зависит от особенностей демографической истории. Популяция в равновесии демонстрирует «зубчатое» мультимодальное распределение, тогда как пережитый недавно резкий рост численности будет продуцировать унимодальное распределение, которое смещается в сторону больших значений нуклеотидных различий по мере накопления мутаций [44]. Одна или две моды в распределении будут наблюдаться в популяции, пережившей в недавнем прошлом расширение ареала [41]. В программе Arlequin 3.1 [18] проверялось соответствие наблюдаемого распределения нуклеотидных различий ожидаемому в рамках двух моделей, одна из которых предусматривает однократное увеличение численности в прошлом популяции (модель демографической экспансии). Другая — модель пространственной экспансии — принимает за ноль-гипотезу однократное расширение ареала из одного дема/популяции, сопровождающееся увеличением численности и образованием новых демов/популяций [44]. Для оценки соответствия условиям каждой модели с помощью 10 000 бутстреп-повторов рассчитывали вероятность того, что сумма квадратов отклонений (SSD) окажется ниже в наблюдаемом распределении, чем в смоделированном. Также рассчитывался дополнительный показатель — индекс «зубчатости» r (raggedness index [24]), характеризующий степень сглаженности распределения. Маленькое значение r свидетельствует о недавней экспансии, тогда как большое будет наблюдаться в равновесной или прошедшей через «бутылочное горлышко» популяции. При значении вероятности $rSSD > 0.05$ тестируемая модель не отвергается, а вершина унимодального распределения будет соответствовать величине t , с помощью которой можно рас-

считать время коалесценции (т.е. начало экспансии) исходя из соотношения $t = 2T/\mu$, где T число поколений, прошедших с начала экспансии, а μ — скорость мутации. Эта формула была трансформирована в $t = \tau/2mk$, где m — число мутаций на сайт/поколение, а k — длина анализируемой последовательности [44]. Для расчетов использовались два диапазона оценок скорости мутации: «медленный», соответствующий оценкам 1.4–2.6% в миллион лет, которые были получены для митохондриальной ДНК и гена *cox 1* членистоногих исходя из гипотезы «молекулярных часов» [21, 32, 48], и «быстрый», с оценками 2.3–6.6%, полученными в результате коалесцентного моделирования роста популяций морских беспозвоночных в послеледниковье [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая изменчивость и родственные связи *Limnocalanus macrurus* арктических морей России. В результате секвенирования фрагмента CO I мтДНК получены 24 последовательности длиной 582–628 п.н. После их выравнивания у одного экземпляра из устья р. Хатанги (ст. 5627) обнаружилась делеция из трех нуклеотидов (позиции 297–299), что указывает на то, что полученная последовательность относится к митохондриальным псевдогенам. После исключения этой последовательности у оставшихся 23 были идентифицированы 8 разных гаплотипов, различия между которыми затрагивают от 1 до 9 нуклеотидных сайтов. Из них два гаплотипа были идентичны гаплотипам LA3 и LA12, обнаруженным в озерах Канадского Арктического архипелага [16], а 6 гаплотипов, обозначенные нами как LA24–LA29, оказались уникальными (табл. 1) и их последовательности были помещены в базу данных GenBank/NCBI под номерами MK801797–801802. Три гаплотипа встречались в более половине выборок и, по-видимому, широко распространены в арктических морях — LA24, LA29 и LA3. Частота гаплотипов между объединенными выборками из моря Лаптевых и Восточно-Сибирского моря, представленная в нашем материале наибольшим числом особей (9 и 11 соответственно), не отличались статистически значимо друг от друга (по результатам точного теста на дифференциацию). Выборки из Восточно-Сибирского моря содержат максимальное число га-

плотипов (табл. 1), что, вероятно обусловлено наибольшим числом проанализированных экземпляров. Для уточнения различий в составе гаплотипов и показателях изменчивости между популяциями отдельных эстуариев в будущем потребуется увеличение размера выборок, согласно рекомендациям для популяционных исследований с использованием фрагмента CO I мтДНК [22].

На сконструированной сети всех имеющихся гаплотипов CO I мтДНК *L. macrurus* все обнаруженные в российских морях гаплотипы располагаются внутри арктической группы (линия А), область распространения которой ранее ограничивалась островами Канадского Арктического архипелага и материковым побережьем моря Бофорта в Северной Америке и Балтийским морем в Европе (рис. 1). Общие для канадских и сибирских выборок гаплотипы LA3 и LA12 расположены ближе к центру общей сети гаплотипов (рис. 1), в самом основании клады, и поэтому их можно рассматривать как предковые для остальных гаплотипов арктической линии. Гаплотип LA3 является одним из доминирующих как в сибирской, так в канадской части ареала. Оба найденных у побережья Сибири канадских гаплотипа распространены в самых северных озерах — на о. Аксель-Хейберг, Элмир, Девон и Корнуоллис [16]. Другие, эндемичные для сибирских популяций гаплотипы являются в большинстве близкими производными гаплотипа LA3, отделенные от него в основном всего одной мутацией (гаплотипы LA24–LA28). Гаплотип LA29, присутствующий с высокой частотой в сибирских выборках, помещается среди редких гаплотипов (LA14–LA23) на удаленной от основного пула ветви, включающей в числе канадских единственный гаплотип из Балтийского моря (гаплотип LA18). При этом гаплотип LA29 является промежуточным и, возможно, не был обнаружен ранее из-за малочисленности обследованных выборок, содержащими преимущественно по 1 особи из каждого

обследованного района [16]. Несмотря на различия в абсолютных показателях разнообразия между *L. macrurus* Канады и Сибири (у 74 обследованных канадских экземпляров было обнаружено 22 гаплотипа, в нашем исследовании это соотношение было 23 и 8), рассчитанные индексы изменчивости в сибирских выборках оказались даже несколько выше, чем у канадских представителей арктической линии (гаплотипическое разнообразие Hd: 0.862 ± 0.008 против 0.836 ± 0.003 , нуклеотидное разнообразие π : 0.0063 ± 0.0002 против 0.0058 ± 0.0001 , среднее число нуклеотидных различий между гаплотипами k : 3.64 против 3.37).

Таким образом, в озерах и опресненных участках морского шельфа у побережий Сибири, Канады и Европы обитает генетически единая циркумарктическая линия *Limnocalanus macrurus*. Ее можно также рассматривать как палеарктическую, приняв новые зоогеографические границы, учитывающие внутривидовые филогенетические связи между евразийскими и североамериканскими частями ареала у разнообразных таксонов [30]. Внутри обширного ареала палеарктической линии отсутствует географическая подразделенность: гаплотипы евразийских морских *L. macrurus* не образуют отдельной клады, а идентичны либо близкородственны гаплотипам, обнаруженным в прибрежных озерах Канадской Арктики. При этом канадские и сибирские выборки имеют сходные оценки генетической изменчивости. Все вместе это может указывать на общее происхождение генетического разнообразия современных популяций побережий американского и евразийского континентов, и, следовательно, последний ледниковый максимум их предки переживали в одном рефугиуме. Принимая во внимание то обстоятельство, что палеарктическая линия сохранила большую часть внутривидовой изменчивости по сравнению с неарктическими (табл. 2), хотя и населяет наиболее экстремальные и менее стабильные северные

Таблица 2. Характеристики генетической изменчивости палеарктической (А) и неарктической (В) линий *L. macrurus*

Филогенетическая линия	n	h	Hd	π	D	Fs	R ₂	τ
Палеарктическая (А)	97	27	0.886	0.006	-1.428	-11.366***	0.053	0.572
Неарктическая (В)	37	17	0.860	0.003	-2.086*	-14.381***	0.042***	1.619

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые величины.

n — численность выборок, h — число найденных гаплотипов, π и Hd — нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие, D, Fs, R₂ — тесты на нейтральность (D-тест Тажимы, Fs-тест, R₂-тест), τ — мутационный параметр.

экосистемы, она, скорее всего, занимала один из двух крупнейших рефугиумов (Берингия или Атлантический). В пользу Берингии свидетельствует нахождение общих с канадскими *L. macrurus* гаплотипов по сибирскому побережью ближе к Берингову проливу. Две эндемичные неарктические линии, скорее всего, пережили оледенение в рефугиумах на территории Северной Америки: линия В в основном для неарктических гидробионтов в Миссисипском рефугиуме [8, 16, 37], а линия С — в маленьком северном рефугиуме, существовавшем на о-вах Канадского архипелага [27].

Демографическая история *Limnocalanus macrurus*. Поскольку гаплотипы канадских и сибирских *L. macrurus* оказались тождественны или эволюционно близки друг другу, ретроспективный анализ демографической динамики проводился для всей палеарктической филогенетической линии. Из трех тестов на нейтральность только тест Фу (F_s) показал значимое отклонение. При этом в анализируемой для сравнения неарктической линии В нейтральность была отклонена во всех трех тестах (табл. 2). Учитывая отрицательные значения F_s и D и то, что тест Фу считается наиболее чувствительным для выявления недавней экспансии популяции [20], можно предполагать, что в недавнем прошлом обе линии испытали увеличение численности. Рассчитанные оценки индекса «зубчатости» g для обеих линий оказались невысоки и ста-

тистически незначимы (0.041 и 0.110 соответственно для линий А и В). Результаты анализа распределения парных различий между последовательностями CO I мтДНК в линии А показали наилучшее соответствие модели пространственной экспансии ($SSD = 0.017$, $p = 0.231$), тогда как модель демографической экспансии была отвергнута ($SSD = 0.023$, $p = 0.0003$). Наличие дополнительных пиков в распределении парных различий у линии А (рис. 2) может свидетельствовать о прохождении через «горлышко бутылки», предшествующее экспансии [41]. При этом у линии В наблюдается четкое уни-модальное распределение (рис. 2), что вместе с результатами тестов на нейтральность и звездчатой структурой пула гаплотипов (рис. 1) свидетельствует о наличии в ее истории однократной вспышки численности (демографической экспансии [44]).

Исходя из рассчитанной в рамках модели величины τ (табл. 2), двух диапазонов скорости мутации митохондриального гена CO I и длины поколения *L. macrurus* 1 год [46], распространение палеарктической линии по ареалу началось 35 000–19 000 лет назад («медленная» эволюция) или 21 000–7 500 тыс. лет («быстрая» эволюция). Второй диапазон оценок более соответствует хронологии событий, поскольку пик последнего оледенения, после которого началось расселение многих видов в высоких широтах, приходится на период 18 000–20 000 тыс. лет назад, а все нынешние места обитания *L. macrurus* к тому времени либо еще не сформировались, либо были недоступны из-за пониженного на протяжении последних 120 тыс. лет уровня моря [15]. С таянием льдов началась морская трансгрессия, которая вместе со снижением солености Арктического океана позволила прибрежным *L. macrurus* довольно быстро колонизовать доступные места обитания в Голарктике. Впоследствии в результате ледово-тектонических процессов и восстановления уровня солености морской воды озерные и эстуарные популяции *L. macrurus* оказались изолированы в своих нынешних местах обитания. Неарктическая линия В из внутренних озер, согласно полученным оценкам, испытала резкое увеличение численности несколько ранее линии А — до ледникового максимума, в период от 60 500 до 21 000 лет назад. Указанные для обеих линий временные диапазоны увеличения численности совпадают с большинством оценок экспансий популяций различных мор-

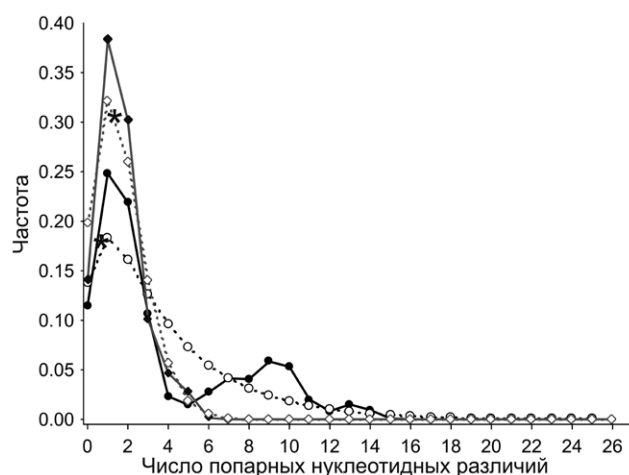


Рис. 2. Распределение нуклеотидных различий между последовательностями *cox 1* мтДНК (наблюдаемые величины: черные кружки (линия А), черные ромбы (линия В), сплошная линия; ожидаемые величины: белые кружки (линия А), белые ромбы (линия В), пунктирная линия). Звездочкой отмечены соответствующие величины показателя времени коалесценции (τ).

ских беспозвоночных, что подтверждает связь популяционно-демографических и палеоклиматических событий [23].

Итак, с помощью исследования изменчивости CO I мтДНК удалось показать, что *Limnocalanus macrurus* из эстуариев сибирских рек вместе с популяциями из прибрежных озер Канадской Арктики и из Балтийского моря принадлежат к единой циркумарктической (палеарктической) филогенетической линии. Скорее всего, представители этой линии переживали последний ледниковый максимум в одном рефугиуме (вероятно, Берингийском) и быстро расселились внутри обширного ареала примерно 21 000–7500 тыс. лет назад. Отсутствие пространственной генетической подразделенности внутри линии А можно было бы объяснить недавней изоляцией популяций, недостаточной для накопления различий между ними. Однако у облигатно-эстуарных копепод рода *Acartia*, тоже населяющих недавно освободившиеся от оледенения (примерно 10 000–18 000 лет назад) эстуарии северо-западного побережья Атлантики, были продемонстрированы существенные межпопуляционные различия по маркерам мтДНК [14, 38]. У изолированных в прибрежных озерах канадских популяций *L. macrurus*, возрастом не старше сибирских, с помощью аллозимных биохимических маркеров также была показана существенная генетическая дифференциация [16]. Возможно, что границы между эстуарными популяциями Российской Арктики установились гораздо позднее или же между ними происходит генетический обмен, например, из-за увеличения площади распресненных вод в прибрежье, переноса с птицами или другими путями, обычными для пресноводных зоопланктеров [25]. Также нужно учитывать ограничения в разрешающей способности используемого молекулярного маркера. Поскольку внутривидовая дивергенция у *L. macrurus* произошла, очевидно, позже других арктических копепод и кладоцер [16], скорости мутации CO I мтДНК оказываются достаточны только для прослеживания эволюционной судьбы сравнительно молодых филогенетических линий. Для того чтобы окончательно решить вопрос о генетической структуре и популяционных демографических процессах у евразийских *L. macrurus*, потребуются привлечение более полиморфных молекулярных маркеров со скоростью накопления мутаций, совпадаю-

щей с временным масштабом событий в недавно образовавшихся локальных популяциях.

Источник финансирования. Экспедиционные работы и первичная обработка материала при поддержке проекта РФФИ № 18-05-60069 и темы государственного задания № 0149-2019-0008, лабораторный анализ выполнен в рамках темы государственного задания № 0112-2019-0001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арашкевич Е. Г., Флинт М. В., Никишина А. Б. и др. Роль зоопланктона в трансформации органического вещества в обском эстуарии, шельфовых и глубоководных районах Карского моря // *Океанология*. 2010. Т. 50. № 5. С. 823–836.
2. Арашкевич Е. Г., Дриц А. В., Пастернак А. Ф. и др. Распределение и питания растительного зоопланктона в море Лаптевых // *Океанология*. 2018. Т. 58. № 3. С. 419.
3. Виноградов М. Е., Шушкина Э. А., Лебедева Л. П. и др. Мезопланктон восточной части Карского моря и эстуариев Оби и Енисея // *Океанология*. 1994. Т. 34. № 5. С. 716–723.
4. Дриц А. В., Никишина А. Б., Семенова Т. Н. и др. Особенности распределения и питания массовых видов зоопланктона в эстуарии реки Обь // *Океанология*. 2016. Т. 56, № 3. С. 414–428.
5. Флинт М. В., Семенова Т. Н., Арашкевич Е. Г. и др. Структура планктонного сообщества в области эстуарного фронта Оби // *Океанология*. 2010. Т. 50. № 5. С. 809–822.
6. Численко Л. Л. Видовой состав и распределение экологических комплексов зоопланктона в Енисейском заливе // *Исследования фауны морей* 1972. Т. 12. С. 228–238.
7. Adamowicz S. J., Menu-Marcue S., Halse S. A. et al. The evolutionary diversification of the Centropagidae (Crustacea, Calanoida): A history of habitat shifts // *Mol. Phylog. Evol.* 2010. V. 55. P. 418–430.
8. April J., Hanner R. H., Dion-Coté A.-M., Bernatchez L. Glacial cycles as an allopatric speciation pump in north-eastern American freshwater fishes // *Mol. Ecol.* 2013. V. 22. P. 409–422.
9. Avise J. C., Walker D., Johns G. C. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography // *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1998. V. 265. P. 1707–1712. doi: 10.1098/rspb.0492.
10. Bernatchez L., Wilson C. C. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. P. 431–452.
11. Bowman T. E., Long A. Relict populations of *Drepanopus bungei* and *Limnocalanus macrurus grimaldii* (Copepoda: Calanoida) from Ellesmere Island, N. W.T. // *Arctic*. 1973. V. 21. P. 173–180.
12. Buhay J. E. “COI-like” sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies // *J. Crustacean Biol.* 2009. V. 29. P. 96–110. doi: 10.1651/08-3020.1

13. Crandall E. D., Sbrocco E. J., DeBoer T. S. et al. Expansion dating: calibrating molecular clocks in marine species from expansions onto the Sunda Shelf following the Last Glacial Maximum // *Mol. Biol. Evol.* 2012. V. 29 (2). P. 707-719.
14. Caudill C. C., Bucklin A. 2004. Molecular phylogeography and evolutionary history of the estuarine copepod, *Acartia tonsa*, on the northwest Atlantic coast // *Hydrobiologia*. V. 511. P. 91-102.
15. Chappell J., Omura A., Esat T. et al. Reconciliation of late Quaternary sea levels derived from coral terraces at Huon Peninsula with deep sea oxygen isotope records // *Earth Planet Sc Lett.* 1996. V. 141. P. 227-236.
16. Dooh R. T., Adamowicz S. J., Hebert P. D. N. Comparative phylogeography of two North American 'glacial relict' crustaceans // *Mol. Ecol.* 2006. V. 15. P. 4459-4475.
17. Drits A. V., Pasternak A. F., Nikishina A. B. et al. The dominant copepods *Senecella siberica* and *Limnocalanus macrurus* in the Ob estuary: ecology in a high-gradient environment // *Polar Biology*. 2016b. V. 39. P. 1527-1538.
18. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinform. Online*. 2005. V. 1. P. 47-50.
19. Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 1994. V. 3 (5). P. 294-299.
20. Fu Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // *Genetics*. 1997. V. 147. P. 915-925.
21. 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. V. 19. P. 748-761.
22. Goodall-Copestake W. P., Tarling G. A., Murphy E. J. On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals // *Heredity*. 2012. V. 109. P. 50-56. doi:10.1038/hdy.2012.12
23. Grant W. S. Problems and cautions with sequence mismatch analysis and bayesian skyline plots to infer historical demography // *J. Heredity*. 2015. V. 106 (4). P. 333-346. doi:10.1093/jhered/esh020
24. Harpending H. C. Signature of ancient population growth in a lowresolution mitochondrial DNA mismatch distribution // *Hum. Biol.* 1994. V. 66. P. 591-600.
25. Havel J. E., Shurin J. B. Mechanisms, effects, and scales of dispersal in freshwater zooplankton // *Limnol. Oceanogr.* 2004. V. 49 (4). P. 1229-1238.
26. Hebert P. D. N., Hann B. J. Patterns in the composition of arctic tundra pond microcrustacean communities // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1986. V. 43 (7). P. 1416-1425. doi: 10.1139/f86-175
27. Hewitt G. M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2004. B. V. 359. P. 183-195.
28. Hirche H.-J., Fetzer I., Graeve M., Kattner G. *Limnocalanus macrurus* in the Kara Sea (Arctic Ocean): an opportunistic copepod as evident from distribution and lipid patterns // *Polar Biol.* 2003. V. 26. P. 720-726. doi: 10.1007/s00330-003-0541-9
29. Holmquist C. The Genus *Limnocalanus* (Crustacea, Copepoda) // *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* 1970. V. 8. P. 73-296.
30. Holt B. G., Lessard J.-P., Borregaard M. K. et al. An Update of Wallace's Zoogeographic Regions of the World // *Science*. 2013. V. 339. P. 74-78. doi: 10.1126/science.1228282
31. Kearse M., Moir R., Wilson A. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // *Bioinformatics*. 2012. V. 28 (12). P. 1647-1649.
32. Knowlton N., Weigt L. A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama // *Proc. R. Soc. Lond B*. 1998. V. 265. P. 2257-2263.
33. Lambeck K., Esat T. M., Potter E. K. Links between climate and sea levels for the past three million years // *Nature*. 2002. V. 419. P. 199-206.
34. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 1451-1452.
35. Miller M. P. TFPGA Version 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Depart. of Biological Sci. Northern Arizona University. 1997. P. 30. <http://www.marksgeneticssoftware.net/>
36. Miller K. G., Kominz M. A., Browning J. V. et al. The Phanerozoic record of global sea-level change // *Science*. 2005. V. 310. P. 1293-1298.
37. Millette K. L., Xu S., Witt J. D. S., Cristescu M. E. Pleistocene-driven diversification in freshwater zooplankton: Genetic patterns of refugial isolation and postglacial recolonization in *Leptodora kindtii* (Crustacea, Cladocera) // *Limnol. Oceanogr.* 2011. V. 56 (5). P. 1725-1736. doi:10.4319/lo.2011.56.5.1725
38. Milligan P. J., Stahl E. A., Schizas N. V., Turner J. T. Phylogeography of the copepod *Acartia hudsonica* in estuaries of the northeastern United States // *Hydrobiologia*. 2011. V. 666 (1). P. 155-165. doi:10.1007/s10750-010-0097-y
39. Peterson B. J., Holmes R. M., McClelland J. W. et al. Increasing river discharge to the Arctic Ocean // *Science*. 2002. V. 298. P. 2171-2173.
40. Ramos-Onsins S. E., Rozas J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth // *Mol. Biol. Evol.* 2002. V. 19. P. 2092-2100.
41. Ray N., Currat M., Excoffier L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20. P. 76-86.
42. Raymond M. L., Rousset F. An exact test for population differentiation // *Evolution*. 1995. V. 49. P. 1280-1283.
43. Ricker K. E. The origin of two glacial relict crustaceans in North America, as related to Pleistocene glaciations // *Can. J. Zool.* 1959. V. 37. P. 871-893.
44. Rogers A. R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // *Mol. Biol. Evol.* 1992. V. 9. P. 552-569.
45. Roff J. C. Aspects of the reproductive biology of the planktonic copepod *Limnocalanus macrurus* Sars // *Crustaceana* (Leiden). 1972. V. 22. P. 155-160.
46. Rolf J. C., Carter J. H. C. Life cycle and seasonal abundance of the copepod *Limnocalanus macrurus* Sars in a high arctic lake // *Limnol. Oceanogr.* 1972. V. 17. P. 363-370.

47. Samchyshyna L., Hansson L. A., Christoffersen K. S. Patterns in the distribution of Arctic freshwater zooplankton related to glaciation history // *Polar Biol.* 2008. V. 31. P. 1427-1435. doi: 10.1007/s00300-008-0482-4
48. Schubart C. D., Diesel R., Hedges S. B. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs // *Nature.* 1998. V. 393. P. 363-365. doi:10.1038/30724
49. Spikkeland I., Kinsten B., Kjellberg G. et al. The aquatic glacial relict fauna of Norway — an update of distribution and conservation status // *Fauna Norvegica.* 2016. V. 36. P. 51. doi: 10.5324/fn.v36i0.1994
50. Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G., Cossons J.-F. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. P. 453-464.
51. Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics.* 1989. V. 123. P. 585-595.
52. Van Hove P., Swadling K. M., Gibson J. A. E. et al. Farthest north lake and fjord populations of calanoid copepods *Limnocalanus macrurus* and *Drepanopus bungei* in the Canadian high Arctic // *Polar Biol.* 2001. V. 24. P. 303-307.

GENETIC DIVERSITY OF COPEPOD, *LIMNOCALANUS MACRURUS*, FROM RUSSIAN ARCTIC SEAS

© 2019 N. V. Gordeeva^{1, 2*}, A. V. Drits², M. V. Flint²

¹ Vavilov Institute of General Genetic Russian Academy of Science, Moscow, Russia

² Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia

*e-mail: ribka04@mail.ru

Received May 28, 2019

Revised version received June 11, 2019

After revision June 18, 2019

The diversity, phylogenetic relationship and demographic history in glacial relict copepod, *Limnocalanus macrurus* from estuaries of large Siberian Arctic rivers — Ob', Khatanga, Lena, Indigirka and Kolyma were studied using of mitochondrial cytochrome-oxidase *c* gene (CO I mtDNA). It was shown, that Siberian populations of *Limnocalanus macrurus* together with ones from Canadian Arctic and the Baltic Sea belong to the single Palearctic phylogenetic lineage, which probably survived in one refugium during the Last Glacial Maximum and then rapidly expand within the Arctic about 21 000–7500 years ago. The presence of common haplotypes in *L. macrurus* from three Arctic seas and lack of differences in haplotypic frequencies may be caused recent origin of populations or present day genetic exchange between them.

Keywords: relict copepod *Limnocalanus macrurus*, mitochondrial cytochrome-oxidase *c* gene, phylogenetic relationship and demographic history, estuaries of large Siberian Arctic rivers