

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

ИНДЕКС УДК 575.16

Рег. № ГЗ 0088-2021-0019

Рег. № НИОКТР АААА-А21-121011490127-1

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«28» декабря 2021 г.



ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
ВИДООБРАЗОВАНИЯ И РАННИХ ЭТАПОВ ЭВОЛЮЦИИ. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ
ДЛЯ ОЦЕНКИ ГОМЕОСТАЗА РАЗВИТИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ
(МЕТОДОЛОГИЯ ПОПУЛЯЦИОННОЙ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ)
(промежуточный)

Руководитель НИР,
Заместитель директора по научной
работе,
доктор биологических наук

подпись, дата

А.М. Куликов

28.12.2021

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, заместитель директора по научной работе, доктор биологических наук


подпись, дата

А.М. Куликов (Введение, раздел 4)

Руководитель, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, заведующий лабораторией


подпись, дата

В.М. Захаров (раздел 8)

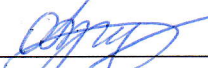
Исполнители:

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата 28.12.21

А.С. Богданов (раздел 1)

Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата

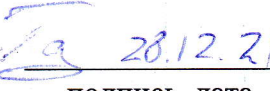
О.В. Брандлер (раздел 5)

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата

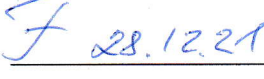
Н.С. Мюге (раздел 2,4)

Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук


подпись, дата 28.12.21

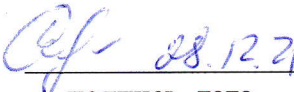
Я.Р. Галимов (раздел 3)

Главный научный сотрудник, доктор биологических наук


подпись, дата 28.12.21

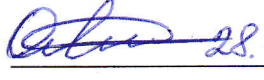
И.Ю. Баклушинская (раздел 1,2)

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата 28.12.21

С.Ю. Сорокина (раздел 4)

Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата 28.12.21

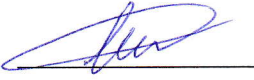
О.Е. Лазебный (раздел 5)

Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук


подпись, дата 28.12.21

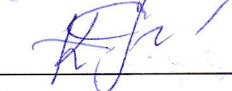
М.В. Мина (раздел 6)

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата 28.12.22

Ф.Н. Шкиль (раздел 6)

Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата 28.12.22

Т.А. Коршунова (раздел 2)

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук



Д.Д. Воронцов (раздел 5)

28.12.2021

подпись, дата

Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук

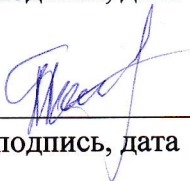


С.С. Алексеев (раздел 6)

подпись, дата

28.12.2021

Научный сотрудник,
кандидат биологических наук



И.Е. Трофимов (раздел 7)

подпись, дата

28.12.2021

Нормоконтроль, руководитель
информационно-аналитического отдела,
кандидат биологических наук



Е.Б. Абрамова

28.12.2021

подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 151 с., 57 рисунков, 11 табл., 213 источников, 33 отчетные публикации.

ГЕНОМ, МЕЖВИДОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ, ЗОНЫ ВТОРИЧНОГО КОНТАКТА, МЕЙОТИЧЕСКИЙ ДРАЙВ, ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ, В-ХРОМОСОМЫ, БИОРАЗНООБРАЗИЕ, ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПОЛА, ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕКОНСТРУКЦИИ, КОММУНИКАТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ, АГРЕССИВНОСТЬ, СИМПАТРИЧЕСКИЕ ЭКОТИПЫ, ГОМЕОСТАЗ РАЗВИТИЯ, АССИММЕТРИЯ, ПРИРОДНЫЕ СООБЩЕСТВА, ЗДОРОВЬЕ СРЕДЫ

Цель – оценка биоразнообразия природных сообществ, анализ закономерностей эволюционной дивергенции видов, генетических основ адаптаций, пре- и постзиготических изолирующих механизмов; изучение эволюционной роли и механизмов хромосомных перестроек, ранних стадий эволюционной дивергенции видов, механизмов детерминации пола и эволюции половых хромосом у разных видов животных.

В работах на дрозофиле, посвященных анализу коммуникативного поведения, были показаны эволюционная изменчивость роли акустического канала в формировании видоспецифического паттерна брачного поведения и презиготических изолирующих барьеров у видов дрозофил группы *virilis* и половой диморфизм зависимости брачного поведения от экспрессии гена *quick-to-court* у *D. melanogaster*. Также получено экспериментальное подтверждение несостоятельности доказательств обучаемости дрозофил при экспонировании «наивным» самкам конкурентных отношений между самцами за самку.

Популяционные и экспериментальные исследования молодых видов и вновь образующихся видовых сообществ посвящены вопросам анализа скорости и механизмам накопления молекулярной изменчивости, формирования адаптаций, роли гормональных регуляций и внешних факторов в формировании видоспецифических признаков, влияния сохраняющейся гибридизации в зонах вторичных контактов между родственными видами на внутри- и межвидовую генетическую изменчивость. По данным анализа молекулярных маркеров проводятся таксономические ревизии и описания новых видов морских беспозвоночных. Анализ изменчивости морфологических признаков у ископаемых клещей отряда *Astigmata* (янтарных окаменелостей) и сопоставлении их с изменчивостью аналогичных признаков у современных видов показал постепенную эволюцию связанных с форезией метаморфозов. Дальнейшее развитие получили методы оценки «здоровья среды».

СОДЕРЖАНИЕ

Москва, 2021 СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ	1
РЕФЕРАТ.....	4
СОДЕРЖАНИЕ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	8
РАЗДЕЛ 1. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ. ЗОНЫ КОНТАКТА	9
Введение	9
Методы.....	9
Результаты и обсуждение	9
Подраздел 1.1 Гибридизация и сохранение межвидовых барьеров у сурков <i>Marmota baibacina</i> и <i>M. sibirica</i> в зоне вторичного контакта.....	9
Заключение.....	17
Список использованных источников.....	17
РАЗДЕЛ 2. ФИЛОГЕОГРАФИЯ, ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ РЕВИЗИИ МОДЕЛЬНЫХ ГРУПП ЖИВОТНЫХ	20
Введение	20
Методы.....	20
Результаты и обсуждение	20
Подраздел 2.1 Изменчивость контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография большого суслика	20
Подраздел 2.2 Межвидовая дифференциация и филогенетические связи трёх видов кустарниковых полёвок подрода <i>Terricola</i>	25
Подраздел 2.3 Анализ генетического разнообразия белуги <i>Huso huso</i>	32
Подраздел 2.4 Адаптивная радиация пресноводных рыб рода <i>Garra</i> , Эфиопское нагорье	33
Подраздел 2.5 Полные митохондриальные геномы представителей двух эндемичных семейств рыб (Perciformes: Cottoidei) озера Байкал.....	36
Подраздел 2.6 Использование метабаркодирования для анализа структуры сообществ подземных членистоногих в условиях доминирования инвазивных видов растений.....	37
Подраздел 2.7 Новый вид голожаберных моллюсков <i>Eubbranchus malakhovi</i> sp.n.	39
Подраздел 2.8 Изучение фауны насекомых после лесных пожаров с помощью кроновых ловушек в лесах европейской России	40
Подраздел 2.9 Таксономическая ревизия рода <i>Cuthonella</i> голожаберных моллюсков с описанием семи новых видов	41
Заключение.....	43
Список использованных источников.....	44
РАЗДЕЛ 3 ИЗУЧЕНИЕ ЭВОЛЮЦИИ СИСТЕМ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА В РАЗЛИЧНЫХ ГРУППАХ ЖИВОТНЫХ	48

Введение	48
Методы.....	48
Результаты и обсуждение	49
Подраздел 3.1 Формирование нео-Y у млекопитающих с изоморфными XX половыми хромосомами	49
Подраздел 3.2 Киназа CDK2 в профазе I мейоза млекопитающих: скрининг гетеро- и гомоморфных половых хромосом	50
Подраздел 3.3 Добавочные В-хромосомы и их гомология с фрагментами половых хромосом у желтогорлых мышей.....	52
Подраздел 3.4 Эффект соотношения полов на репродуктивный успех самок и самцов <i>Daphnia</i> при половом размножении.....	56
Заключение.....	57
Список использованных источников.....	58
РАЗДЕЛ 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОММУНИКАЦИОННОГО ПОВЕДЕНИЯ.....	60
Введение	60
Методы.....	61
Результаты и обсуждение	61
Подраздел 4.1 Социальное обучение у <i>Drosophila melanogaster</i>	61
Подраздел 4.2 Роль акустических сигналов в брачном поведении <i>Drosophila virilis</i> , <i>D. lummei</i> и <i>D. littoralis</i>	64
Подраздел 4.3 Влияние гена <i>quick-to-court</i> на брачное поведение <i>Drosophila melanogaster</i>	66
Заключение.....	68
Список использованных источников.....	69
РАЗДЕЛ 5. ИЗОЛИРУЮЩИЕ МЕХАНИЗМЫ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИ ВИДООБРАЗОВАНИИ.....	73
Введение	73
Методы.....	75
Результаты	77
Подраздел 5.1. Ненейтральная изменчивость цитохрома b у балобана и кречета	77
Подраздел 5.2. Эпизоды полной замены области промотора и межгенного спейсера у консервативного гена <i>ras85D</i> и быстрое восстановление его функциональной активности в ходе эволюционной дивергенции видов дрозофил.....	80
Подраздел 5.3. Анализ морфологических признаков и определение таксономического положения ископаемых образцов.....	105
Заключение.....	109
Список использованных источников.....	109
РАЗДЕЛ 6. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ, ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ РЫБ.....	115

Введение	115
Материалы и методы	116
Результаты и обсуждение	117
Заключение.....	132
Список использованных источников	132
РАЗДЕЛ 7. ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ РАЗВИТИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ И ЗДОРОВЬЯ СРЕДЫ ПО БЛАГОПРИЯТНОСТИ ДЛЯ ЖИВЫХ СУЩЕСТВ. РАЗРАБОТКА ОСНОВ СОВРЕМЕННОГО МОНИТОРИНГА СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ	
Введение	136
Материал и методы.....	136
Результаты	137
Заключение.....	141
Список использованных источников	142
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	146
ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ	147

ВВЕДЕНИЕ

Задачи, решаемые в рамках изучения молекулярно-генетических и экологических механизмов видообразования и ранних этапов эволюции, чрезвычайно разнообразны как с позиции методологических подходов, так и по выбору объектов исследования. Таксономические ревизии и уточнения позволяют нам увидеть общую картину эволюции органического мира, определить происхождение и направленность (или ненаправленность) эволюционных изменений в пределах отдельных таксономических групп. Для уточнения времени возникновения таксонов разного уровня и скорости и равномерности формирования эволюционных инноваций проводится совмещение филогенетических реконструкций, полученных на основе доступных молекулярных данных и морфометрических оценок признаков современных видов и родственным им ископаемым видам. Работы выполнялись на широком наборе видов позвоночных (млекопитающих и рыб), морских беспозвоночных и наземных членистоногих, включая анализ ископаемых образцов клещей из янтарей (возраст от 20 до 140 млн. лет).

Дальнейшая детализация механизмов эволюции, анализ генетических основ разнообразных адаптаций и изолирующих барьеров требуют проведения популяционных и экспериментальных исследований. В этих работах получают оценки генетического и гаплотипического разнообразия, потока генов в пределах вида или нескольких близкородственных видов через зоны гибридизации, проводят формализацию и анализ сложного комплекса признаков, участвующих в формировании пре-и постзиготических изолирующих барьеров. Все более интригующими становятся данные о роли хромосомных перестроек в дивергенции видов, изменении фенотипа и ускоренном формировании изолирующих барьеров. Экспериментальные работы проводились на лабораторных линиях *D. melanogaster* и близнецовых видах группы *virilis*, в экспериментальных популяциях дафнии *Daphnia magna*, на различных хромосомных формах слепушонки *Ellobius tancrei*. Популяционные исследования проведены на видах наземных беличьих, грызунов, хищных птиц группы видов *Hierofalco*.

Задачи изучения механизмов реализации эволюционно-значимой изменчивости, включая специфические адаптации и признаки фенотипа, решались в популяционных исследованиях и лабораторных экспериментах по оценке гормональных и температурных регуляций фенотипических и онтогенетических траекторий видов лососевых рыб.

Методы оценки «здоровья среды» были применены при анализе последствий глобальных изменений климата.

РАЗДЕЛ 1. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ. ЗОНЫ КОНТАКТА

Введение

Проблема границ вида, становление видовых барьеров остается центральной в эволюционной биологии. Использование комплекса различных методов молекулярно-генетического анализа, цитогенетики, биоакустики позволяет более углубленно изучать как экспериментальные модели, так и, что особенно важно, природные. Ряд групп грызунов, в частности, наземные беличьи, длительный период времени являются модельными для изучения событий гибридизации в природе. Для трех видов сурков в Евразии известны две зоны гибридизации. Несмотря на почти 40-летнюю историю изучения этих зон, применение современных подходов позволило более точно проследить уровень интрогрессии и особенности действия естественного отбора в отношении гибридов *Marmota baibacina* и *M. sibirica* в зоне вторичного контакта.

Методы

Использованы различные методики для выделения ДНК из проб «Объединенной коллекции тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований ИБР РАН». Использованы современные молекулярно-генетические методы, в том числе секвенирование фрагментов ядерной и митохондриальной ДНК, типирование ядерных маркеров с помощью рестрикционного анализа продуктов ПЦР. Для обработки полученных данных применены различные пакеты программ: LaserGene, Mega X, MrBayes и др. Также для уточнения пространственного распределения особей был использован биоакустический метод. Локализация исследованных особей анализировалась с помощью космических снимков, предоставляемых в свободном доступе компанией Google (USA), и оцифрованных топографических карт, на которые в программах OziExplorer v3.95 (D&L Software Pty Ltd) и MapInfo 9.5 (Pitney Bowes Software Inc., USA) наносились точки нахождения животных с определенными генотипами, а также вокализирующих животных.

Результаты и обсуждение

Подраздел 1.1 Гибридизация и сохранение межвидовых барьеров у сурков *Marmota baibacina* и *M. sibirica* в зоне вторичного контакта

Сурки (*Marmota* Blumenbach, 1779) – крупные грызуны, распространенные в Северной Америке и Евразии, обитатели открытых пространств горных и равнинных ландшафтов. Гибридизация обнаружена только у Палеарктических видов сурков, что может быть связано с их преимущественно аллопатрическим видообразованием. Во всех известных случаях скрещивание видов происходит с участием серого сурка (*Marmota*

baibacina Kastschenko, 1899) в зонах вторичных контактов со степным сурком (*M. bobak* Müller, 1776), красным сурком (*M. caudata* Geoffroy, 1844) и тарбаганом (*M. sibirica* Radde, 1862) [1-3]. До настоящего времени ни одна из гибридных зон сурков не была исследована всесторонне, в том числе с применением генетических подходов. Нами впервые изучена зона вторичного контакта *Marmota baibacina* и *M. sibirica* в Монголии [4, 5].

Смешанное поселение *M. baibacina* и *M. sibirica* в долине реки Улагчин-Гол на Монгольском Алтае (47°27' N 90°53' E) расположено в ограниченных пределах небольшой горной долины и относительно изолировано от ближайших поселений сурков. Оно представляет собой удобную модель для изучения разнообразных факторов, влияющих на гибридизационный процесс в природной популяции. Мы поставили задачу изучить генетическую изменчивость этой популяции для оценки реального соотношения родительских видов и гибридов, их пространственного и биотопического распределения, определить соответствие фенотипов генотипам у диагностированных особей.

Биоакустический анализ позволил выяснить распределение сурков разных видов в долине и выявил участок с преобладанием крупнокаменистых россыпей, на котором смешанно обитают особи со звуковыми сигналами разных видов.

Были исследованы пробы тканей 58 сурков из зоны симпатрии *M. sibirica* и *M. baibacina* в долине реки Улагчин-Гол (таблица 1). Для генетической диагностики всех экземпляров использовался комплексный анализ маркерных фрагментов яДНК: *i5HoxB* – 5 интрон гена *HoxB* (homeobox containing gene); *i13BCR* – 13 интрон гена *BCR* (break-point cluster region); *i8SmcY* – фрагмент 8 интрона специфичного для особей мужского пола антигена (male specific histocompatibility antigen), а также фрагмент мтДНК – ген *cytb* (cytochrome *b*). Для определения видоспецифичности каждого маркера в качестве эталонов использовались нуклеотидные последовательности, полученные методом секвенирования от особей, отловленных в "чистых", т. е. расположенных вне зоны симпатрии, популяциях серого сурка и тарбагана. Дополнительно были использованы *cytb* последовательности из GeneBank (*M. sibirica* AF143937, AF143938 и *M. baibacina* AF143915). У трех маркеров (*i5HoxB*, *i13BCR*, *cytb*) были обнаружены видоспецифичные замены, которые формируют специфические сайты узнавания для определенных эндонуклеаз. Это позволило провести генетическое типирование выборки из смешанной популяции по данным маркерам с помощью рестрикционного анализа продуктов ПЦР. Видовая специфичность *i8SmcY* определялась путем анализа нуклеотидных последовательностей для всех самцов.

Для выявления характера внутривидовой генетической изменчивости обоих видов были исследованы нуклеотидные последовательности контрольного региона (CR) мтДНК

у 51 особи из смешанной популяции (таблицы 1, 3) особей каждого из контактирующих видов из "чистых" популяций.

Таблица 1 - Характеристики и результаты генотипирования сурков из смешанной популяции *M. baibacina* и *M. sibirica* в долине реки Улагчин-Гол.

Коллекционный №	Полевое определение вида	Пол	Возраст ¹	Высота м н.у.м.	Генетические маркеры ²					Диагноз
					i5H αB	i13B CR	i8S	cytb	CR	
24825	<i>M. sibirica</i>	F	juv	2897	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
24826	<i>M. sibirica</i>	M	juv	2744	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>
24827*	<i>M. baibacina</i>	M	ad	3018	sb	sb	b	s	s5	hybrid (F1)
24828	<i>M. sibirica</i>	M	ad	2818	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>
24829*	<i>M. baibacina</i>	F	ad	3057	ss	sb	-	s	s5	hybrid
24830	<i>M. sibirica</i>	M	ad	2888	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>
24831*	<i>M. baibacina</i> [55]3	M	ad	2956	sb	bb	b	b	-	hybrid
24832*	<i>M. baibacina</i> [55]	M	ad	2956	bb	bb	b	b	-	<i>M. baibacina</i>
24834	<i>M. sibirica</i>	M	ad	2710	ss	ss	s	s	s5	<i>M. sibirica</i>
24835	<i>M. sibirica</i>	F	sub	2710	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
24836	<i>M. sibirica</i>	F	sub	2718	ss	ss	-	b	-	hybrid
24837	<i>M. sibirica</i>	M	sub	2810	ss	ss	s	s	s5	<i>M. sibirica</i>
24838*	<i>M. baibacina</i>	F	ad	3024	ss	sb	-	s	s3	hybrid
25051	<i>M. sp.</i>	M	-	2900	bb	bb	b	b	-	<i>M. baibacina</i>
25052*†	<i>M. baibacina</i>	F	ad	3062	ss	ss	-	b	-	hybrid
25053*	<i>M. sp.</i>	F	ad	2940	ss	sb	-	s	s3	hybrid
25054*†	<i>M. sibirica</i>	M	sub	2897	sb	sb	s	b	b5	hybrid (F1)
25055*†	<i>M. sp.</i> [66]	M	sub	3041	sb	sb	b	s	s4	hybrid (F1)
25057*†	<i>M. sp.</i> [66]	M	ad	2897	ss	sb	s	s	s3	hybrid
25060	<i>M. sibirica</i> [79]	M	juv	2873	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25061	<i>M. sibirica</i> [79]	M	juv	2873	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>

25062†	<i>M. sibirica</i> [79]	F	sub	2873	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25063†	<i>M. sibirica</i> [79]	F	ad	2873	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25064†	<i>M. sibirica</i> [79]	M	ad	2873	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25065†	<i>M. sibirica</i> [79]	M	sub	2873	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25066	<i>M. sp.</i>	M	ad	2882	ss	ss	s	s	s5	<i>M. sibirica</i>
25069*†	<i>M. sp.</i>	M	ad	3023	ss	ss	s	b	b4	hybrid
25070*†	<i>M. sp.</i>	M	ad	3057	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25071†	<i>M. sp.</i>	F	ad	2880	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25072†	<i>M. sp.</i>	M	ad	3044	sb	bb	b	b	b9	hybrid
25075*	<i>M. sp.</i>	M	sub	3044	sb	bb	b	b	b8	hybrid
25080*	<i>M. sp.</i>	F	ad	2980	bb	bb	-	b	b3	<i>M. baibacina</i>
25084†	<i>M. sp.</i>	F	ad	2859	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25085†	<i>M. sp.</i>	F	ad	2877	ss	sb	-	s	s3	hybrid
25086	<i>M. sp.</i>	F	ad	2878	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25098*†	<i>M. sp.</i>	F	ad	2910	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25099*	<i>M. sp.</i>	M	ad	2895	ss	ss	s	b	b7	hybrid
25100	<i>M. sp.</i>	F	ad	2887	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25106*†	<i>M. sp.</i>	F	sub	2940	sb	ss	-	b	b5	hybrid
25107*†	<i>M. sp.</i>	F	ad	2983	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25108	<i>M. sp.</i>	F	ad	3003	sb	sb	-	s	s3	hybrid (F1)
25109	<i>M. sp.</i>	M	ad	3058	ss	ss	s	s	s5	<i>M. sibirica</i>
25113	<i>M. sp.</i>	F	ad	3010	ss	ss	-	b	b7	hybrid
25124*	<i>M. sp.</i>	M	-	2816	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25125*†	<i>M. sp.</i> [86]	F	ad	2816	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25126*†	<i>M. sp.</i> [86]	M	ad	2816	ss	ss	s	s	-	<i>M. sibirica</i>
25127†	<i>M. sp.</i> [144]	M	sub	2773	ss	ss	s	s	s6	<i>M. sibirica</i>
25128†	<i>M. sp.</i> [144]	F	ad	2773	ss	ss	-	s	s5	<i>M. sibirica</i>
25129†	<i>M. sp.</i> [144]	M	ad	2773	bb	bb	b	b	-	<i>M. baibacina</i>
25130*†	<i>M. sp.</i>	F	ad	2776	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25131*	<i>M. sp.</i>	M	ad	2802	bb	bb	b	b	b6	<i>M. baibacina</i>

25132*	<i>M. sp.</i>	M	ad	2788	ss	ss	s	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25133*	<i>M. sp.</i>	M	ad	2841	sb	sb	s	b	b3	hybrid (F1)
25134	<i>M. sp.</i>	F	ad	3084	ss	ss	-	s	s3	<i>M. sibirica</i>
25135*	<i>M. sp.</i>	F	ad	2827	sb	sb	-	b	b5	hybrid (F1)
25260	<i>M. baibacina</i>	F	ad	2680	bb	bb	-	b	b3	<i>M. baibacina</i>
25262*	<i>M. baibacina</i> [2]	F	ad	2800	ss	sb	-	b	b3	hybrid
25263*	<i>M. baibacina</i> [2]	M	ad	2800	ss	ss	s	b	b3	hybrid

¹ juv - сеголеток; sub - полувзрослый; ad - взрослый.

² Аллели: s - *sibirica*; b - *baibacina*. Цифрами обозначены аллельные варианты CR.

³ В квадратных скобках номера семейных групп, в которых генотипировано более одной особи.

* Особь, отловленная в крупнокаменистых россыпях.

† меченные особи.

По результатам генетической диагностики более половины сурков (62%) исследованной выборки могут быть отнесены к одному из видов (51.72% – *M. sibirica*, 10.34% – *M. baibacina*). Остальные животные (38%) диагностируются как сурки гибридного происхождения и несут аллели обоих видов в разных комбинациях (таблица 1). В общей выборке сурков частота встречаемости аллелей *sibirica* в ядерном геноме в среднем втрое, а в митохондриальном геноме почти вдвое превышает таковую *baibacina* (таблица 2).

Таблица 2 - Частоты видоспецифических гаплотипов молекулярно-генетических маркеров в популяции сурков из зоны совместного обитания *M. sibirica* и *M. baibacina* в Монгольском Алтае.

Генетический маркер	Общая выборка (n=58)		Гибриды (n=22)		Крупнокаменистые россыпи (n=28)	
	<i>sibirica</i>	<i>baibacina</i>	<i>sibirica</i>	<i>baibacina</i>	<i>sibirica</i>	<i>baibacina</i>
<i>i5HoxB</i>	0.81	0.19	0.74	0.26	0.75	0.25
<i>i13BCR</i>	0.74	0.26	0.61	0.39	0.64	0.36
<i>cytb</i>	0.66	0.34	0.36	0.64	0.50	0.50
<i>i8SmcY*</i>	0.71	0.29	0.55	0.45	0.62	0.38

* – только для самцов: в общей выборке n=31; для гибридов n=11; в крупнокаменистых россыпях n=16.

Наблюдаемая гетерозиготность (H_o) по каждому из диплоидных маркеров яДНК в тотальной выборке оказалась ниже ожидаемой (H_e), а индекс фиксации Райта (F_{is})

принимает значения >0 (таблица 3). Аналогичная тенденция наблюдалась и в выборке из крупнокаменистых россыпей. При этом значения гетерозиготности в последней оказались заметно выше, а значение F_{is} в два раза меньше.

Таблица 3 - Популяционно-генетические характеристики выборки сурков из зоны совместного обитания *M. sibirica* и *M. baibacina* в Монгольском Алтае.

Маркер	Гетерозиготность		Средняя гетерозиготность ± (s.d.)		Fis (p<0.05)	
	He	Ho	He (s.d.)	Ho (s.d.)	Для локуса	Общее
Общая выборка (n=58)						
i5HoxB	0.3100	0.1724	0.3484±0.0543	0.1897±0.0244	0.446	0.458
i13BCR	0.3868	0.2069			0.467	
Крупнокаменистые россыпи (n=28)						
i5HoxB	0.3818	0.2857	0.4247±0.0606	0.3214±0.0505	0.255	0.247
i13BCR	0.4675	0.3571			0.239	

Для оценки уровня общей внутрипопуляционной генетической изменчивости были секвенированы 57 полных нуклеотидных последовательностей контрольного региона mtDNA (998-1001 bp). В исследованной выборке, включающей особей из "чистых" популяций и из зоны контакта, было обнаружено 15 гаплотипов CR (таблица 1). Все гаплотипы формируют два видоспецифических кластера на эволюционной сети гаплотипов (рисунок 1). Межвидовые различия выявлены по 72 нуклеотидным заменам.

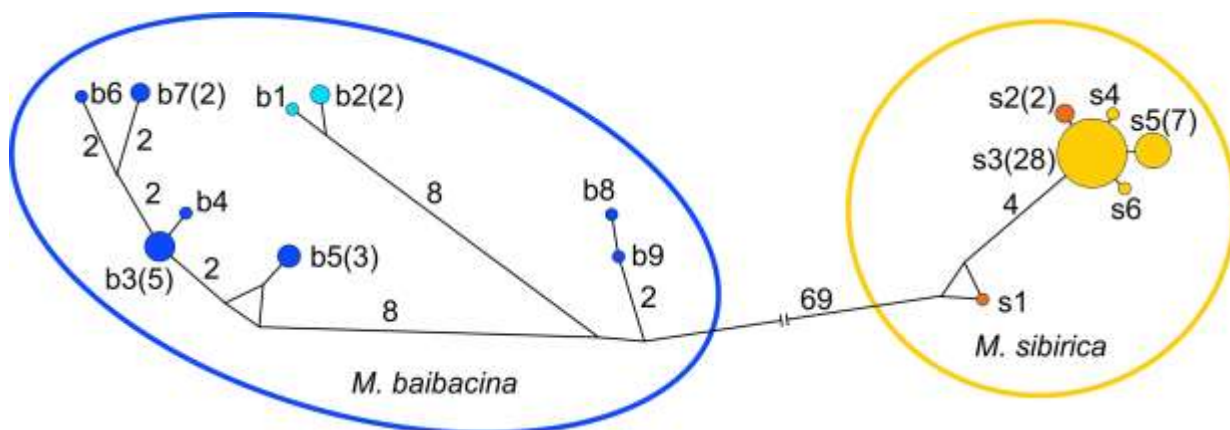


Рисунок 1 - Эволюционная сеть гаплотипов контрольного региона (CR)

Гаплотипы: голубым цветом – "чистые" *M. baibacina*; оранжевым – "чистые" *M. sibirica*; синим и желтым – *M. baibacina* и *M. sibirica* соответственно из смешанной популяции. Обозначения гаплотипов как в таблице 1. Цифры в круглых скобках – количество особей.

Наши данные молекулярно-генетической диагностики сурков с территории совместного обитания *M. baibacina* и *M. sibirica* свидетельствуют об активной гибридизации этих двух видов. Высокая частота встречи гибридных особей в популяции (38% от общей выборки) и наличие в их геноме почти всех возможных комбинаций аллелей исследованных маркеров родительских видов (таблица 1) свидетельствуют о жизнеспособности и плодовитости гибридов F1 и жизнеспособности их потомков. Однако наблюдается дефицит гетерозигот ($H_o < H_e$, $F_{is} > 0$) как для каждого из диплоидных аутосомных маркеров, так и в среднем во всех выборках, что указывает на отсутствие панмиксии в этой популяции и ее подразделенность – "эффект Валунда". В итоге молекулярно-генетический анализ выявил высокую долю гибридов в популяции, их высокую концентрацию на участке крупнокаменистых россыпей и подразделенность всей популяции с нарушением панмиксии. Одной из причин подразделенности могут являться прекопулятивные механизмы, такие как поведенческие и экологические особенности, ограничивающие свободное скрещивание в смешанной популяции.

Недостаток *M. baibacina* на участках совместного обитания может быть причиной сравнительно низкой наблюдаемой доли гибридов F1. В то же время высокая доля гибридных особей в популяции указывает на интенсивное скрещивание гибридов как с особями родительских видов, так и с другими гибридами в различных комбинациях. Учитывая наличие в популяции генотипов с практически всеми возможными комбинациями аллелей, можно предположить, что скрещивание особей с различными генотипами идет без существенных ограничений, стерильность гибридов F1 отсутствует или очень слабо выражена. Однако объем наших данных не достаточен для подтверждения фертильности бэккроссов. Присутствие у гибридов аллелей обоих видов как в митохондриальном геноме (материнские линии), так и в Y-хромосоме (отцовские линии) (таблица 2) указывает на участие как самцов, так и самок обоих видов в гибридизации. В этом случае можно предположить частичное или полное нарушение правила Холдейна, то есть преимущественная стерильность и нежизнеспособность гетерогаметного пола у гибридов, но это требует более углубленного исследования. По-видимому, независимая эволюция этих видов длительностью около 2.5-3 млн. лет [5], происходившая в условиях аллопатрии, не привела к формированию эффективных посткопулятивных межвидовых барьеров.

Большая частота встречаемости гибридных особей в крупнокаменистых россыпях (рисунок 2) указывает на то, что именно в этих местах происходят наиболее многочисленные контакты между гетероспецификами с образованием смешанных пар также, как и последующие скрещивания гибридов.

Биотопическая сегрегация двух видов сурков согласуется с обнаруженным "эффектом Валунда" и может являться одним из факторов, ограничивающих панмиксию и соответственно гибридизацию в смешанной популяции.

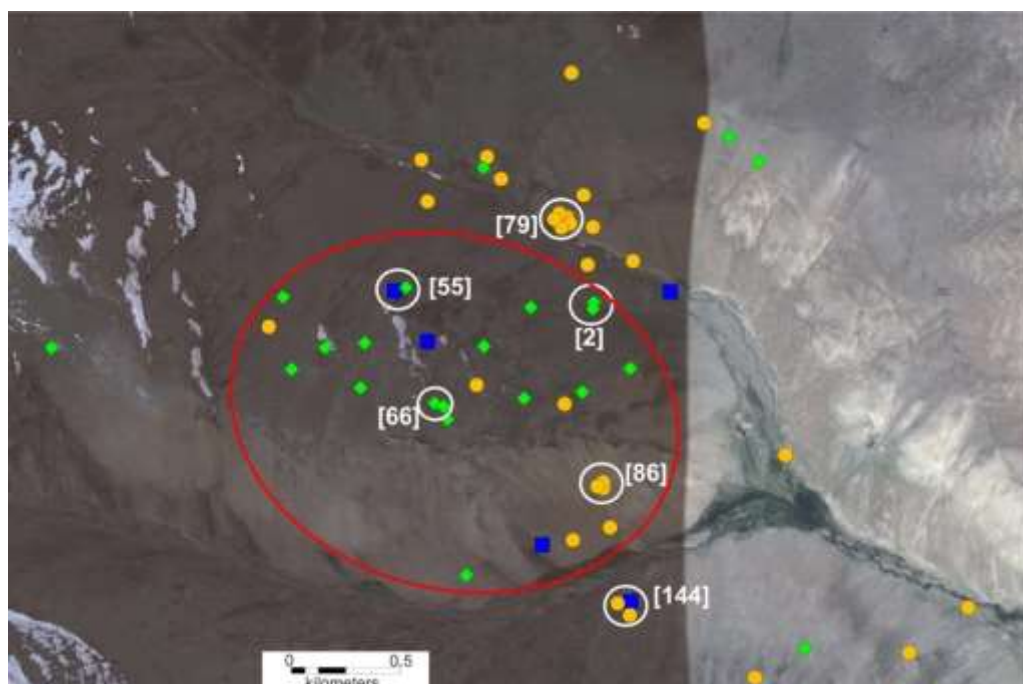


Рисунок 2 - Пространственное распределение генотипированных особей на участке совместного обитания двух видов сурков

Условные обозначения: оранжевый кружок – *M. sibirica*; синий квадрат – *M. baibacina*; зеленый ромб – гибридная особь; белый круг – особи из одной семьи; цифры в квадратных скобках – номера семейных групп (см. таблица 1); красный овал обозначает область распространения каменистых россыпей.

Выявленная нами интенсивность гибридизации *M. baibacina* - *M. sibirica* ниже, чем у палеарктических *Spermophilus*, как по доли гибридов в популяциях, так и по пространственному охвату [7-11]. Но в целом палеарктические *Marmota* и *Spermophilus* легче вовлекаются в гибридизационный процесс в зонах вторичного контакта, чем Неарктические *Marmotini* [12-15], что может быть связано с большей дивергенцией неарктических видов и, соответственно, формированием у них более эффективных межвидовых барьеров по сравнению с палеарктическими [16, 17]. При этом ни в нашем исследовании, ни у других наземных беличьих до настоящего времени не обнаружено

адаптивного влияния интрогрессии генов, как например, у оленей *Odocoileus*, образующих гибридную популяцию [18] или интрогрессивного замещения митохондриального генома, как у зайцев *Lepus* [19].

Заключение

Исследования по изучению особенностей природной гибридизации, проведенные в 2021 году для наземных беличьих, носят приоритетный характер. Наше исследование выявило активную гибридизацию в зоне вторичного контакта двух видов сурков. Генетические данные не обнаруживают ограничений для скрещивания гетероспецификов и указывают на фертильность F1 и их потомков, но свидетельствуют о подразделенности смешанной популяции. В изученной системе двух видов сурков предположительно экологические и поведенческие особенности могут являться одним из факторов, предотвращающих широкую интрогрессию геномов [4, 5].

Список использованных источников

1. Никольский А.А., Янина И.Ю., Рутовская, М.В., Формозов Н.А. Изменчивость звукового сигнала степного и серого сурков (*Marmota bobac*, *M. baibacina*, Sciuridae, Rodentia) в зоне вторичного контакта // Зоол. журнал. 1983. Т. 62. – Вып.8. – С. 1258–1266.
2. Смирин Ю.М., Формозов Н.А., Бибилов Д.И. Мягмаржав Д. Характеристика поселений двух видов сурков (*Marmota*, Rodentia, Sciuridae) в зоне их контакта на Монгольском Алтае // Зоол. журнал. 1985. Т. 64. – Вып.12. – С. 1873–1885 .
3. Семенова Н.И. Особенности размещения серых и красных сурков на участках соприкосновения их ареалов в Ферганском хребте // Ресурсы фауны сурков в СССР. М.: Наука, 1967. – С. 37–38.
4. Brandler O.V.1, Kapustina S.Yu.1, Nikol'skii A.A., Kolesnikov V.V, Badmaev B.B., Adiya Ya. A Study of Hybridization Between *Marmota baibacina* and *M. sibirica* in Their Secondary Contact Zone in Mongolian Altai//Frontiers in Ecology and Evolution. Special issue "Ecological, behavioral and genomic consequences in the rodent family Sciuridae: Why squirrels are so diverse?" 9:555341. DOI:10.3389/fevo.2021.555341.
5. Waterman J.M., Gossmann T.I., Brandler O.1, Koprowski J.L. Editorial: Ecological, Behavioral and Genomic Consequences in the Rodent Family Sciuridae: Why Are Squirrels So Diverse?// Frontiers in Ecology and Evolution. – 2021. – Vol. 11. – Art. no 765558. DOI 10.3389/fevo.2021.765558.

6. Stepan, S. J., Kenagy, G. J., Zawadzki, C., Robles, R., Lyapunova, E. A., & Hoffmann, R. S. (2011). Molecular data resolve placement of the Olympic marmot and estimate dates of trans-Beringian interchange // *Journal of Mammalogy*. – 2011. – Т. 92. – №. 5. – С. 1028-1037.
7. Ермаков О.А., Сурин В.Л., Титов С.В., Тагиев А.Ф., Лукьяненко А.В., Формозов Н.А. Изучение гибридизации четырех видов сусликов (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) молекулярно-генетическими методами // *Генетика*. – 2002. – Т. 38. – №. 7. – С. 950-964.
8. Титов С.В. Ермаков О.А., Сурин В.Л., Формозов Н.А., Касаткин М.В., Шилова С.А., Шмыров А.А. Молекулярно-генетическая и биоакустическая диагностика больших (*Spermophilus major* Pallas, 1778) и желтых (*S. fulvus* Lichtenstein, 1823) сусликов из совместного поселения // *Бюлл. МОИП. Отд. биол.* – 2005. – Т. 110. – №. 4. – С. 72-80.
9. Спиридонова Л.Н., Челомина Г.Н., Тсуда К., Йонекава Х., Стариков В.П. Генетические свидетельства обширной интрогрессии генов короткохвостого суслика в зоне гибридизации *Spermophilus major* и *S. erythrogenys*: данные секвенирования гена цитохрома b мтДНК // *Генетика*. – 2006. – Т. 42. – №. 7. – С. 976-984.
10. Ermakov O.A., Simonov E., Surin V.L., Titov S.V., Brandler O.V., Ivanova N.V., Borisenko A.V. Implications of hybridization, NUMTs, and overlooked diversity for DNA barcoding of Eurasian ground squirrels // *PLoS One*. – 2015. – Т. 10. – №. 1. – С. e0117201.
11. Ivanova, A. D., Surin, V. L., Ermakov, O. A., & Formozov, N. A. The hybridization zone of red-cheeked (*Spermophilus erythrogenys*) and little (*Spermophilus pygmaeus*) ground squirrels (Rodentia, Sciuridae) // *Zoologicheskii Zhurnal*. – 2017. – Т. 96 – №. 4. – С. 449-457.
12. Hird S., Reid N., Demboski J., Sullivan J. Introgression at differentially aged hybrid zones in red-tailed chipmunks // *Genetica*. – 2010. – Т. 138. №. 8 – С. 869-883.
13. Stangl F. B., Snook A. L., Harmon L. A., Mills D. R. Historical Zoogeography and Current Status of Two Species of Hybridizing Ground Squirrels (*Ictidomys Parvidens* and *I. Tridecemlineatus*) on the Southern Plains of Texas // *Museum of Texas Tech University*. – 2012.
14. Frare C. F., Matocq M. D., Feldman C. R., White A. M., Manley P. N., Jermstad K. D., Hekkala E. R. Landscape disturbance and sporadic hybridization complicate field identification of chipmunks // *The Journal of Wildlife Management*. – 2017. – Т. 81. – №. 2. – С. 248-258.
15. Leitner P., Rippert J., Matocq M. D. (). Genetic Structure Across a Contact Zone between *Xerospermophilus* Ground Squirrels in Southern California. // *Western North American Naturalist*. – 2017. – Т. 77. – №. 2. – С. 152-161.

16. Herron M. D., Castoe T. A., Parkinson C. L. Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*) // *Molecular phylogenetics and evolution*. – 2004 – T. 31. – №. 3. – C. 1015-1030.
17. Brandler, O. V., Lyapunova E. A., Bannikova A. A., Kramerov D. A. 2010. Phylogeny and systematics of marmots (*Marmota*, *Sciuridae*, *Rodentia*) inferred from inter-SINE PCR data // *Russian Journal of Genetics*. – 2010. – №. 46. – C. 283–292.
18. Haines M. L., Luikart G., Amish S. J., Smith S., & Latch, E. K. (). Evidence for adaptive introgression of exons across a hybrid swarm in deer // *BMC evolutionary biology*. – 2019. – T. 19 – №. 1. – C. 1-17.
19. Marques J. P., Farelo L., Vilela J., Vanderpool D., Alves P. C., Good J. M., Melo-Ferreira J. Range expansion underlies historical introgressive hybridization in the Iberian hare // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 1-9.

РАЗДЕЛ 2. ФИЛОГЕОГРАФИЯ, ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ РЕВИЗИИ МОДЕЛЬНЫХ ГРУПП ЖИВОТНЫХ

Введение

Популяционно-генетический анализ, осуществленный с использованием современных молекулярно-генетических методов, крайне востребован как для анализа филогенетических связей, так и при проведении таксономических ревизий. Описание новых видов нередко инициируется необычным уровнем вариабельности изученных молекулярных маркеров. В качестве модельных групп в исследованиях 2021 г. были выбраны представители как позвоночных (осетровые рыбы - белуга, карповые рыбы, млекопитающие - суслики *Spermophilus major*, полевки подрода *Terricola*), так и беспозвоночных (голожаберные моллюски рода *Eubranchus*).

Методы

Использованы современные молекулярно-генетические методы, такие как различные методики для выделения ДНК, дающие наилучший выход материала для каждого объекта, подобраны праймеры и условия полимеразной цепной реакции. Использовано секвенирование фрагментов ядерной и митохондриальной ДНК, рестриктивный анализ 2b- Restriction site Associated DNA (2bRAD), геномный анализ SNP. Применены различные программы для обработки и анализа полученного генетического материала, и статистические программы для конкретных задач, подбора праймеров, построения филогенетических реконструкций LaserGene, GARLI 2.0, MrBayes 3.2, MEGA X, RAxM, Network и др. Использованы образцы Объединенной коллекции тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований ИБР РАН.

Результаты и обсуждение

Подраздел 2.1 Изменчивость контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография большого суслика

Большой суслик (*Spermophilus major* Pallas, 1778) является типичным представителем наземных беличьих Евразии, населяющих открытые степные биотопы. Обширный ареал вида протянулся от правобережья Волги до Тоболо-Ишимского междуречья, огибая с юга Уральский хребет. Молекулярно-генетические исследования обнаружили в популяциях *S. major* обширную интрогрессию митохондриальной ДНК контактирующих с ним видов сусликов [20-22]. Несмотря на гибридизацию с другими видами сусликов в зонах симпатрии и широкую интрогрессию чужеродной мтДНК, обнаруженную далеко за пределами зон контакта ареалов, большой суслик сохраняет свое видовое своеобразие. Большинство исследований *S. major* сосредоточено на краевых

популяциях, расположенных в зонах контакта с другими видами, в то время как генетическая структура и изменчивость в центральной части его обширного ареала остается до сих пор малоизученной. Однако задача делимитации собственного митохондриального генома большого суслика, вне зависимости от его происхождения, с геномами гибридизирующих с ним видов требует представления о его генетической изменчивости на всей территории обитания. В связи с этим целями нашей работы [23] стали: 1) оценка внутривидового полиморфизма контрольного региона мтДНК большого суслика из всех частей ареала без учета влияния чужеродных интрогрессивных гаплотипов; 2) описание филогеографической структуры *S. major* и исследование влияния на нее эколого-географических барьеров, в частности Уральских гор.

Нами была определена первичная нуклеотидная последовательность полноразмерного (1005–1008 п. н.) контрольного региона мтДНК у 212 особей *S. major*, 11 *S. brevicauda* и по одной *S. fulvus* и *S. erythrogenys*. Все вновь полученные последовательности депонированы в GenBank с номерами доступа MW149931 – MW150003. Также для анализа были использованы последовательностями *S. pygmaeus* (KR673335) и *S. suslicus* (KR611438) из GenBank. Тринадцать образцов большого суслика кластеризовались на филогенетическом дереве совместно с гаплотипами контактирующих видов и были удалены из дальнейшего анализа. Оставшиеся 199 образцов большого суслика из 60 локалитетов были приняты нами как собственные гаплотипы *S. major*.

Сравнительный анализ (рисунок 3а) показал значительную дифференциацию собственных митотипов *S. major* с контактирующими видами (p -дистанции составили от 2.3 ± 0.4 % с *S. brevicauda* до 11.1 ± 0.9 % с *S. pygmaeus*). На филогенетических деревьях вся выборка *S. major* формирует последовательно ветвящуюся кладу с низкими значениями поддержек основных ветвей (рисунок 3б). В базальной части дерева преобладают гаплотипы, распространенные преимущественно в популяциях, расположенных к востоку от Уральских гор (секция Е на рисунок 3б). Остальные экземпляры образуют единую кладу (секция W на рисунок 3б), в которой преобладают гаплотипы, встречающиеся в западных и центральных популяциях. Сеть гаплотипов (рисунок 4) показывает наличие двух близких эволюционных линий, связанных с восточным и западным распространением. Средние попарные генетические дистанции (p -distance) во всей выборке составили 0.6 ± 0.1 % при среднем числе замен 6.2 ± 1.3 ; в пределах западной и восточной групп популяций – 0.5 ± 0.1 % и 0.7 ± 0.1 % соответственно, а между группами – 0.8 ± 0.2 %. Средняя p -дистанция между популяциями составила 0.6 ± 0.01 %. Результаты анализа изменчивости CR в популяциях большого суслика приведены в таблица 4. Проверка на изоляцию расстоянием выявила существенную корреляцию генетических и географических дистанций в пределах всего

ареала (тест Мантеля: $r = 0.57$, $p < 0.01$). При этом такая взаимосвязь проявляется только в западной части ареала ($r = 0.33$, $p < 0.01$), в отличие от восточной ($r = -0.03$, $p > 0.05$).

Обнаруженные в выборке *S. major* гаплотипы CR в целом слабо дифференцированы, отличаются друг от друга малым числом замен (рисунок 4), однако проявляют четкие различия с другими видами сусликов (рисунок 3а), находясь с ними на генетических дистанциях, многократно превышающих внутривидовые.

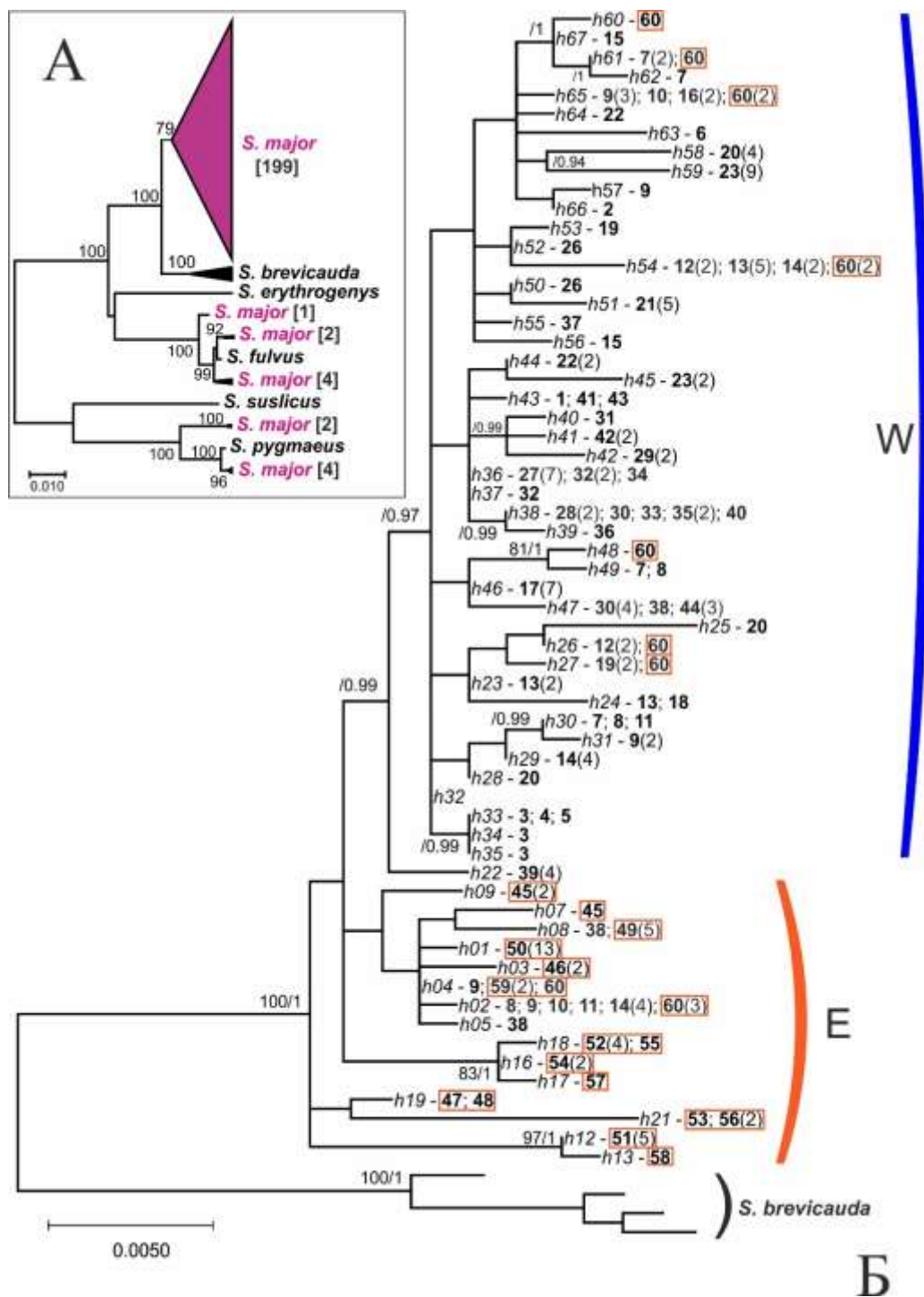


Рисунок 3 - Дендрограммы изменчивости контрольного региона мтДНК
 А – филогенетическое дерево (NJ) последовательностей *S. major* и контактирующих с ним видов сусликов. Б – дендрограмма (ML) гаплотипов *S. major* с *S. brevicauda* в качестве

внешней группы. Числа, выделенные жирным шрифтом, соответствуют номерам популяций *W*; в квадратных скобках указано число образцов *S. major* в кластере, в круглых скобках – число особей в выборке больше 1, имеющих данный гаплотип; прямоугольными рамками выделены популяции "восточной" группы (объяснение в тексте). Цифрами у узлов обозначены индексы бутстрэп-поддержки при NJ- (на А) или ML-анализе и апостериорные вероятности Байесова анализа (ML/BI – на Б), значения <70/0.9 не указаны. E, W – группы гаплотипов (объяснение в тексте).

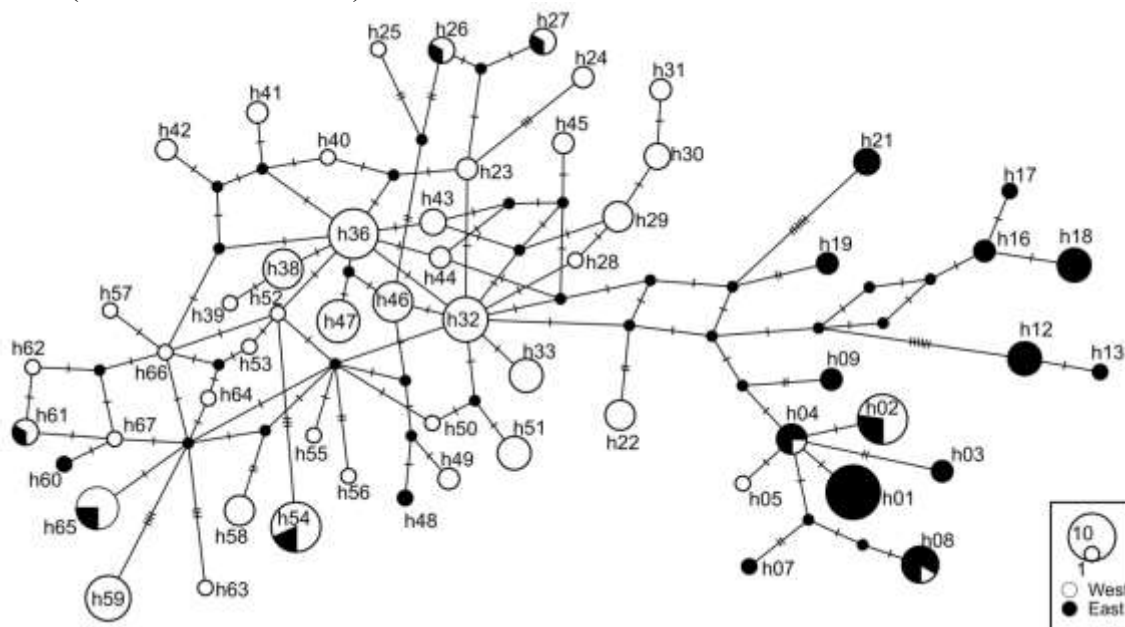


Рисунок 4 - Сеть (MJ) гаплотипов CR исследованной выборки *S. major*

Обозначения гаплотипов как на рисунок 2. Белым цветом обозначена встречаемость гаплотипа в "западной", черным – в "восточной" группе популяций. Поперечными черточками обозначено количество замен между гаплотипами. Величина кружков соответствует объему выборки.

Преобладание этих гаплотипов в подавляющем большинстве популяций на протяжении всего ареала вида позволяет признать митохондриальный геном, ассоциированный с данной гаплотипической группой CR, видоспецифическим для *S. major*.

Структура обнаруженной генетической изменчивости большого суслика не позволяет выделить строго географически дифференцированные филогруппы по примеру описанных у других видов равнинных сусликов *S. suslicus* [24, 25] и *S. pygmaeus* [26, 27]. Тем не менее, в распределении на дендрограмме и на сети гаплотипов наблюдается тенденция разделения вариантов CR, встречающихся преимущественно на запад и на восток от Уральских гор, генетическая дифференциация между которыми в 5-8 раз ниже, чем у крапчатого и малого сусликов. На существующую пространственную подразделенность популяций указывают и статистически поддержанные результаты теста на изоляцию расстоянием (тест Мантеля). Обнаруженная генетическая дифференциация популяций с обеих сторон от Южного Урала указывает на его роль, возможно в течение непродолжительного периода, в качестве эколого-географического барьера для большого

суслика. В то же время присутствие в "западных" и "восточных" популяциях одних и тех же или имеющих минимальные отличия гаплотипов свидетельствует о неоднократном нарушении их изоляции.

При оценке барьерной роли Уральского хребта особое значение играет популяция из Свердловской области (60), расположенная на восток от него на северной границе распространения вида и обладающая уникальным для вида генетическим разнообразием. В ее генофонде объединены гаплотипы как восточной, так и западной гаплогрупп, состав которых указывает на недавнюю активную связь с популяциями Татарстана и Западной Башкирии, отделенными от нее Уральским горным массивом. В качестве возможного объяснения сходства генотипического состава зауральских (свердловских) и предуральских популяций является предположение их связи в прошлом через Кунгурскую и Красноуфимскую лесостепи Среднего Урала.

Отрицательные значения F_s -теста указывают на относительно недавнее увеличение численности популяции и расширение ареала на запад от Урала, но неопределенны для восточной его части ввиду статистической недостоверности (таблица 4). Учитывая низкий уровень внутривидовой дифференциации объединенного пула гаплотипов *S. major*, базальное положение гаплогруппы E и более высокий уровень изменчивости восточных популяций, можно предположить, что эти изменения могли произойти в относительно недалеком прошлом и должны были предваряться редукцией ареала большого суслика до ограниченной территории на востоке современного его распространения с последующей быстрой экспансией в западном направлении.

Таблица 4 - Генетическое разнообразие популяций большого суслика *S. major*.

Группа популяций	n	H	S/η	$h \pm SD$	$\pi \pm SD$	k	F_s (p)
"западная"	142	48	60/63	0.969 ± 0.004	0.0055 ± 0.0029	5.533	-25.03 (<0.01)
"восточная"	57	21	40/41	0.923 ± 0.022	0.0073 ± 0.0038	7.328	-2.31 (>0.05)
Общая выборка	199	61	72/76	0.974 ± 0.003	0.0069 ± 0.0035	6.957	-24.67 (<0.01)

Подраздел 2.2 Межвидовая дифференциация и филогенетические связи трёх видов кустарниковых полёвок подрода *Terricola*

С целью исследования генетической изменчивости, а также уточнения уровня межвидовой дифференциации и филогенетических связей трёх широко распространённых видов кустарниковых полёвок подрода *Terricola* рода *Microtus* – подземной полёвки *M. subterraneus*, дагестанской *M. daghestanicus* и кустарниковой *M. majori* – нами был проведён мультилокусный молекулярно-генетический анализ представителей этих видов из ряда пунктов Центральной, Южной и Восточной Европы, Северного Кавказа, Закавказья и Малой Азии [28]. Локалитеты, в которых был произведён сбор материала, представлены на карте (рисунок 5). В работе было использовано несколько молекулярных маркеров: полный митохондриальный ген цитохрома *b* (*cytb*, 1143 п.н.), а также фрагменты ядерных генов *BRCA1* (1698 п.н.), *IRBP* (807 п.н.) и *XIST* (у последнего гена исследованы два неперекрывающихся участка размером 409–413 и 583–585 п.н., 994–998 п.н. в целом; небольшие различия по длине фрагментов обусловлены делециями/вставками нуклеотидов).

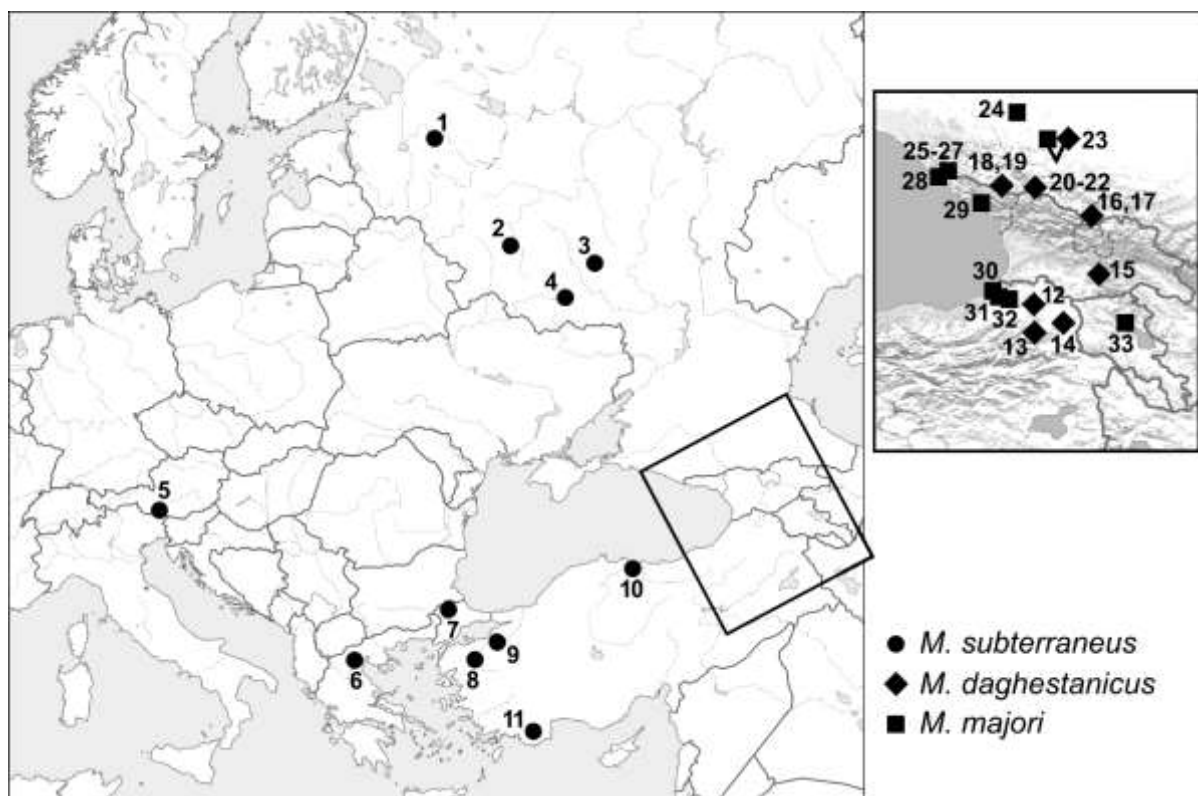


Рисунок 5 - Пункты отлова исследованных кустарниковых полёвок подрода *Terricola*

Близко расположенные локалитеты обозначены одним значком.

Последовательности гена *cytb* были определены нами в полной выборке, то есть у 69 полёвок. Дендрограмма, построенная методом Maximum Likelihood (ML) по результатам

анализа гена *cytb* (рисунок 6), демонстрирует с высокой бутстреп-поддержкой генетическую обособленность видов подрода *Terricola*, особенно *M. majori* по отношению к *M. daghestanicus* и *M. subterraneus*. Генетические дистанции (D) между этими видами варьируют от 0.0783 (при сравнении *M. daghestanicus* и *M. subterraneus*) до 0.0968 (при сравнении *M. majori* и *M. subterraneus*). Ген *cytb* характеризуется высокой изменчивостью у каждого из исследованных видов подрода *Terricola*, но её черты у *M. majori*, *M. daghestanicus* и *M. subterraneus* различны. В пределах каждого из этих видов прослеживается от 2 до 6 клад или обособленных ветвей. У *M. majori* нами обнаружены две близкие формы (D = 0.0245), одна из которых населяет Северный Кавказ, другая – Закавказье. Особенно высокая дифференциация, сопоставимая с минимальными межвидовыми различиями, выявлена нами у *M. daghestanicus* и *M. subterraneus*. У *M. subterraneus* наиболее высокой генетической гетерогенностью отличаются популяции юга Европы и Малой Азии, причём наиболее удалённым от всех прочих популяций оказался экземпляр из окр. Самсуна в северной части Малой Азии (D = 0.0549–0.0636). Несмотря на полиморфизм по числу хромосом в популяциях *M. subterraneus*, населяющих Восточно-Европейскую равнину, они имеют обеднённый генофонд и демонстрируют очень слабые популяционные различия. Интересно, что у *M. daghestanicus* самыми генетически удалёнными являются клады, сформированные митотипами дагестанских полёвок из территориально смежных пунктов Грузии и Турции (D=0.0379), а также клады, представленные особями из соседних республик центральной части Северного Кавказа (D=0.0341).

Секвенирование ядерных генов было проведено выборочно у части особей каждого вида, продемонстрировавших наибольшие различия по гену *cytb*: у 8 экз. *M. subterraneus*, всех 18 экз. *M. daghestanicus*, 6 экз. *M. majori*, 1 экз. *M. obscurus* и 1 экз. *M. rossiaemeridionalis* (в общей сложности – у 34 животных). Фрагменты ядерных генов *BRCA1*, *IRBP* и *XIST* оказались в разной степени изменчивы в пределах изученной группы видов подрода *Terricola* и у каждого из них в отдельности. По этой причине филогенетические реконструкции, построенные по каждому из ядерных генов (рисунок 7 а,б,в), показывают лишь частичное совпадение как друг с другом, так и деревьями, полученными при анализе гена *cytb*. Также наблюдается значительное расхождение в количестве фиксированных замен и значениях генетических дистанций при сравнении видов полёвок по генам *BRCA1*, *IRBP* и *XIST* (таблица 5). Обобщение данных их анализа и построение дендрограмм по объединённым последовательностям всех ядерных генов (Рис. 3, д) приводит к следующим основным результатам. Из трёх изученных видов подрода

Terricola наиболее обособленным, как и по митохондриальной ДНК, является *M. majori*, что отчётливо видно по генам *BRCA1* и *XIST*. Дифференциация его северо-кавказской и закавказской популяционных группировок, генетически достаточно близких, прослеживается, в целом, слабо и только по гену *XIST*. В пределах *M. subterraneus* и *M. daghestanicus* наблюдается высокая изменчивость всех ядерных генов, «размывающая» различия между этими видами. Не исключено, что в перспективе, при исследовании дополнительного материала, будут обнаружены ещё более уклоняющиеся генотипы. Как и по гену *cytb*, у *M. subterraneus* наибольшим генетическим полиморфизмом характеризуются малоазийские популяции, среди которых популяция из Самсуна является самой удалённой, на основании чего можно предполагать её принадлежность к новому криптическому виду; популяции Восточно-Европейской равнины имеют обеднённый генофонд, о чём свидетельствуют высокое сходство генотипов и редкая встречаемость гетерозиготных особей. В пределах *M. daghestanicus* несомненным генетическим своеобразием отличается популяция из Северной Осетии. Среди прочих экземпляров этого вида наблюдается изменчивость, не имеющая отчётливой связи с географическим происхождением выборок, что наряду с обилием животных, гетерозиготных по ряду нуклеотидных сайтов, может указывать на активный обмен особями и генами между популяциями Кабардино-Балкарии и Карачаево-Черкесии. Интенсивные контакты также можно предполагать для северо-кавказских популяций *M. majori* и малоазийских популяций *M. subterraneus*.

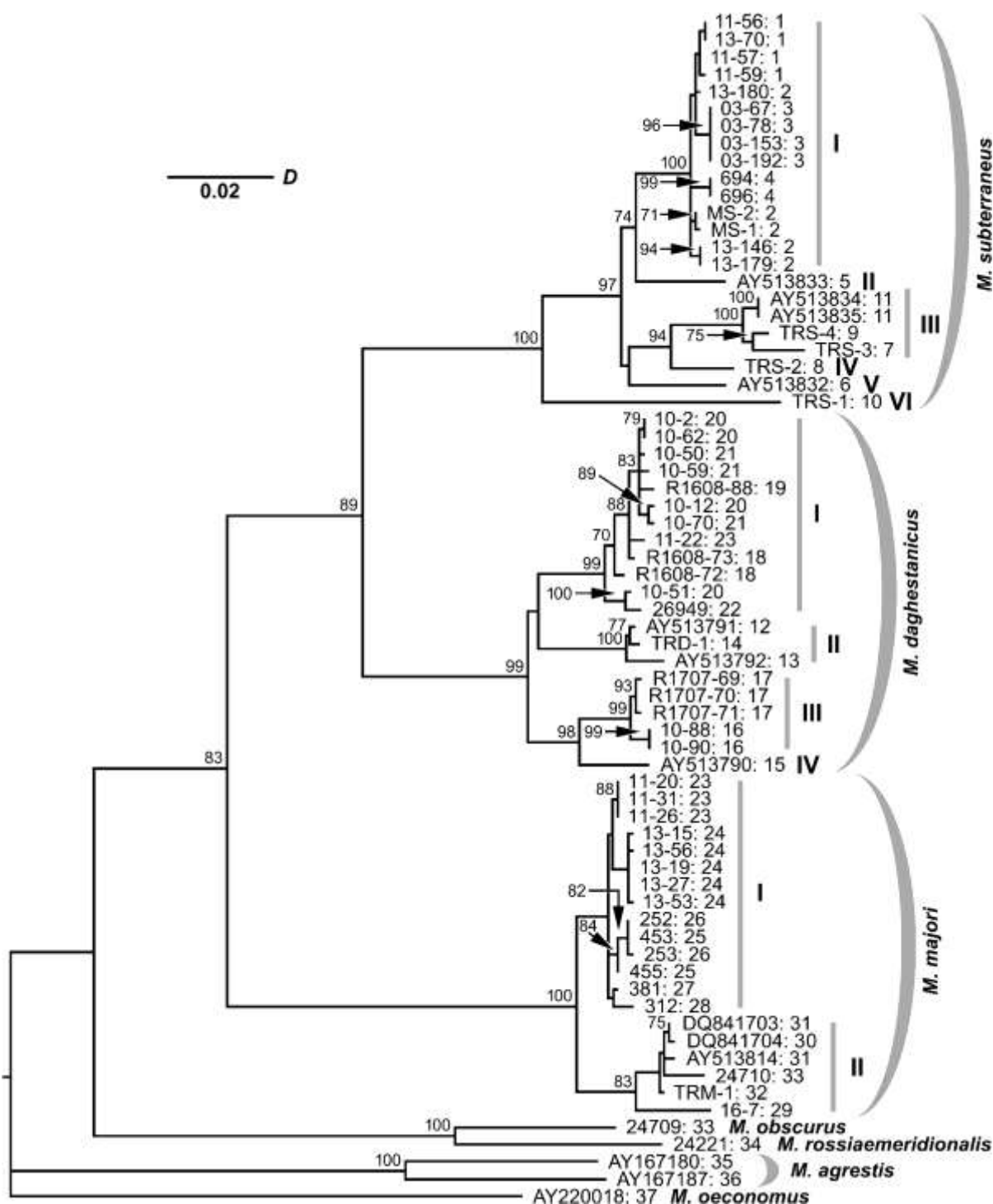


Рисунок 6 - ML-дендрограмма, построенная при сравнении полных последовательностей митохондриального гена *cytb* (1143 п.н.) полёвок подрода *Terricola*, а также нескольких других видов полёвок рода *Microtus*. Справа от ветвей дендрограммы указаны номер животного из нашей собственной коллекции или номер в базе GenBank для ранее опубликованного материала, а через запятую – номер локалитета (см. рисунок 5). В узлах ветвления дендрограммы указаны значения бутстреп-поддержки, превышающие 70%.

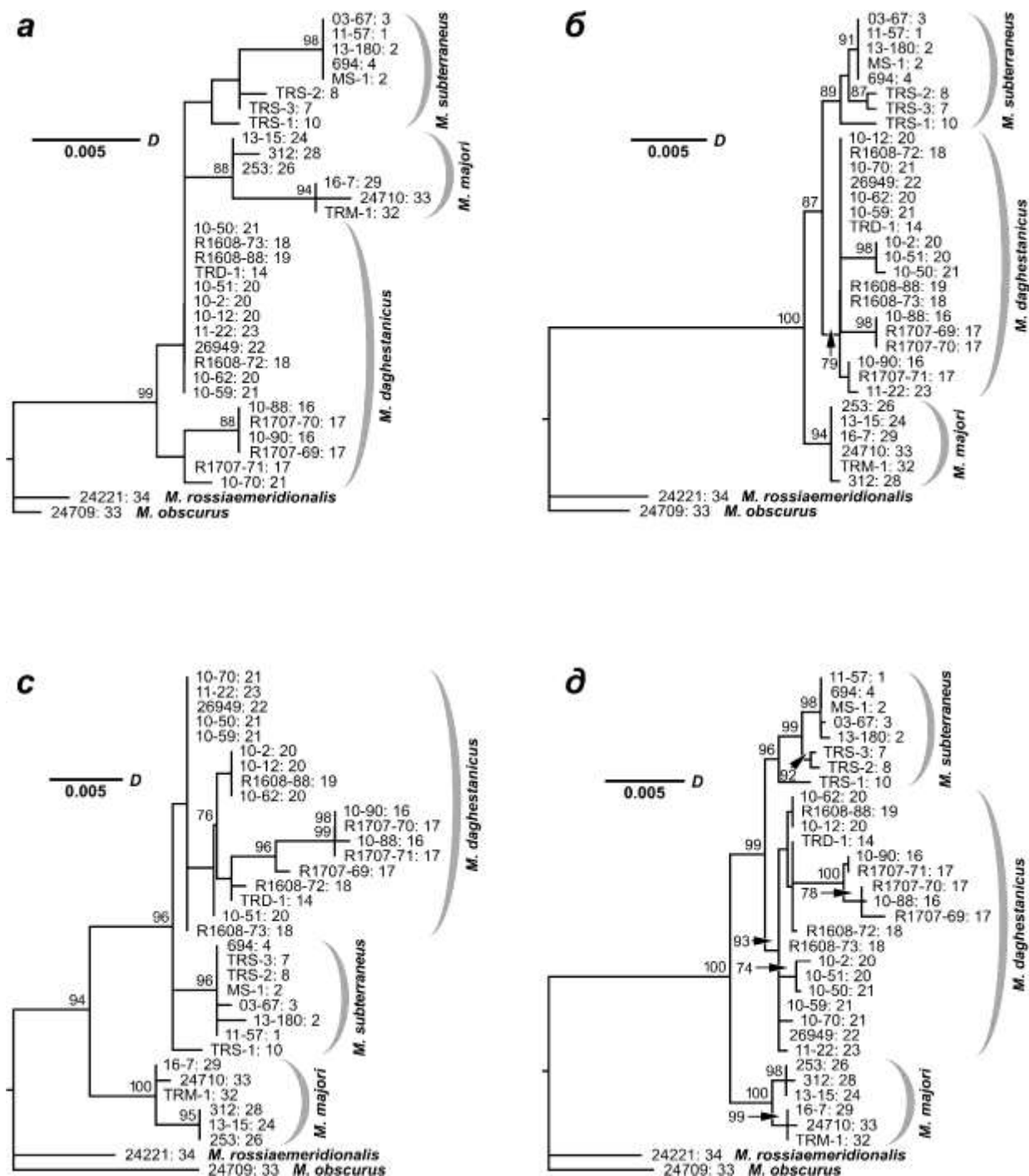


Рисунок 7 - ML-дендрогаммы, построенные при сравнении фрагментов ядерных генов

а) *IRBP* (807 п.н.), б) *BRCA1* (1698 п.н.), с) *XIST* (998 п.н.), д) их объединённых последовательностей (3503 п.н.) полевых подрода *Terricola*, а также особей видов *Microtus obscurus* и *M. rossiaemeridionalis*. Справа от ветвей дендрогаммы указаны коллекционный номер животного, а через запятую – номер локалитета (см. рисунок 5). В узлах ветвления дендрогаммы указаны значения бутстреп-поддержки, превышающие 70%.

Таблица 5 - Средние значения р-дистанций и количество фиксированных нуклеотидных замен (в скобках), определённые при сравнении фрагментов трёх ядерных генов у видов полевков подрода *Terricola*, а также *Microtus obscurus* и *M. rossiaemeridionalis*.

Вид	р-дистанции и количество фиксированных замен			
	<i>M. subterraneus</i> <i>0.0029 (IRBP)</i> <i>0.0018 (BRCA1)</i> <i>0.0020 (XIST)</i>	<i>M. daghestanicus</i> <i>0.0017</i> <i>0.0016</i> <i>0.0043</i>	<i>M. majori</i> <i>0.0010</i> <i>0.0002</i> <i>0.0021</i>	<i>M. obscurus</i>
<i>M. subterraneus</i>	—			
<i>M. daghestanicus</i>	0.0060 (1-0) 0.0049 (2-2) 0.0076 (1-0)	—		
<i>M. majori</i>	0.0080 (1-0) 0.0058 (3-3) 0.0148 (3-6)	0.0048 (1-0) 0.0050 (5-1) 0.0149 (4-6)	—	
<i>M. obscurus</i>	0.0112 0.0257 0.0241	0.0084 0.0251 0.0255	0.0102 0.0236 0.0227	—
<i>M. rossiaemeridionalis</i>	0.0145 0.0251 0.0200	0.0103 0.0262 0.0213	0.0121 0.0248 0.0167	0.0038 0.0118 0.0180

Примечания: в каждой ячейке таблицы верхнее значение соответствует фрагменту гена *IRBP* (807 п.н.), промежуточное значение – фрагменту гена *BRCA1* (1698 п.н.), нижнее значение – объединённой последовательности двух неперекрывающихся фрагментов гена *XIST* (998 п.н.). Количество фиксированных транзиций и трансверсий, соответственно, указано через дефис в скобках. Средние значения генетических дистанций, определённых в пределах каждого вида, представлены курсивом в верхней строке таблицы.

Полученные нами данные подтверждают высказанное нами ранее [29] предположение о том, что различия в паттернах генетической дифференциации каждого из видов подрода *Terricola* обусловлены, главным образом, разными экологическими предпочтениями этих видов. Так, у лесного вида *M. majori* при анализе митохондриальной ДНК и ядерного гена *XIST* нами выявлены две близкие внутривидовые формы, обитающие по разные стороны Большого Кавказского хребта. Весьма вероятно, что высокогорный Большой Кавказ был и остаётся серьёзным географическим барьером для распространения лесного вида *M. majori*, препятствуя в течение долгого времени миграциям и генетическому обмену между северокавказской и закавказской популяционными группировками. Хотя все исследованные нами особи *M. daghestanicus* принадлежали только к одной хромосомной форме ($2n = 54$), выборка этого вида отличалась высокой популяционной изменчивостью,

что, по-видимому, также обусловлено экологическими предпочтениями дагестанской полёвки, населяющей альпийские луга, но в данном случае роль изолирующего барьера принадлежала горным долинам, поросшим лесами (в противоположность *M. majori*). Обитание дагестанских полёвок в верхнем поясе гор создаёт все предпосылки для длительной изоляции популяций и интенсификации процессов формообразования, особенно в те периоды, когда лесной пояс был наиболее развит и простирался выше по горным склонам, например, в межледниковую рисс-вюрмскую (Riss-Würm) эпоху верхнего плейстоцена (около 130–115 тыс. лет назад) и атлантический период голоцена, около 8–4.5 тыс. лет назад. Аридизация и похолодание климата в верхнем плейстоцене, а также по завершении атлантического периода голоцена, наоборот, могли способствовать расширению субальпийского горного пояса за счёт сокращения лесных массивов и их смещения вниз по горным склонам, вплоть до долин. При таких условиях контакты между прежде разобщёнными популяциями *M. daghestanicus*, накопившими в своих генофондах ряд мутаций за время изоляции, могли восстановиться и обеспечить приток мигрантов с отличающимися генотипами. В сравнении с *M. daghestanicus* и *M. majori*, *M. subterraneus* экологически более пластичен, что позволило ему некогда заселить большую территорию и разнообразные ландшафты, как горные, так и равнинные. Однако впоследствии ареал подземной полёвки оказался раздробленным. С высокой вероятностью можно допустить, что "мозаичность" ареала в сочетании с сильным сокращением численности подземных полёвок в неблагоприятные климатические эпохи были важным фактором эволюции вида. Полученные нами результаты указывают на то, что *M. subterraneus* сформировался и переживал плейстоценовые оледенения в нескольких рефугиумах на юге Европы (Балканском полуострове) и в Малой Азии, так как именно эти популяции в наибольшей степени отличаются как друг от друга, так и от подземных полёвок Восточной Европы по гену *cytb*. Обеднённый генофонд и очень слабые популяционные различия подземных полёвок, населяющих Восточно-Европейскую равнину, указывают на то, что вид заселил эту территорию стремительно и в недавнем прошлом, вероятнее всего – в атлантический период голоцена, сопровождавшийся мощным развитием и распространением широколиственных лесов. Мы предполагаем, что изменчивость по числу хромосом в указанной части ареала возникла в результате деления одной пары метацентрических хромосом на две пары акроцентриков (а не в результате робертсоновского слияния, как считалось ранее) и быстрой фиксации этой перестройки в северных популяциях *M. subterraneus*.

Подраздел 2.3 Анализ генетического разнообразия белуги *Huso huso*.

Восстановление популяций исчезнувших видов должно осуществляться только на основе глубоких предварительных исследований текущего состояния вида в других частях ареала и оценки состояния и распределении разнообразия. Восстановление исчезнувшей адриатической популяции белуги *Huso huso*, вида, имеющего существенное экономическое значение, является приоритетным для разрабатываемых международных стратегий сохранения биоразнообразия. На основе анализа современного и древнего (использованы музейные образцы) генетического разнообразия белуги с использованием многофакторного подхода нами разработаны критерии для реинтродукции данного вида в реки Италии [30].

Изучена структура распределения генетического разнообразия сохранившихся популяций белуги, проведен генетический анализ гена *D-loop* мтДНК и 27 ядерных микросателлитов у 119 особей из 3 географических бассейнов (Азовского, Черного и Каспийского морей), также проведен геномный анализ 893 SNPs, определенных благодаря использованию рестриктного анализа 2b- Restriction site Associated DNA (2bRAD) [31, в модификации 32] в подгруппе из 92 образцов. Информация по вариабельности мтДНК также была использована для оценки изменчивости вымершей адриатической популяции путем анализа нескольких доступных музейных образцов.

Музейный образец из Адриатики, как показал анализ, значительно отличается от всех изученных современных образцов, что позволяет выдвинуть гипотезу о наличии в прошлом изолированной популяции. Данные изменчивости фрагментов мтДНК не позволили выявить какую-либо кластеризацию, соответствующую географическому распределению (рисунок 8). Вероятно, полученные результаты отражают глубокие палеогеографические изменения, произошедшие в изученных районах. Геномный подход позволил нам впервые показать с высокой поддержкой четкую генетическую дифференциацию между двумя областями (Черноморско-Азовским и Каспийским бассейнами), при этом микросателлитный анализ также выявил признаки дифференциации азовской выборки, возможно, связанные с исторической хозяйственной деятельностью в этой области.

Результаты исследования предоставили большой объем информации по генетической изменчивости белуги. Эти данные необходимо будет учитывать при создании маточного поголовья белуги *ex situ* и дальнейшей реинтродукции вида. Представленные рекомендации должны быть приняты за основу для предстоящего восстановления вымершей белуги, в частности, в Италии.

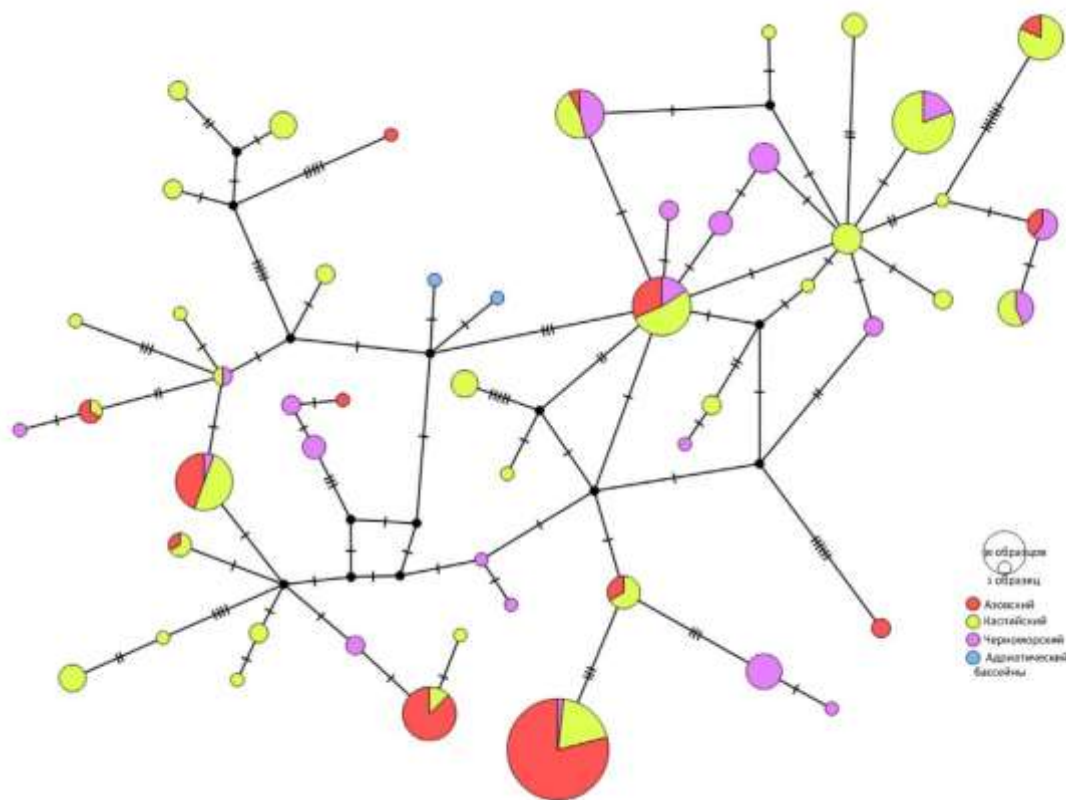


Рисунок 8 - Сеть гаплотипов, полученная с помощью программы PopART. Показывает взаимосвязь между гаплотипами, обнаруженными в выборке из современных популяций белуги и музейных образцов из бассейна Адриатического моря. Рассматривалась только общая часть выравнивания в 553 п.н. Размер круговых диаграмм пропорционален соответствующей частоте гаплотипов, а цвет указывает на географическое происхождение.

Подраздел 2.4 Адаптивная радиация пресноводных рыб рода *Garra*, Эфиопское нагорье

Долгое время считалось, что адаптивная радиация пресноводных рыб возможна только в озерной среде. Недавно несколько исследований показали, что реки и ручьи также предоставляют экологические возможности для адаптивной радиации пресноводных рыб. В данном исследовании показана адаптивная радиация шести экоморф ципринид рода *Garra* в реке, расположенной на Эфиопском нагорье в Восточной Африке [33]. *Garra* (>160 видов)- преимущественно высокоспециализированные водорослевые скребни, представители этого рода распространены от Юго-Восточной Азии до Западной Африки. В реке Соре (Эфиопское нагорье) впервые описана адаптивная фенотипическая диверсификация, выделены экоморфы, различающиеся по типу рта, морфологии сосательного диска, длине кишечника и форме тела. Обнаружены два новых фенотипа *Garra* ("толстогубый"- "thick-lipped" и "хищный"- "predator"), которые не были известны ранее. Анализ геномных данных свидетельствуют о монофилетической эволюции фенотипического разнообразия *Garra* с

признаками потока генов из других местных популяций (рисунок 9). Хотя симпатрические экоморфы отличаются генетически и могут считаться молодыми видами, о чем свидетельствуют данные по однонуклеотидному полиморфизму, филогенетическая реконструкция на основе изменчивости митохондриальной ДНК не позволила выявить какой-либо генетической структуры, свидетельствующей о недавнем и быстром видообразовании. Некоторые данные указывают на гибридное происхождение новой экоморфы "thick-lipped". Вероятно, предковая трофически высокоспециализированная линия быстро распространилась в речной среде, чему способствовала эволюция стратегий питания.

Эфиопское нагорье является "домом" для ряда молодых "букетов видов" рыб - известна мощная диверсификация для ципринид, 15 видов/морфотипов [34, 35], а также несколько небольших примеров диверсификаций для *Garra*, а именно три вида [36] и два вида *Enteromius* [37] описаны в озере Тана, и пять примеров адаптивных радиаций ципринид в реках, каждая из которых включает от четырех до семи видов [33, 38, 39], что подчеркивает важность этого региона как горячей точки для видообразования у рыб.

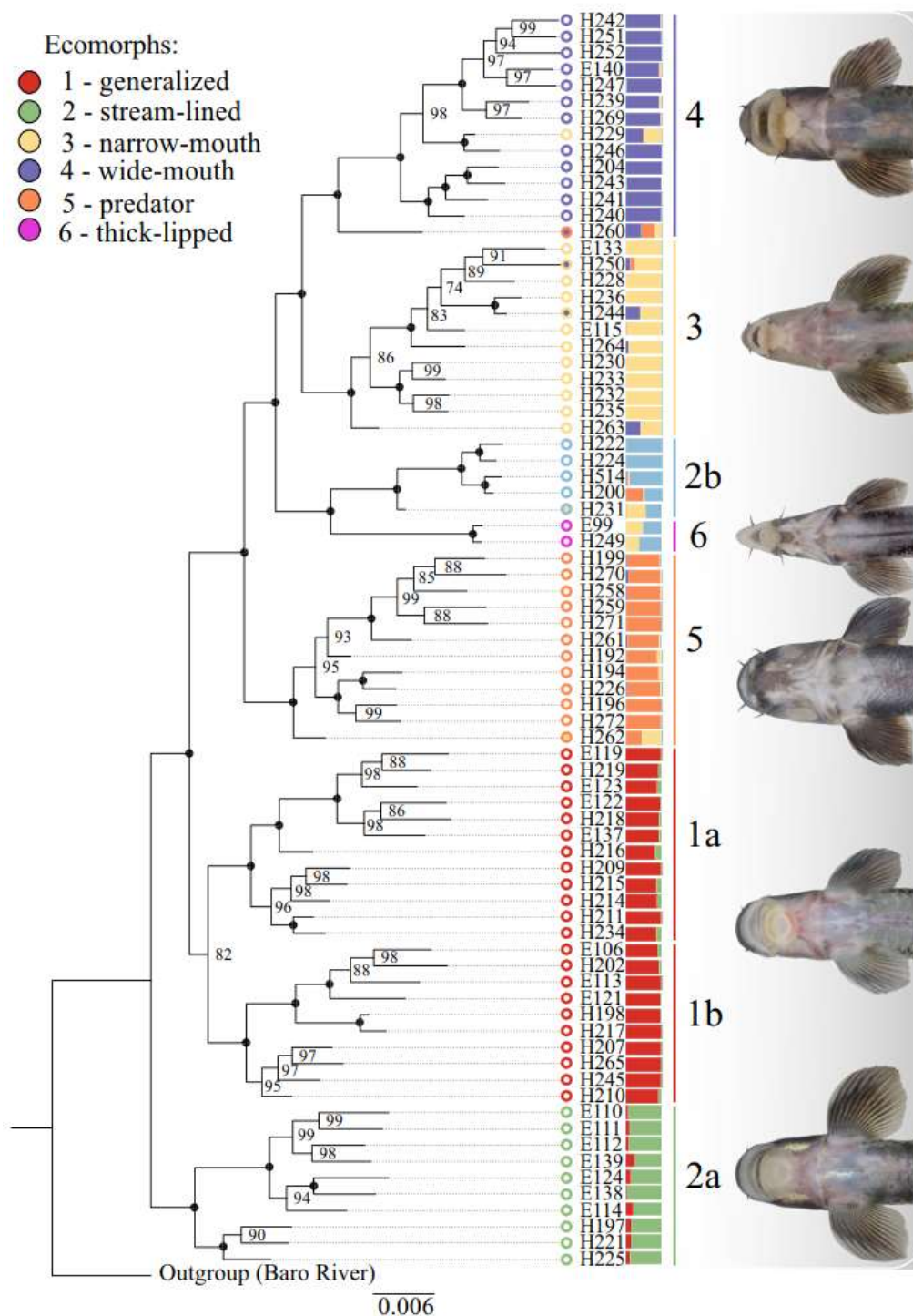


Рисунок 9 - ML-филогения симпатрических экоморф Гага из реки Соре на основе объединенных последовательностей RAD-локусов (7 370 локусов; 969 450 п.н.) Каждый локус рассматривался как отдельная партиция, использована модель GTR+G. Гетерозиготные сайты в пределах каждой особи кодировались с использованием обозначений IUPAC. Индивидуальные образцы окрашены в соответствии с цветовой схемой, а промежуточные (предполагаемые гибриды) фенотипы изображены другим цветом. Пропорции генетических кластеров, полученные с помощью анализа tmaverick, показаны справа от номеров образцов. Черные точки обозначают 100% бутстреп-поддержку.

Подраздел 2.5 Полные митохондриальные геномы представителей двух эндемичных семейств рыб (Perciformes: Cottoidei) озера Байкал

Озеро Байкал является идеальной природной лабораторией для изучения видообразования и адаптации к чрезвычайно контрастным условиям окружающей среды. Здесь обитает более 1500 эндемичных видов. Холодная и бедная питательными веществами вода, высокая насыщенность кислородом от поверхности до самого дна (1650 м), долгая и относительно стабильная палеографическая история озера привели к процветанию очень ограниченного числа эндемичных таксономических групп, в том числе малоизученные семейства рыб Cottocomphoridae и Abyssocottidae.

В результате исследования RNA-Seq, направленного на оценку адаптационной радиации байкальских видов рыб, мы собрали пять полных митохондриальных геномов четырех видов из двух эндемичных семейств: *Cottocomphorus grewingkii* (GB#MW732165, Voucher BK19-6), *Cottocomphorus inermis* (GB#MW732163, voucher BK19-8), и *Paracottus knerii* (GB#MW732164, voucher#19-7) из семейства Cottocomphoridae и два образца *Procottus major* (GB#MW732166, voucher#BK19-13 и MW732167, voucher#BK19-13) из семейства Abyssocottidae [40]. Данные биоинформатического анализа показали, что *Paracottus knerii* не образует монофилетической клады с другими видами из семейства Cottocomphoridae, что указывает на необходимость дальнейшего таксономического пересмотра этой загадочной группы (рисунок 10).

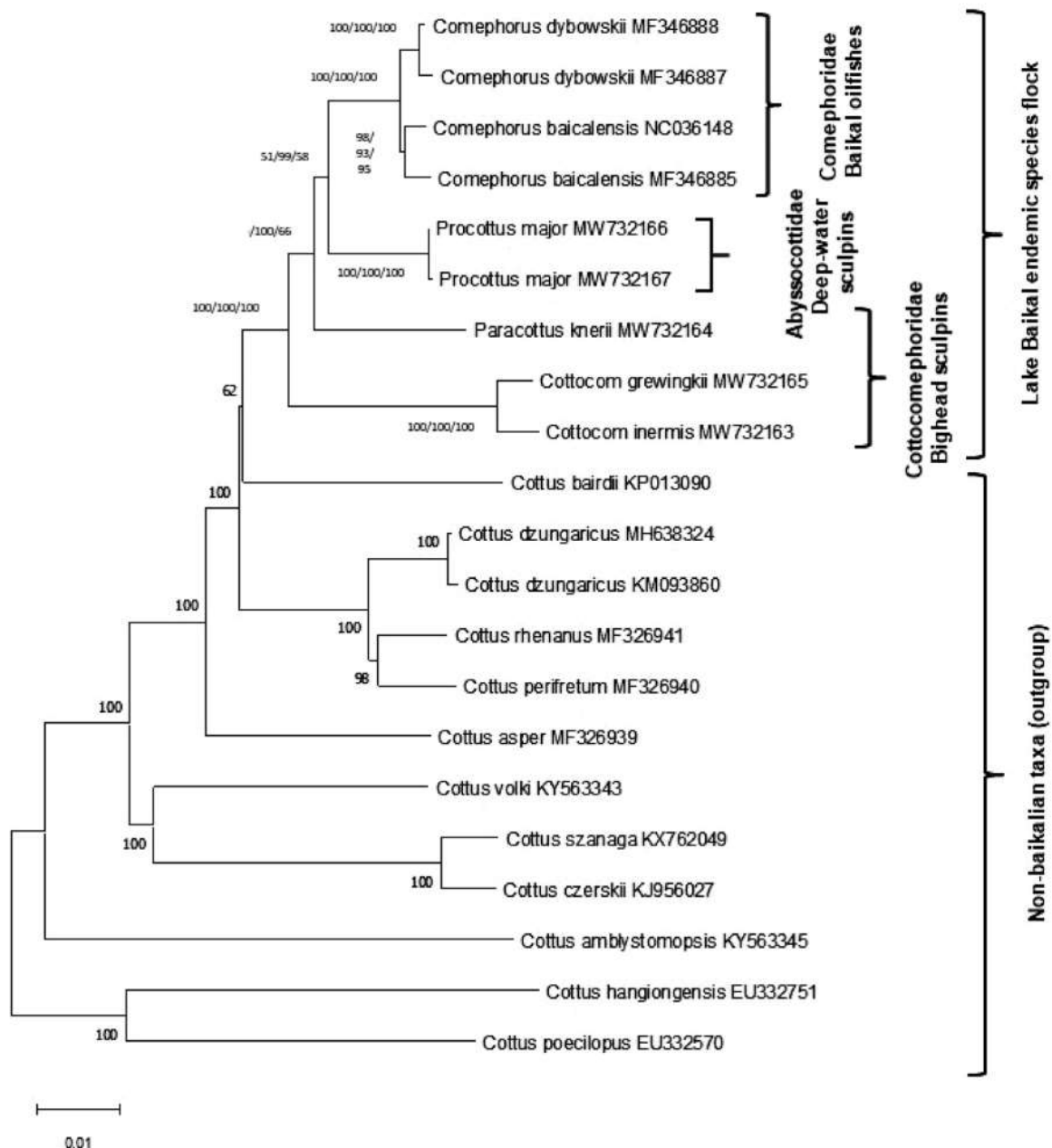


Рисунок 10 - Реконструкция филогенетических отношений байкальских видов рыб трех эндемичных семейств 12 близкородственных палеарктических видов рода *Cottus* species, ML (GTR þG þI модель), полные митогеномы
Указана бутстреп-поддержка ML/ME/MP для байкальских таксонов. Номера вновь полученных сиквенсов: MW732163-7.

Подраздел 2.6 Использование метабаркодирования для анализа структуры сообществ подземных членистоногих в условиях доминирования инвазивных видов растений

Инвазивные растения формируют новые экологические связи с местной биотой, которые могут влиять на почвенных животных. Золотарник гигантский (*Solidago gigantea* Aiton) из семейства Астровые (Asteraceae) произрастает в Северной Америке, но является инвазивным растением в других странах мира. Мы изучили сообщества подземных

членистоногих на участках произрастания инвазивного вида золотарника гигантского инвазивного *S. gigantea* и местной растительности на трех участках в Подмосковье [41]. Молекулярные методы позволяют быстро определить состав сообщества, но дают мало информации о численности почвенных животных и должны быть проверены классическими методами таксономии. Таким образом, мы определили почвенных членистоногих с помощью молекулярно-генетического анализа (метабаркодирование) и анализа морфологии. Число семейств членистоногих, идентифицированных двумя методами, было сопоставимым (53 и 56, соответственно), при этом наблюдалась значительная корреляция в количестве семейств, обнаруженных в отдельных образцах на основе морфологического и молекулярно-генетического (метабаркодирование) подходов. Структура сообщества подземных членистоногих слабо различалась между участками, где произрастал золотарник гигантский и контрольными участками. Эксперимент по пересадке золотарника гигантского был разработан для контроля случайных факторов, создающих специфические для участка различия. Через год численность и разнообразие почвенных членистоногих остались одинаковыми на участках с пересаженным золотарником гигантским и контрольных участках (рисунок 11), что позволило сделать вывод о том, что инвазивный вид, золотарник гигантский *S. gigantea*, не влияет на сообщества почвенных членистоногих в этом регионе.

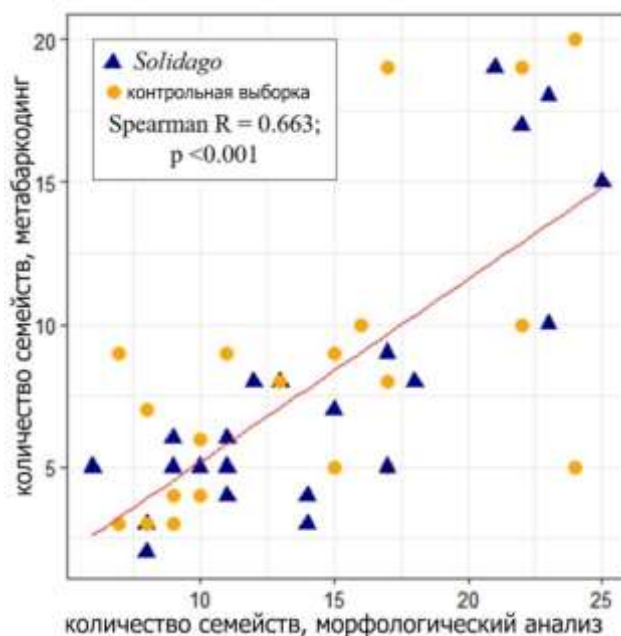


Рисунок 11 - Корреляция между количеством семейств членистоногих, обнаруженных в образцах почвы на участках произрастания золотарника гигантского и контрольных участках почвы с использованием морфологического анализа и метабаркодирования

Каждая точка представляет один образец. Линия тренда обозначает линейную регрессию.

Подраздел 2.7 Новый вид голожаберных моллюсков *Eubbranchus malakhovi* sp.n.

Впервые представлено комплексное исследование группы видов голожаберных моллюсков *Eubbranchus odhneri* - *Eubbranchus sanjuanensis* и описан новый вид *Eubbranchus malakhovi* sp.n. [42]. Несколько экземпляров, морфологически сходных с *E. sanjuanensis*, были собраны в Японском море (рисунок 12). Однако предварительные молекулярные данные показали, что они ближе к арктическому виду *E. odhneri*. Для нашего анализа мы получили новые данные по генам митохондриальной ДНК, COI и 16S рРНК, а также ядерным маркерам (гистон H3 и 18S рРНК) для реконструкции филогении данной группы голожаберных моллюсков с применением методов Байесовского анализа и Максимального правдоподобия, анализов молекулярного разделения видов ASAP, bPTP и GMYC и оценки времен дивергенций предполагаемых видов. Также были изучены морфологические и экологические особенности, включая внешнюю морфологию, окраску, морфологию челюстей, радулы и половой системы, а также тонкое строение кнidosаков и определение пищевых предпочтений. Наши результаты показывают (рисунок 13), что особи из Японского моря представляют собой новый вид *Eubbranchus malakhovi* sp.n. Данный вид отличается как по морфологическим, так и по молекулярным данным от арктического вида *E. odhneri* и *E. sanjuanensis*, обитающего в северо-восточной части Тихого Океана. Новый вид филогенетически близок к виду *E. odhneri*, различия по митохондриальной ДНК между ними невелики, и по нашим оценкам время дивергенции данных видов составляет примерно 1,5 млн. лет.

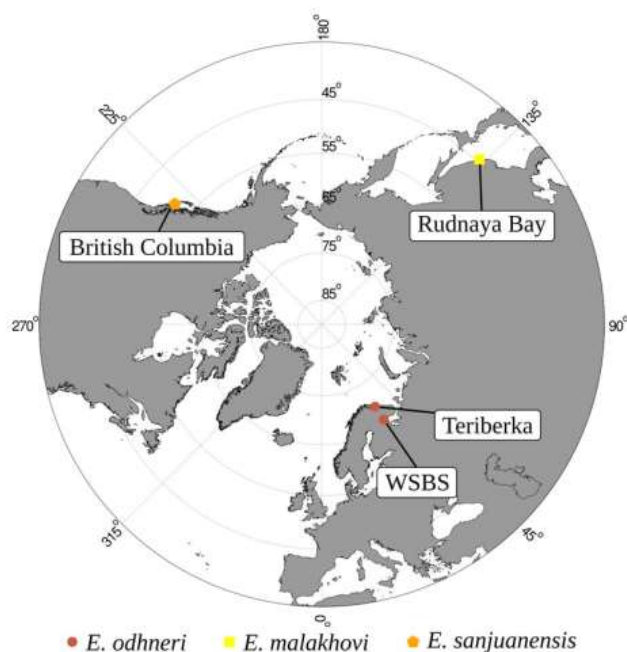


Рисунок 12 - Карта распространения изученных видов голожаберных моллюсков, включая новый вид *Eubbranchus malakhovi* (по [42])

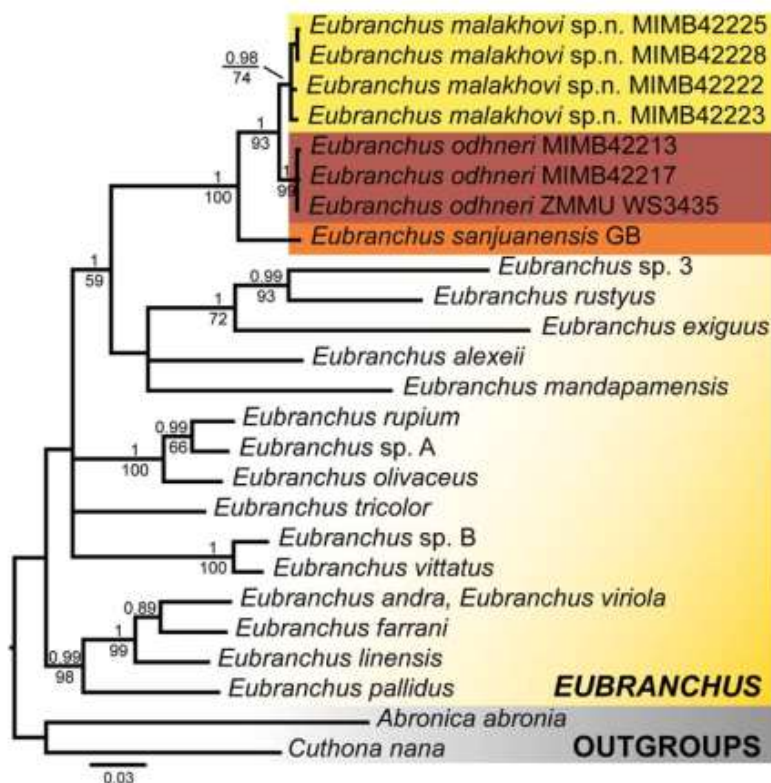


Рисунок 13 - Реконструкция молекулярно-филогенетических отношений рода *Eubranthus*, построенная по данным комбинированного датасета (COI + 16S + H3 + 18S) с применением Байесовского анализа

Аутгруппы и клады видового уровня, за исключением исследуемых видов, сколлапсированы до одной особи на вид. *Eubranthus andra* и *Eubranthus viriola* не образуют два монофилетических юнита и показаны в составе единой клады. Цифры над ветвями обозначают апостериорные вероятности (PP) Байесовского анализа, цифры под ветвями — бутстреп-поддержки (BS) метода Максимального правдоподобия. Показаны только значения PP > 0,9 и BS > 60.

Подраздел 2.8 Изучение фауны насекомых после лесных пожаров с помощью кроновых ловушек в лесах европейской России

Среди происходящих в последние годы негативных явлений, вызванных изменениями климата, особое место занимают лесные пожары, наносящие большой ущерб как в России, так и во многих других странах. Лесные пожары значительно влияют на лесные экосистемы, но данных о состоянии сообществ насекомых и их биоразнообразии в этих экосистемах после пожаров недостаточно. Было проведено комплексное исследование на охраняемой территории Мордовского государственного заповедника (рисунок 14), считающегося региональным центром биоразнообразия насекомых в Мордовии [43]. Насекомых собирали ловушками на неповрежденных (несгоревших, контроль) и поврежденных (сгоревших в 2010 году) участках леса и сравнили альфа-разнообразие между ними. Двукрылые оказались вторым по численности видов отрядом насекомых

(собраны 54 вида), причем дрозофилиды (сем. Drosophilidae) среди них заняли первое место – 15 видов. В результате установлено, что на девятый год после повреждения леса огнем низкой интенсивности, разнообразие насекомых вернулось к уровню, аналогичному уровню на контрольных (несгоревших) участках.

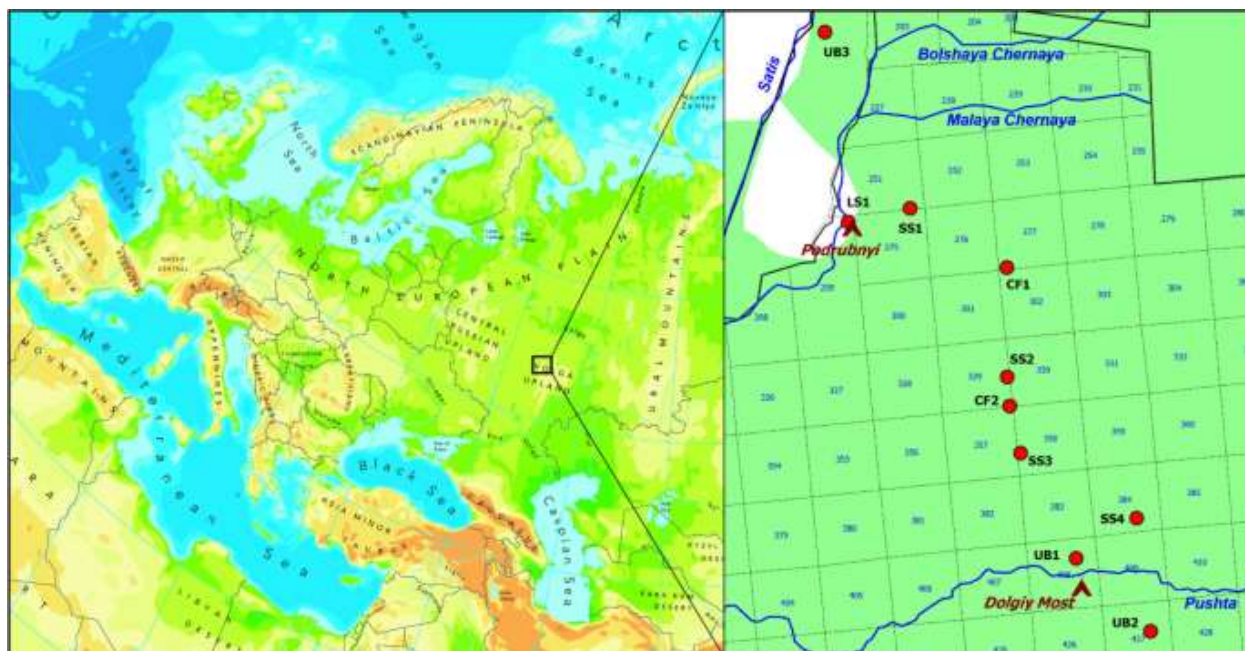


Рисунок 14 - Географическое положение Мордовского государственного заповедника на карте Европы и места сбора насекомых на территории заповедника

Подраздел 2.9 Таксономическая ревизия рода *Cuthonella* голожаберных моллюсков с описанием семи новых видов

Cuthonella Bergh, 1884 - одна из наиболее забытых групп голожаберных моллюсков, долгое время включавшая в свой состав виды, в настоящий момент относящиеся к другим родам эолидообразных. Из-за преимущественно арктического распространения виды данного рода трудно найти, собрать и описать. В данной работе [44] проведена таксономическая ревизия рода на основании молекулярных и морфологических данных. Образцы рода *Cuthonella* были секвенированы по митохондриальным генам первой субъединицы цитохром-с оксидазы (*COI*) и 16S рРНК, а также ядерным генам *Histone 3 (H3)* и 28S рРНК (домен C1-C2) (рисунок 15).

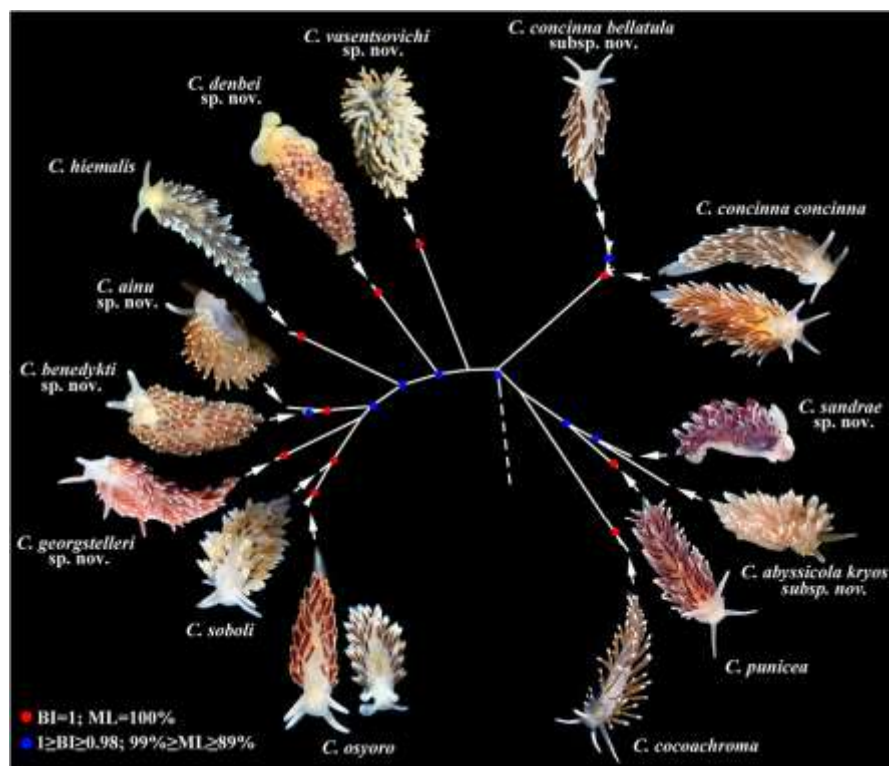


Рисунок 15 - Филогенетические отношения *Cuthonella* на основе конкатенированного набора данных *COI* + *16S* + *H3* + *28S*, полученного с помощью байесовского вывода (bi), на радиальной компоновке дерева. Апостериорные вероятности от значений bi и бутстрапа для максимального правдоподобия (мл) указаны на рисунке. Виды *Cuthonella* изображены на дереве.

Материал основан на обширной географической выборке по всему Северному полушарию. Особое внимание уделяется Курильским островам - очагу разнообразия этого рода. Описаны семь новых видов и два подвида *Cuthonella* из арктических и северных регионов Тихого океана. Таким образом, количество видов *Cuthonella* увеличилось более чем в три раза и теперь включает 15 видов плюс два подвида вместо пяти видов (рисунок 16).

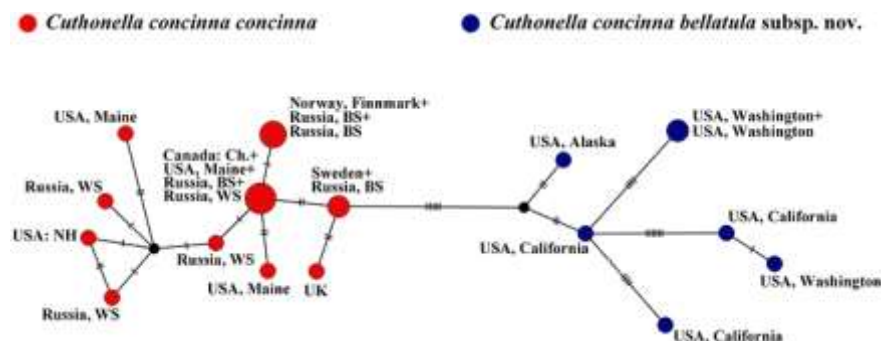


Рисунок 16 - Сеть гаплотипов, основанная на молекулярных данных *COI*, показывающих генетические мутации, происходящие внутри *Cuthonella concinna concinna* (красные кружки) и *Cuthonella concinna bellatula* (синие кружки) виды

Сокращения: BS: Barents Sea; Ch: Churchill (Canada); NH: New Hampshire; UK: United Kingdom; WS: White Sea.

Эта работа является наиболее существенным обновлением рода *Cuthonella* с момента его описания в 1884 году. Чтобы очертить таксономические и филогенетические границы *Cuthonella*-like aeolidaceans, представлена молекулярная филогения более широких традиционных «тергипедид» и показано, что *Cuthonella*-like aeolidaceans образуют отчетливую молекулярную кладу, как семейство *Cuthonellidae* Miller, 1977, подтвержденную надежными морфологическими апоморфиями (рисунок 17).

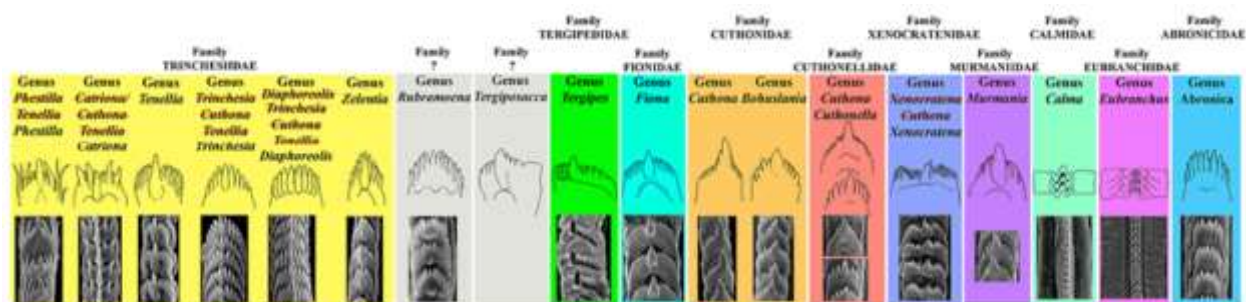


Рисунок 17 - Современная мелкомасштабная систематика тергипедид, которая объединяет молекулярные данные и обеспечивает морфологические апоморфии для нескольких отдельных семейств и родов

Вычеркнутые названия таксонов означают изменение статуса рода, обычно отображаемые названия означают действительные таксоны

Заключение

Все результаты получены нами впервые и опубликованы в рейтинговых журналах. Проведенный анализ позволил не только уточнить филогенетические отношения для ряда групп, таких как полевки или суслики, но и предоставить рекомендации по реинтродукции хозяйственно важных осетровых, а именно белуги. Также показана роль инвазивных видов растений в формировании почвенных сообществ насекомых, восстановление энтомофауны после пожаров. Описание новых видов голожаберных моллюсков - яркий пример необходимости использования современных молекулярно-генетических подходов в таксономических исследованиях.

Список использованных источников

20. Титов С.В., Ермаков О.А., Сурин В.Л. и др. Молекулярно-генетическая и биоакустическая диагностика больших (*Spermophilus major* Pallas, 1778) и желтых (*S. fulvus* Lichtenstein, 1823) сусликов из совместного поселения // Бюл. МОИП. Отд. биол. - 2005. - Т. 110. - № 4. - С. 72–77.
21. Спиридонова Л.Н., Челомина Г.Н., Тсуда К. и др. Генетические свидетельства обширной интрогрессии генов короткохвостого суслика в зоне гибридизации *Spermophilus major* и *S. erythrogenys*: данные секвенирования гена цитохрома b мтДНК // Генетика. - 2006. - Т. - 42. - № 7. - С. 976–984. - Spiridonova L.N., Chelomina G.N., Tsuda K. et al. Genetic evidence of extensive introgression of short-tailed ground squirrel genes in a hybridization zone of *Spermophilus major* and *S. erythrogenys*, inferred from sequencing of the mtDNA cytochrome b gene // Rus. J. Gen. - 2006. - Vol. 42. - № 7. - P. 802–809.
22. Ermakov O.A., Simonov E.P., Surin V.L., Titov S.V., Brandler O.V., Ivanova N.V., Borisenko A.V. Implications of hybridization, NUMTs, and overlooked diversity for DNA barcoding of Eurasian ground squirrels // PLoS ONE. - 2015. - Vol. 10. - № 1 e0117201. DOI: 10.1371/journal.pone.0117201.
23. **Брандлер О.В., Тухбатуллин А.Р., Капустина С.Ю., Щепетов Д.М., Титов С.В., Ермаков О.А.** Изменчивость контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография большого суслика (*Spermophilus major*, Sciuridae, Rodentia) // Генетика. – 2021. – Т. 57. – № 7. – С. 820–831. DOI: 10.31857/S0016675821070055. – R. – Brandler O.V., Tukhbatullin A.R., Kapustina S.Y., Schepetov D.M., Titov S.V., Ermakov O.A. Variability of Mitochondrial DNA Control Region and Phylogeography of Russet Ground Squirrel (*Spermophilus major*, Sciuridae, Rodentia)// Russian Journal of Genetics. – 2021. – Vol. 57. – Is. 7. – P. 825-835. DOI: 10.1134/S102279542107005X.
24. Ермаков О.А., Сурин В.Л., Титов С.В. Генетическая изменчивость и дифференциация крапчатого суслика по данным секвенирования контрольного региона мтДНК // Известия ПГПУ. Естественные науки. - 2011. - № 25. - С. 176–180.
25. Брандлер О.В., Бирюк И.Ю., Ермаков О.А., Титов С.В., Сурин В.Л., Кораблев В.П., Токарский В.А. Межвидовая и внутривидовая молекулярно-генетическая изменчивость и дифференциация у крапчатых сусликов *Spermophilus suslicus* и *S. odessanus* (Rodentia, Sciuridae, Marmotini) // Вестн. Харьковского нац. унив. им. В.Н. Каразина. Сер. биол. - 2015. - Вып. 24 (№ 1153). - С. 58–67.
26. Ермаков О.А., Симонов Е.П., Сурин В.Л., Титов С.В. Внутривидовой полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография малого суслика (*Spermophilus pygmaeus*, Sciuridae, Rodentia) // Генетика. - 2018. - Т. 54. - № 11. - С.

1316-1326. - Ermakov O.A., Simonov E.P., Surin V.L. Titov S.V. Intraspecific Polymorphism of the Mitochondrial DNA Control Region and Phylogeography of Little Ground Squirrel (*Spermophilus pygmaeus*, Sciuridae, Rodentia) // Rus. J. Gen. - 2018. - Vol. 54. - № 11. - P. 1332–1341. DOI: 10.1134/S1022795418110042.

27. Ермаков О.А., Титов С.В., Савинецкий А.Б., Сурин В.Л., Зборовский С.С., Ляпунова Е.А., Брандлер О.В., Формозов Н.А. Молекулярно-генетические и палеоэкологические аргументы в пользу конспецифичности малого (*Spermophilus pygmaeus*) и горного (*Spermophilus musicus*) сусликов // Зоол. журн. - 2006. - Т. 85. - № 12. С. 1474–1483.

28. Bogdanov A.S., Khlyap L.A., Kefelioglu H., Selcuk A.Y., Stakheev V.V., Baskevich M.I. High molecular variability in three pine vole species of the subgenus *Terricola* (*Microtus*, Arvicolinae) and plausible source of polymorphism // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. - 2021. DOI: 10.1111/jzs.12539.

29. Богданов А.С., Хляп Л.А., Баскевич М.И. Дифференциация и филогенетические связи трех видов полевок подрода *Terricola* (Rodentia, Arvicolinae, *Microtus*): результаты анализа фрагментов ядерных генов *BRCA1* и *XIST* // Известия РАН. Серия биологическая. - 2020. - № 6. - С. 575–580.

30. Boscari E., Marino I.A.M., Caruso C., Gessner J., Lari M., Mugue N., Barmintseva A., Suci R., Onara D., Zane L., Congiu L. Defining criteria for the reintroduction of locally extinct populations based on contemporary and ancient genetic diversity: The case of the Adriatic Beluga sturgeon (*Huso huso*) // Diversity and Distributions. - 2021. DOI: 10.1111/ddi.13230.

31. Wang, P., Meyer, E., McKay, J. K., Matz, M. V. (2012). 2b-RAD: A simple and flexible method for genome-wide genotyping // Nature Methods. - № 9. - P. 808–810. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2023>

32. Boscari E., Abbiati M., Badalamenti F., et al. A population genomics insight by 2b-RAD reveals populations' uniqueness along the Italian coastline in *Leptopsammia pruvoti* (Scleractinia, Dendrophylliidae) // Diversity and Distributions. - 2019. № 25. - P. 2001–2017. <https://doi.org/10.1111/ddi.12918>

33. Levin B., Simonov E., Franchini P., Mugue N., Golubtsov A., Meyer A. Rapid adaptive radiation in a hillstream cyprinid fish in the East African White Nile River basin // Molecular Ecology. - 2021. - Vol. 30. DOI: 10.1111/mec.16130

34. Mina M. V., Mironovsky A. N., Dgebuadze Y. Lake Tana large barbs: phenetics, growth and diversification // Journal of Fish Biology. - 1996. - Vol. 48(3). - P. 383–404. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01435.x>

35. Nagelkerke L. A., Sibbing F. A., van den Boogaart J. G., Lammens E. H., Osse J. W. The barbs (*Barbus* spp.) of Lake Tana: a forgotten species flock? // *Environmental Biology of Fishes*. - 1994. - Vol. 39(1). - P. 1–22.
36. Stiassny M. L. J., Getahun, A. An overview of labeonin relationships and the phylogenetic placement of the Afro-Asian genus *Garra* Hamilton, 1822 (Teleostei: Cyprinidae), with the description of five new species of *Garra* from Ethiopia, and a key to all African species // *Zoological Journal of the Linnean Society*. - 2007. - Vol. 150. - P. 41–83. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2007.00281.x>
37. de Graaf M., Megens H. J., Samallo J., Sibbing F. Preliminary insight into the age and origin of the *Labeobarbus* fish species flock from Lake Tana (Ethiopia) using the mtDNA cytochrome b gene // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. - 2010. - Vol. 54(2). - P. 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.029>
38. Mina M. V., Levin B. A., Mironovsky A. N. On the possibility of using character estimates obtained by different operators in morphometric studies of fish // *Journal of Ichthyology*. - 2005. - Vol. 45(4). - P. 284–294.
39. Golubtsov A. S., Korostelev N. B., Levin, B. A. Monsters with a shortened vertebral column: A population phenomenon in radiating fish *Labeobarbus* (Cyprinidae) // *PLoS One*. - 2021. - Vol. 16(1) – e0239639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239639>
40. Mugue N., Barmintseva A., Etingova A., Didorenko S., Selifanova M., Mugue L., Popov A., Bulakhov A., Kupchinskiy A. Complete mitochondrial genomes of representatives of two endemic sculpin families (Perciformes: Cottoidei) from Baikal - the world's largest and deepest lake//*Mitochondrial DNA Part B-resources*. 2021. Vol. 6. Is. 11. P. 3190-3192. <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23802359.2021.1989330>>DOI: 10.1080/23802359.2021.1989330
41. Ustinova E.N., Schepetov D.M., Lysenkov S.N., Tiunov A.V. Soil arthropod communities are not affected by invasive *Solidago gigantea* Aiton (Asteraceae), based on morphology and metabarcoding analyses//*Soil Biology and Biochemistry*. - 2021. - Vol. 159. - Art. no 108288. DOI: 10.1016/j.soilbio.2021.108288.
42. Ekimova I.A., Mikhlina A.L., Vorobyeva O.A., Antokhina T.I., Tambovtseva V.G., Schepetov D.M.2 Young but distinct: description of *Eubranhus malakhovi* sp. n. a new, recently diverged Nudibranch species (Gastropoda: Heterobranchia) from the Sea of Japan. 2021//*Invertebrate Zoology*. – 2021. – Vol. 18. – Is. 3. – P. 197–222. DOI: 10.15298/invertzool.18.3.02. – S.
43. Ruchin A.B., Egorov L.V., MacGowan I., Makarkin V.N., Antropov A.V., Gornostaev N.G., Khapugin A.A., Dvorak L., Esin M.N. Post-fire insect fauna explored by crown

fermental traps in forests of the European Russia // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – Is. 1. – Art. no. 21334. DOI: 10.1038/s41598-021-00816-3. – Q1.

44. Korshunova T.A.1, Sanamyan N.P., Sanamyan K.E., Bakken T., Lundin K., Fletcher K., Martynov A.V. Biodiversity hotspot in cold waters: a review of the genus *Cuthonella* with descriptions of seven new species (Mollusca, Nudibranchia)// Contributions to Zoology. – 2021. – Vol. 90. – Is. 2. – P. 216-283. DOI: 10.1163/18759866-BJA10017.

РАЗДЕЛ 3 ИЗУЧЕНИЕ ЭВОЛЮЦИИ СИСТЕМ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА В РАЗЛИЧНЫХ ГРУППАХ ЖИВОТНЫХ

Введение

Половое размножение характерно практически для всех видов эукариот, за немногими исключениями, например, у некоторых ракообразных рода *Daphnia* также большое значение имеет бесполое размножение. Эволюция полового размножения сопряжена с формированием фактора детерминации пола, его появление ведет к возникновению половых хромосом, согласно классической гипотезе С. Оно [45]. Изменение профиля рекомбинации и деградация половых хромосом - два сопряженных явления. Вместе с тем изучение этих процессов на ограниченном числе модельных видов приводит к упрощенному видению эволюции детерминации пола. Нами выбраны необычные объекты, каждый из которых уникален по-своему. Слепушонки рода *Ellobius* имеют изоморфные половые хромосомы, нами в течение длительного времени проводится анализ как структуры половых хромосом, так и особенностей их синапсиса и рекомбинации в мейозе. В группе лесных мышей описаны добавочные, В-хромосомы, но природа генетического материала этих структур остается загадкой. У ракообразных *Daphnia magna*, модельного вида при изучении эволюции перехода от средового к генетическому определению пола, исследована зависимость репродуктивного успеха самцов и самок от соотношения полов.

Методы

Использованы клоны (партеногенетические потомки одной самки) дафний из лабораторной коллекции лаб. эволюции генома и механизмов видообразования ИБР РАН. и образцы Объединенной коллекции тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований ИБР РАН. Проведение процедур получения распластанных препаратов СК и иммуноцитохимического окрашивания препаратов детально описано нами ранее [46]. Осевые элементы хромосом и латеральные элементы синаптонемного комплекса идентифицировали с помощью антител против белка SCP3, центромеры выявляли с помощью антител против белка кинетохора CENP-A, участки транскрипционного сайленсинга хроматина выявляли с помощью антител к гистону γ H2AX. Анализ добавочных В-хромосом проводился посредством флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) нескольких библиотек зондов с метафазными хромосомами, а также с интерфазными хромосомами внутри клеточных ядер. Зонды были получены с помощью DOP-PCR с вырожденными праймерами из механически диссектированных прицентромерного гетерохроматического района одной из крупных аутосом (зонд

PCRAflaCEN), а также нескольких целых В-хромосом (В-специфичные зонды WCP24985aB, WCP24985bB, WCP3727B, WCP3980B, WCP3977B, WCP26368B) из кариотипов желтогорлых мышей.

Результаты и обсуждение

Подраздел 3.1 Формирование нео-У у млекопитающих с изоморфными XX половыми хромосомами

Определение пола у млекопитающих обычно обеспечивается парой хромосом, XX у самок и XY у самцов. Слепушонки рода *Ellobius* являются исключением из этого правила. У *Ellobius tancrei* и самцы, и самки имеют пару XX хромосом, которые неотличимы друг от друга в соматических клетках. Тем не менее, в нескольких исследованиях на *Ellobius* ранее нами было показано, что две изоморфные X хромосомы самцов демонстрируют различное поведение во время мейоза. Такие данные были получены для *E. talpinus* [46], *E. tancrei* [47], *E. alaicus* [48]. Только для одного вида, *E. talpinus* [46] был продемонстрирован женский мейоз и показан полный синансис изоморфных половых XX хромосом у самок, а также формирование "букета" хромосом в ранней профазе мейоза I. Пока еще не доказано, проявляются ли эти различия также в мейозе самок других видов этого рода. Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели сравнительное исследование синапсиса хромосом, рекомбинации и модификации гистонов во время мужского и женского мейоза у *E. tancrei* [49]. Мы подтвердили, что синапсис между двумя X-хромосомами ограничен короткими дистальными (теломерными) областями хромосом у самцов, т.е. центральная область остается полностью несинапсированной. Также во время мужского мейоза наблюдаются структурные изменения одной из X-хромосом, осевой элемент которой выглядит фрагментированным, накапливает H3K9me₃, и ассоциирует со специфическим половым тельцем, которое, в свою очередь, накапливает эпигенетические метки и белки SUMO-1 и центромерные белки, тогда как другие белки (H3K4me, ubiH2A и γH2AX) отсутствуют. Оказалось, что в женском мейозе *E. tancrei* синапсис половых хромосом задерживается, оставляя центральную область несинапсированной в ранней пахитене. Этот регион накапливает γH2AX вплоть до стадии завершения синапсиса. Однако, в отличие от мейоза самцов *E. tancrei*, у самок ни в одной из двух X-хромосом не обнаружены какие-либо структурные или эпигенетические различия изоморфных половых хромосом. У *E. talpinus* ранее мы также не обнаружили различий для XX самок [46]. Наконец, мы наблюдали, что рекомбинация в половых хромосомах ограничена у обоих полов. Центральная область X-хромосомы у самок также лишена локусов MLH1, что свидетельствует об отсутствии рекомбинации в этой зоне (рисунок 18). Это существенное отличие от других видов

млекопитающих. У самцов локусы MLH1, сопряженные с кроссинговером, расположены исключительно в дистальных районах, отсутствие рекомбинации между половыми хромосомами, согласно классической работе С. Оно [45] характерно для начальных этапов дифференциации половых хромосом, т.е. формирование нео-Y.

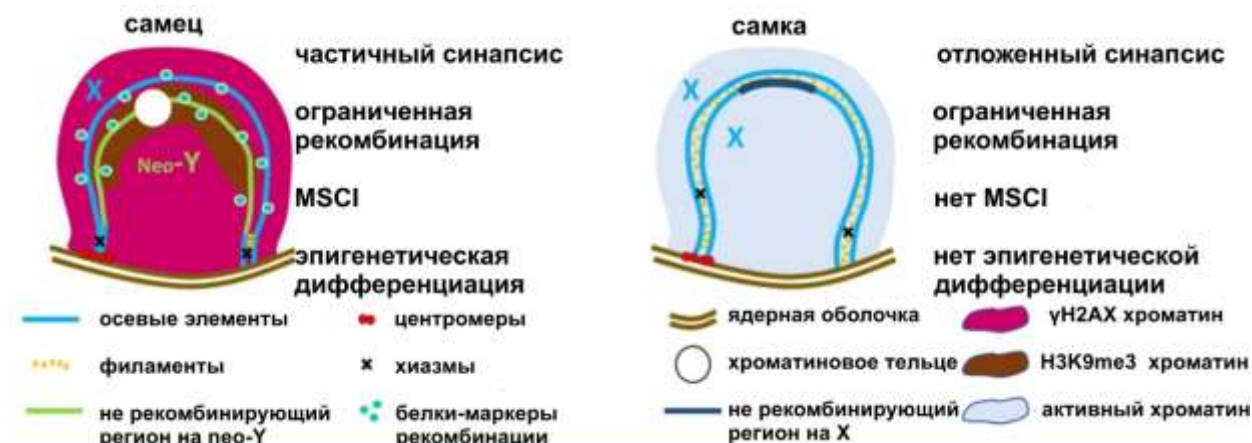


Рисунок 18 - Схема различий половых хромосом во время мужского и женского мейоза у *E. tancrei*

У самцов интерстициальные области остаются несинапсированными. Поскольку рекомбинация отсутствует, можно предположить, что эти регионы, находясь в процессе дивергенции. Обе X хромосомы включены в неактивную хроматиновую массу (окрашенную розовым) в результате MSCI. На одной X-хромосоме видны характерные эпигенетические метки (накопление H3K9me3, окрашено в коричневый цвет) и ассоциацией с хроматиновым тельцем (изображено в виде белого круга). Эта хромосома, вероятно, испытывает процесс дифференциации, обозначена как предполагаемая нео-Y хромосома. У самок наблюдается полный синапсис X-хромосом, хотя и с задержкой, и рекомбинация происходит вдоль всего бивалента, за исключением центрального сегмента (изображенного темно-синим цветом) хромосомы. После завершения синапсиса MSCI не обнаруживается, и не наблюдается эпигенетической дифференциации ни одной из половых хромосом.

Важно подчеркнуть, что в отличие от представлений С. Оно, в данной группе видов нео-Y возникает не из аутосомы, его предшественником является X хромосома. Эти результаты предоставляют новый материал для развития концепций о происхождении и эволюции половых хромосом, одна из которых была сформулирована в данной работе.

Подраздел 3.2 Киназа CDK2 в профазе I мейоза млекопитающих: скрининг гетеро- и гомоморфных половых хромосом

Циклин-зависимые киназы (CDK) являются важнейшими регуляторами клеточного цикла эукариот. Критическая роль CDK2 в прогрессии мейоза ранее была продемонстрирована на единственном виде млекопитающих - мыши. В данном исследовании [50] мы использовали иммуноцитохимический метод для изучения

локализации CDK2 во время мейоза у семи видов грызунов, обладающих гетеро- и гомоморфными мужскими половыми хромосомами. Для сравнения распределения CDK2 в XY и XX мужских половых хромосомах мы провели дополнительно многораундовое иммуоокрашивание подобранных маркерных белков в мейотических хромосомах лабораторной крысы и трех видов слепушонок.

Были использованы антитела к следующим белкам: RAD51, маркер репарации двуцепочечной ДНК; MLH1, компонент системы mismatch-репарации ДНК; SUN1, один из компонентов сложной системы соединения теломерных участков хромосом и ядерной оболочки, белок синаптомембранного комплекса SYCP3 и маркер кинетохора CREST. Используя усовершенствованный протокол, мы смогли оценить распределение четырех отдельных белков в одной мейотической клетке. Мы показали, что во время профазы I CDK2 локализуется в теломерных и интерстициальных областях аутосом у всех 7 изученных видов животных (крысы, обыкновенные полевки, хомяки, слепыши и три вида слепушонок) (рисунок 19).

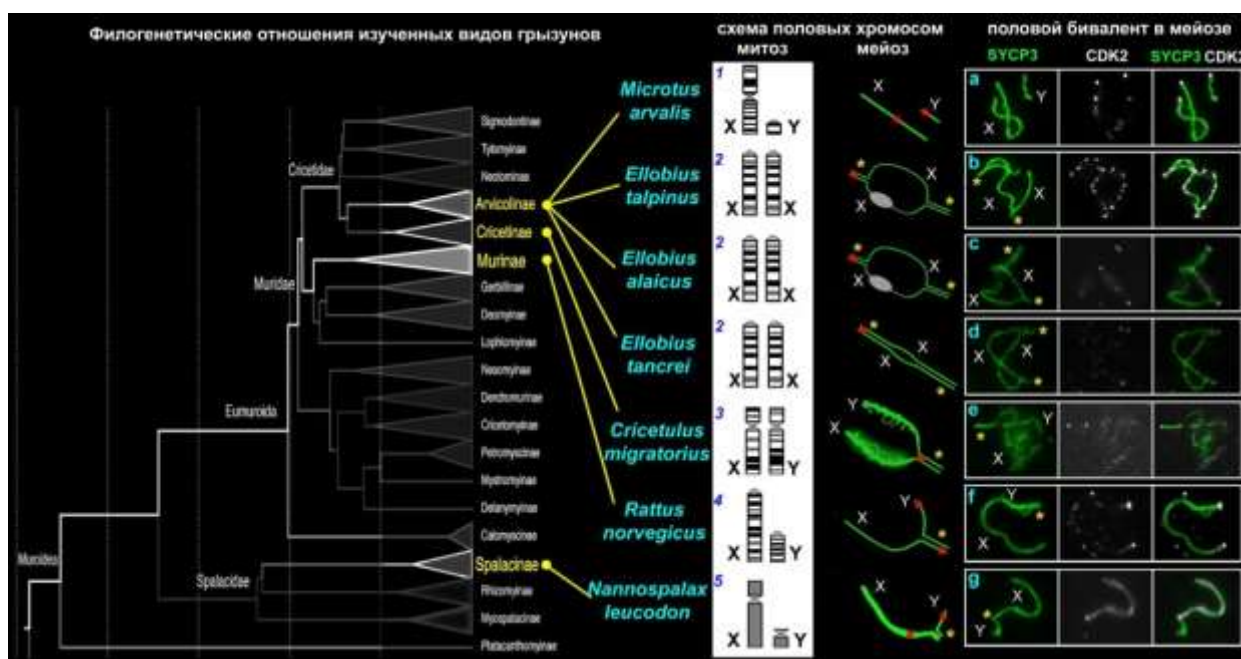


Рисунок 19 - Схема филогенетических отношений изученных видов грызунов, особенностей морфологии половых хромосом и их поведения в профазе мейоза I

Показано, что в профазе I мейоза сигналы CDK2 распределялись в трех различных режимах. В биваленте XY у крысы и слепыша, мы обнаружили многочисленные сигналы CDK2 в асинаптических областях и единичный CDK2 фокус на синаптических сегментах, аналогично половым хромосомам мыши. У слепушонок, имеющих уникальные XX половые хромосомы у самцов, сигналы CDK2, тем не менее, были распределены примерно так же, как на половом биваленте XY крысы. У полевок половые хромосомы не

синаптировали, но демонстрировали сигналы CDK2 сигналы различной интенсивности, аналогичные X и Y хромосомам крысы. У самок слепушонок XX бивалент имел CDK2 картину, сходную с аутосомами всех видов. У хомяка сигналы CDK2 были обнаружены в теломерных областях в коротком синаптическом сегменте полового бивалента. Мы обнаружили, что сигналы CDK2 сигналы колокализуются с сигналами SUN1 и MLH1 в мейотических хромосомах у крыс и слепушонок, аналогично мышам. Различие в проявлении CDK2 на половых хромосомах профазы I можно рассматривать как пример быстрой эволюции хромосом у млекопитающих.

Подраздел 3.3 Добавочные В-хромосомы и их гомология с фрагментами половых хромосом у желтогорлых мышей

Несмотря на активные исследования в последнее время генного состава, функции и эволюции добавочных (В-) хромосом у разных видов животных, эти дополнительные элементы генома по-прежнему остаются загадочными. Целью настоящей работы [51] было изучение структуры и пространственного расположения (двух- и трёхмерного) В-хромосом в интерфазных ядрах клеток костного мозга и фибробластов желтогорлых мышей *Apodemus flavicollis* из ряда пунктов Южной и Восточной Европы.

FISH с В-специфическими зондами выявила сигналы на В-хромосомах, а также в прицентромерных районах половых хромосом и в теломерных районах четырёх мелких аутосом всех желтогорлых мышей, вовлечённых в анализ, несмотря на существенную удалённость пунктов их отлова (рисунок 20, 21). Тем не менее, отмечена изменчивость интенсивности FISH-сигнала на Y-хромосомах у разных особей (рисунок 21). FISH с зондом PCRAflaCEN во всех случаях выявила отчётливые сигналы разного размера в прицентромерных гетерохроматических районах аутосом и половых хромосом (также с изменчивой интенсивностью сигнала на Y-хромосомах разных особей), а также в теломерных районах двух пар мелких аутосом и В-хромосом (рисунок 22). Одновременное использование зондов обоих типов (то есть зонда PCRAflaCEN и одного из В-специфичных зондов) показало, что в прицентромерном участке половых хромосом различимы две частично перекрывающиеся зоны: сегмент, расположенный непосредственно у центромеры, большей частью представлен повторами, гомологичными таковым прицентромерных районов аутосом, а сегмент, расположенный дистальнее, содержит повторы, типичные для В-хромосом (рисунок 23). Таким образом, можно предположить наличие различных ДНК-повторов в В-хромосомах и прицентромерном гетерохроматине половых хромосом желтогорлых мышей. Вариации в размерах сигналов от обоих типов

зондов в гетерохроматических районах половых хромосом *A. flavicollis* свидетельствуют о продолжающемся процессе их реорганизации путём амплификации разных ДНК-повторов.

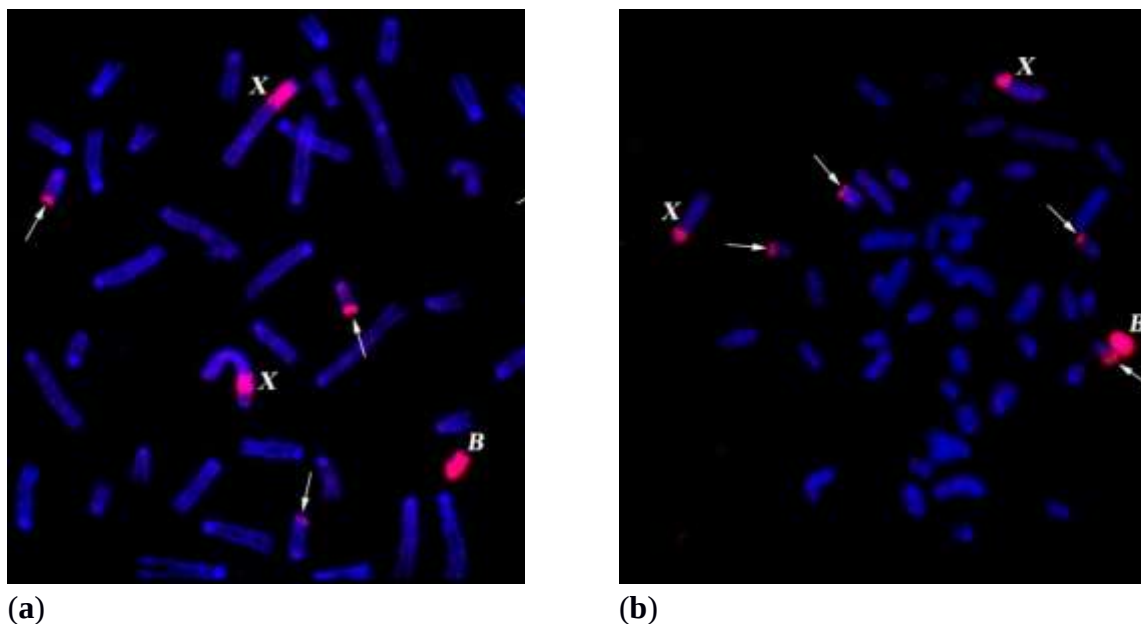


Рисунок 20 - FISH В-специфичных зондов (красный сигнал) с метафазными хромосомами желтогорлых мышей с одной В-хромосомой (а) зонд WCP3977B, метафазная пластинка из фибробласта самки *A. flavicollis* из Сербии (Orašac); (b) зонд WCP3980B, метафазная пластинка из клетки костного мозга самки *A. flavicollis* из Ульяновской области России. В- и X-хромосомы обозначены соответствующими буквами, стрелки указывают на теломерные FISH-сигналы у четырёх мелких аутосом. Тотальная окраска хромосом выполнена DAPI (синий сигнал).

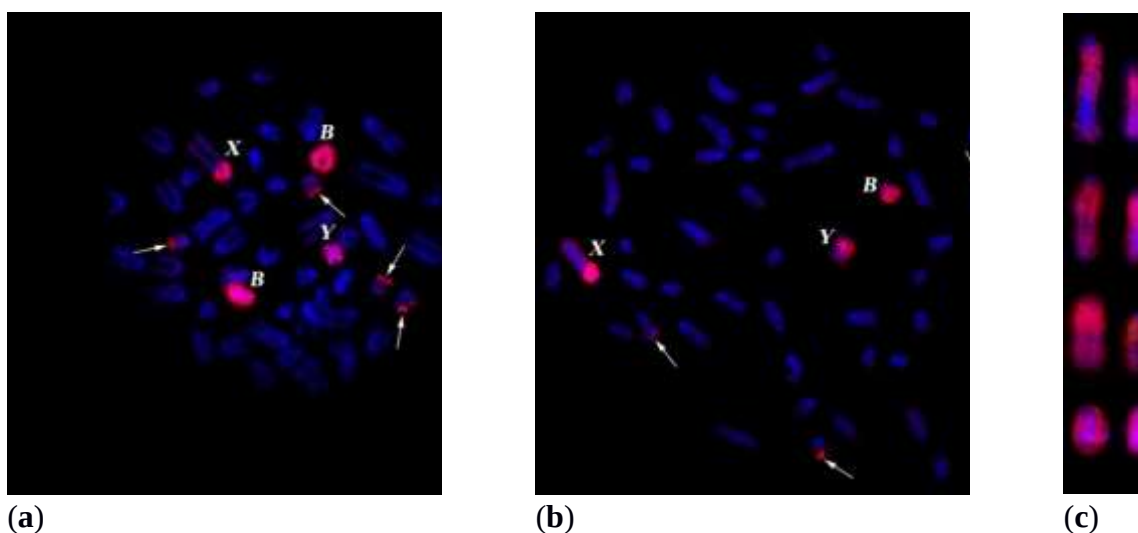


Рисунок 21 - FISH В-специфичного зонда WCP3980B (красный сигнал) с метафазными хромосомами клеток костного мозга самцов желтогорлых мышей (а) из Сербии (Milošev Do); (b) из Минской обл. Белоруссии. (c) FISH-сигналы от зонда WCP3980B на Y-хромосомах четырёх разных особей (каждый ряд представляет Y-хромосомы разной степени компактизации от одного и того же экземпляра). В-, X- и Y-хромосомы обозначены соответствующими буквами, стрелки указывают на теломерные

FISH-сигналы у четырёх мелких аутосом. Тотальная окраска хромосом выполнена DAPI (синий сигнал).

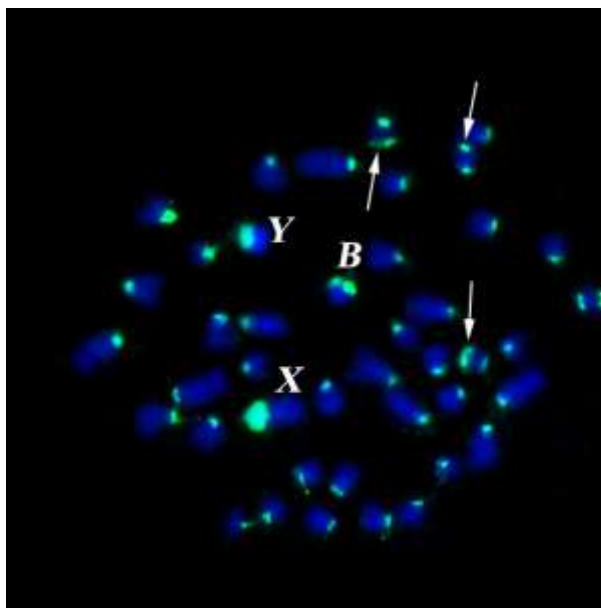


Рисунок 22 - FISH зонда PCPAflaCEN (зелёный сигнал) с метафазными хромосомами клетки костного мозга самца *A. flavicollis* из Новгородской обл. России. В-, X- и Y-хромосомы обозначены соответствующими буквами, стрелки указывают на теломерные FISH-сигналы у четырёх мелких аутосом. Тотальная окраска хромосом выполнена DAPI (синий сигнал).

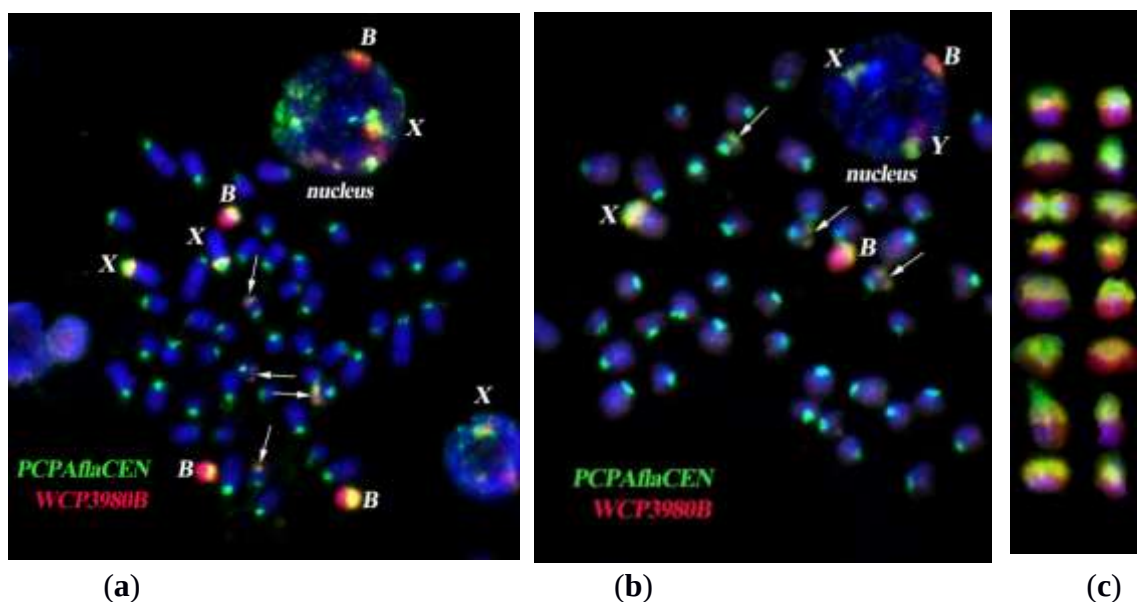


Рисунок 23 - Совместная FISH В-специфического зонда WCP3980B (красный сигнал) и зонда PCPAflaCEN (зелёный сигнал) с метафазными хромосомами (a) - самки с тремя В-хромосомами из Сербии (Misača); (b) - самца с одной В-хромосомой из Минской обл. Белоруссии. (c) - FISH-сигналы на Y-хромосомах четырёх разных особей (каждые два ряда представляют Y-хромосомы одного и того же экземпляра). В-, X- и Y-хромосомы обозначены соответствующими буквами, стрелки указывают на теломерные

FISH-сигналы от обоих зондов у четырёх мелких аутосом. Тотальная окраска хромосом выполнена DAPI (синий сигнал).

Специфичный паттерн FISH-сигналов у аутосом, половых хромосом и добавочных хромосом делает возможным их идентификацию внутри интерфазных ядер, особенно при одновременном использовании разных зондов. Оказалось, что В-хромосомы у желтогорлых мышей в основном локализованы по периферии ядра, без ассоциаций с аутосомами и половыми хромосомами (рисунок 24), тогда как у другого вида лесных мышей, имеющего В-хромосомы – восточноазиатской мыши *A. peninsulae* – В-хромосомы также расположены по периферии интерфазного ядра, но склонны формировать ассоциации с половым бивалентом. Возможно, это объясняется сравнительно небольшим размером В-хромосом и гетерохроматических сегментов аутосом, а также меньшим числом В-хромосом у желтогорлых мышей в сравнении с восточноазиатскими.

В основном, В-хромосомы у *A. flavicollis* представлены ДНК-повторами, гомологичными гетерохроматическим районам половых хромосом, и по-видимому, от одной из них они и берут начало, что уже предполагалось нами ранее [52]. Тем не менее, можно допустить, что в формировании В-хромосом участвовали и аутосомы, принимая во внимание наличие в теломерных районах В-хромосом ДНК-повторов, гомологичных таковым аутосомным гетерохроматическим сегментам, но поскольку такие же повторы есть и в половых хромосомах, остаётся неясным, принимали ли аутосомные ДНК-повторы непосредственное участие в образовании В-хромосом или же были вначале транслоцированы в половые хромосомы, а затем в добавочные. Кроме того, можно предполагать как формирование В-хромосом *A. flavicollis* одновременно из разных типов повторов, либо в два или несколько этапов, то есть вначале с участием одного типа повторов, ведущего к образованию прото-В-хромосомы, а затем – других типов повторов. В последнем случае, если начальной стадией была амплификация ДНК-повторов аутосомного гетерохроматина, они могли сформировать прото-В-хромосому очень маленького размера, а впоследствии перенос повторённых ДНК-последовательностей из гетерохроматина половых хромосом и их возможная амплификация уже в составе прото-В-хромосомы могли увеличить её размер и вытеснить кластер исходных повторов (гомологичных аутосомным) в теломерные районы.

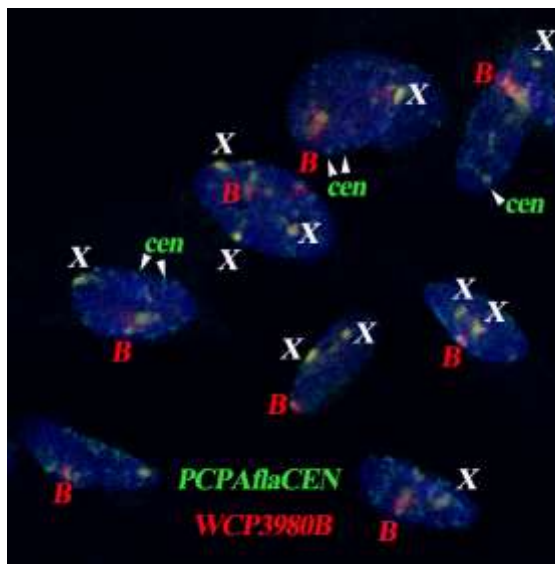
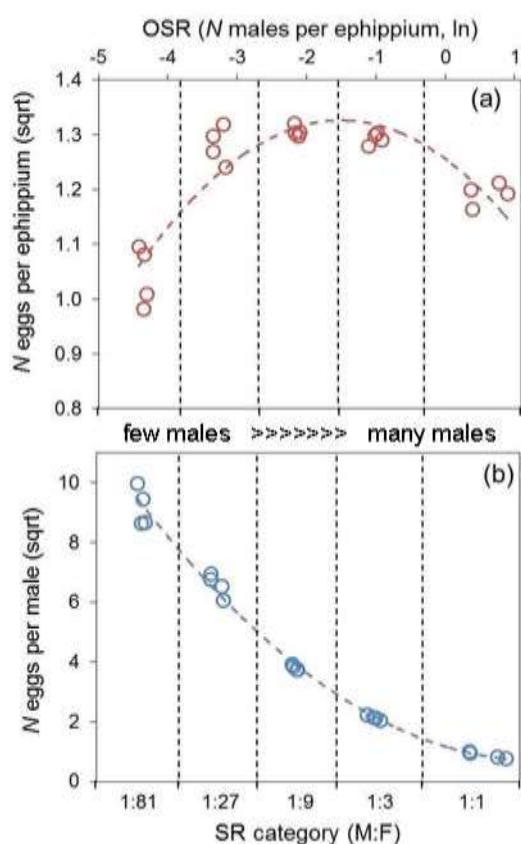


Рисунок 24 - 3D-FISH В-специфического зонда WCP3980B (красный сигнал) и зонда PCPAflaCEN (зелёный сигнал) в интерфазных ядрах фибробластов самки *A. flavicollis* с одной В-хромосомой (Сербия, Orašac). В- и X-хромосомы обозначены соответствующими буквами, cen – аутосомные С-позитивные районы. Тотальная окраска хромосом выполнена DAPI (синий сигнал).

Подраздел 3.4 Эффект соотношения полов на репродуктивный успех самок и самцов *Daphnia* при половом размножении.

Одним из важных факторов эволюции систем детерминации пола является половой отбор, интенсивность которого у каждого пола, в свою очередь, зависит от соотношения активных самцов и готовых к оплодотворению самок. В особенности это касается случаев, когда соотношение полов может изменяться в широких пределах. Значительные колебания соотношения полов характерны, в частности, для циклических партеногенетиков, у которых чередуются периоды бесполого и полового размножения. Однако эффекты таких колебаний на репродуктивный успех и конкуренцию за полового партнера изучены достаточно слабо. В серии опытов с *Daphnia magna*, мы исследовали репродуктивный успех самцов и самок при пяти различных соотношениях полов, от 81 самок на одного самца, до равного соотношения (рисунок 25). Мы обнаружили, что у самцов репродуктивный успех (среднее число половых потомков в расчете на одну особь) быстро и монотонно снижается при снижении числа самок, приходящихся на одного самца. В отличие от этого, у самок средний репродуктивный успех снижался только при наиболее смещенном в сторону самок соотношении полов (1:81); в этом случае, многие самки оставались неоплодотворенными. Кроме того, репродуктивный успех самок снижался и при равном соотношении полов, возможно из-за эффекта высокой популяционной плотности и стресса. Наши результаты показывают, что самцы становились для самок лимитирующим ресурсом только при

соотношении полов, меньшем, чем один самец на приблизительно 50 самок [53]. Такое соотношение полов находится в пределах диапазона, наблюдаемого в природных популяциях дафний. Таким образом, половой отбор может действовать не только среди самцов, но, по крайней мере периодически, и у самок дафний. Помимо лучшего понимания факторов эволюции определения пола у циклических партеногенетиков, настоящая работа имеет практическое значение. Выбор оптимального соотношения полов при половом размножении позволит экономить ресурсы как в лабораторных экспериментах с модельными видами *Daphnia*, так и при поддержании возобновляемых из половых яиц культур дафний в рыбных хозяйствах и при очистке сточных вод.



Соотношение полов влияет на репродуктивный успех как самок (а) так и самцов (б) дафний



Рисунок 25 - Влияние соотношения полов на репродуктивный успех.

Заключение.

Механизмы формирования половых хромосом могут быть раскрыты с помощью современных методов иммуноцитогенетики, что наглядно продемонстрировали работы на половых изоморфных хромосомах слепушенок и других грызунов [49-51]. Данные о гомологии добавочных В-хромосом и фрагментов половых хромосом весьма интересны и заслуживают дальнейшего изучения. Исследование репродуктивного успеха *Daphnia* при

половом размножении позволяет лучше понять факторы эволюции определения пола. Все полученные результаты опубликованы в высокорейтинговых международных журналах.

Список использованных источников

45. Ohno S. Sex chromosomes and sex linked genes. Springer, Berlin. – 1966. 202 pp.
46. Kolomiets O.L., Matveevsky S.N., Bakloushinskaya I.Y. 2010. Sexual dimorphism in prophase I of meiosis in the Northern mole vole (*Ellobius talpinus* Pallas, 1770) with isomorphic (XX) chromosomes in males and females // *Comparative Cytogenetics*. – 2010. – Vol. 4. – № 1. – P. 55–66.
47. Matveevsky S., Bakloushinskaya I., Kolomiets O. Unique sex chromosome systems in *Ellobius*: How do male XX chromosomes recombine and undergo pachytene chromatin inactivation? // *Scientific Reports*. – 2016. – 6. – Art. No 29949. DOI: 10.1038/srep29949.
48. Bakloushinskaya I., Lyapunova E.A., Saidov A.S., Romanenko S.A., O'Brien P.C., Serdyukova N.A., Ferguson-Smith M.A., Matveevsky S., Bogdanov A.S. Rapid chromosomal evolution in enigmatic mammal with XX in both sexes, the Alay mole vole *Ellobius alaicus* Vorontsov et al., 1969 (Mammalia, Rodentia) // *Comparative Cytogenetics*. – 2019. – Vol. 13. – Is. 2. – P. 147-177. DOI: 10.3897/CompCytogen.v13i2.34224
49. Gil-Fernandez A., Matveevsky S., Martin-Ruiz M., Ribagorda M., Parra M.T., Viera A., Rufas J.S., Kolomiets O., Bakloushinskaya I.1, Page J. Sex differences in the meiotic behavior of an XX sex chromosome pair in males and females of the mole vole *Ellobius tancrei*: turning an X into a Y chromosome? // *Chromosoma*. – 2021. – Vol. 130. DOI: 10.1007/s00412-021-00755-y. – Q2
50. Matveevsky S., Chassovnikarova T., Grishaeva T., Atsaeva M., Malygin V., Bakloushinskaya I.1, Kolomiets O. Kinase CDK2 in mammalian meiotic prophase I: screening for hetero- and homomorphic sex chromosomes//*International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. Is. 4. — Art. N 1969. DOI: 10.3390/ijms22041969.
51. Karamysheva T., Romanenko S., Makunin A., Rajičić M., Bogdanov A., Trifonov V., Blagojević J., Vujošević M., Orishchenko K., Rubtsov N. New data on organization and spatial localization of B-chromosomes in cell nuclei of the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – Art. no. 1819. DOI: 10.3390/cells10071819.
52. Rajičić M., Romanenko S.A., Karamysheva T.V., Blagojević J., Adnađević T., Budinski I., Bogdanov A.S., Trifonov V.A., Rubtsov N.B., Vujošević M. The origin of (B) chromosomes in yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*) – break rules but keep playing the game // *PLoS ONE*. 2017. 12. e0172704. DOI:10.1371/journal.pone.0172704

53. Galimov Y.R., Tukhbatullin A.R., Haag C.R, Tchabovsky A.V. Sex ratio effects on reproductive success of male and female *Daphnia* // Journal of Evolutionary Biology. – 2021. – Vol. 34. – Is. 11. – P. 1817-1826 DOI: 10.1111/jeb.13942 – Q3.

РАЗДЕЛ 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОММУНИКАЦИОННОГО ПОВЕДЕНИЯ

Введение

Коммуникационное поведение у животных представляет собой передачу информации от одной или группы особей (отправитель или отправители) другой особи или их группе (получатель или получатели), влияющее на текущее или будущее поведение особей-получателей. В случаях изменения поведения особи-получателя, информация от особи-отправителя называется сигналом. Сигналы поддерживаются в популяции благодаря тому, что отправители и получатели получают выгоду от коммуникационного взаимодействия. Считается, что генерация сигналов отправителями и восприятие сигналов, и последующая реакция получателей эволюционируют совместно. Для коммуникации животные используют различные органы чувств или модальности. Коммуникационное поведение является адаптацией, способствующее приспособленности видов животных, и реализуется во многих биологических процессах, таких как добывание пищи, поиск брачных партнеров, забота о потомстве, охрана территории и других. Коммуникационное поведение может являться основой формирования презиготических барьеров при дивергенции видов в условиях реализации симпатрической модели видообразования, полового отбора и любой социальной иерархии у животных с выраженным социальным поведением. Коммуникационное поведение животных является объектом быстро развивающихся исследований целого ряда научных дисциплин, таких как генетика, этология, нейробиология и др. Анализ генетических основ коммуникационного поведения носит как фундаментальный, так и прикладной характер. В нашей лаборатории эволюционной генетики развития коммуникационное поведение дрозофил исследовалось совместно с другими лабораториями в трех аспектах: способность самок к копированию выбора брачного партнера; роль акустического канала в ритуале ухаживания; влияние гена *quick-to-court* на брачное поведение.

Методы

Использованы стандартные методы фиксации брачного поведения дрозофил. Все взаимодействия между самкой и самцом записывались на видеокамеру Sony HDR-SR12E (Япония), далее с помощью компьютерной программы VirtualDub 1.10.3 расшифровывалась структура поведения ухаживания. Длительность латентных периодов (время от начала ухаживания до начала каждого элемента) и самих элементов ухаживания были рассчитаны с помощью программы Microsoft Excel. Для исследования роли акустического канала в брачном ритуале трех близкородственных видов – *D. virilis*, *D. lummei* и *D. littoralis* – самкам и самцам удалялись аристы и крылья, которые являются необходимыми для приема и передачи акустического сигнала и как следствие, для реализации акустического дуэта в ходе брачного ритуала. Для эксперимента по выявлению у дрозофил способности к копированию выбора полового партнера была сконструирована специальная установка, представляющая собой два отсека, которые разделены прозрачной перегородкой (в контрольных опытах перегородка непрозрачная). Все данные, полученные в ходе экспериментов, статистически обрабатывались с помощью программ Microsoft Excel и Statistica.

Результаты и обсуждение

Подраздел 4.1 Социальное обучение у *Drosophila melanogaster*

Особый интерес представляет такая форма коммуникативного поведения, как социальное обучение – процесс, с помощью которого животные путем наблюдения, взаимодействия с другими особями и подражания им приобретают новые модели поведения или корректируют существующие. Социальное обучение, когда-то считавшееся уникальным для людей, за последние несколько десятилетий было найдено у многих позвоночных и даже у некоторых беспозвоночных [54-63]. Социальное обучение, основанное на копировании поведения, и, как следствие, возникновение культурных традиций приводит к распространению и укоренению определенных особенностей поведения, поддерживаемых отбором, сохраняющихся в популяции и передающихся из поколения в поколения. Культурные традиции широко распространены у птиц и млекопитающих – животных, способных к сложной социальной деятельности. За последние годы группой французских биологов был опубликован ряд работ, доказывающих, что самки *Drosophila melanogaster* копируют выбор брачного партнера, то есть предпочитают спариваться с самцами, похожими на тех, которых они видели спаривающимися с другими самками [64-68]. Причем главной идеей, проходящей через все эти работы красной нитью, является предположение о том, что на основе половых предпочтений самок у дрозофил формируются культурные традиции. Для того чтобы

подтвердить или опровергнуть эту гипотезу, мы предприняли попытку повторить эксперимент, немного дополнив его. Для мечения самцов мы использовали розовую и синюю пудры (BioQuip Products), тогда как в работах под руководством Этьена Даншена [65-68] использовались пудры розового и зеленого цветов. Для уменьшения стресса и повышения половой активности мух в каждый отсек экспериментальной установки вносилось небольшое количество корма. Кроме того, поскольку предварительные тесты показали отсутствие эффекта социального обучения, мы укоротили отсек экспериментальной установки, в котором должна была находиться самка-наблюдатель, чтобы область передвижения самки была ограничена пространством в непосредственной близости от разделяющей перегородки (рисунок 26).

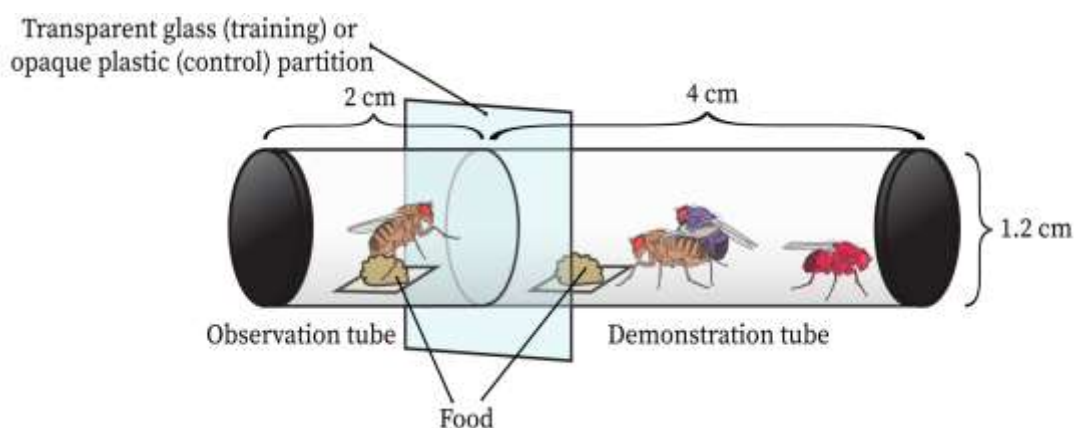


Рисунок 26 - Схема экспериментальной установки для постановки поведенческих тестов и оценки копирования выбора брачного партнера у *Drosophila melanogaster*

Анализ результатов 368 проведенных тестов не выявил значимого влияния выбора самки-демонстратора на выбор самки-наблюдателя (таблица 6). Однако и те, и другие самки отдавали слабое предпочтение розовым самцам. Объяснение, вероятно, кроется в сложных врожденных цветовых предпочтениях дрозофил, связанных с различными физиологическими механизмами.

Таблица 6. Результаты тестов на копирование выбора партнера (N = 368)

Вариант опыта	Выбор самки-демонстратора	Выбор самки-наблюдателя	
		Синий	Розовый
Обучение (прозрачная перегородка)	Розовый	61	70
	Синий	37	49
Контроль (непрозрачная перегородка)	Розовый	42	46
	Синий	29	34

Предполагается, что дрозофилы видят розовый цвет как серый, ввиду отсутствия красных опсинов, но, в то же время, они способны различать зеленый и синий цвета. Кроме

того, ранее было показано, что *D. melanogaster* предпочитают зеленый цвет и избегают синий цвет [69, 70].

Помимо того, остается дискуссионным вопрос нужно ли учитывать тесты, в которых из двух самцов за самкой ухаживал только один самец; или самка должна быть в ситуации реального выбора: выбора брачного партнера из двух активных ухаживающих самцов. Известно, что для девственных самок дрозофилы характерно состояние максимальной рецептивности, поэтому маловероятно, что они будут ожидать, когда к ухаживанию присоединится второй самец. Тем не менее, в работе Monier с соавторами [66] было показано, что самки с большей вероятностью будут ждать активных действий от второго самца, если первый не принадлежит к предпочтительному фенотипу. Однако, обособив результаты тестов с двойным ухаживанием, нам также не удалось выявить значимого влияния выбора самки-демонстратора на выбор самки-наблюдателя. Не исключено, что этот результат может быть связан с малым объемом выборки (84 теста с двойным ухаживанием из 368 тестов). Вместе с тем, в наших экспериментах увеличивалась вероятность выбора самкой-наблюдательницей самца синего цвета после демонстрации этого выбора, и в случае, если самка-наблюдательница находилась в ситуации выбора между двумя ухаживающими самцами. Вероятно, если бы удалось провести больше успешных (закончившихся спариванием самки-наблюдательницы) тестов с двойным ухаживанием, то эффект копирования выбора синего самца стал бы статистически значимым.

В дополнение ко всему вышеперечисленному также была проверена гипотеза о том, что самцам того же фенотипа, что и тот, который был выбран самкой-демонстратором, потребуется меньше времени на ухаживание за самкой-наблюдателем. К сожалению, данная гипотеза не нашла подтверждения.

Таким образом, на основе наших результатов можно сделать вывод, что копирование выбора брачного партнера у *D. melanogaster* – это не такое устойчивое и воспроизводимое явление, как было показано ранее другими исследователями [64-68], и, по-видимому, для оценки распространенности социального обучения и формирования культурных традиций среди дрозофил необходимо провести еще немало исследований.

Подраздел 4.2 Роль акустических сигналов в брачном поведении *Drosophila virilis*, *D. lummei* и *D. littoralis*

Брачный ритуал обычно характеризуется мультимодальностью, то есть участием нескольких сенсорных каналов в передаче и получении сигналов. У дрозофил взаимодействие между полами осуществляется посредством звуковых, визуальных и тактильных стимулов. Сигналы одних и тех же модальностей могут значительно различаться у близкородственных видов дрозофил, так же, как и сами ритуалы ухаживания могут существенно различаться между видами. Группа видов-близнецов *D. virilis* является известным модельным объектом для изучения видообразования. Группа состоит из 11 видов, обитающих в различных регионах мира, и характеризуются способностью к гибридизации в лабораторных условиях [71, 72]. Несмотря на большое число исследований, слабо изученным остается вопрос взаимодействия акустических сигналов с другими каналами связи.

Мультимодальные сигналы могут быть как избыточными, так и неизбыточными в зависимости от того, отправляют ли они аналогичную или различную информацию [73-75]. При объединении компоненты избыточного сигнала могут вызывать эквивалентный ответ [76]. Напротив, компоненты неизбыточного сигнала при объединении несут разную информацию и генерируют разные ответы у особи-получателя. В нашей предыдущей работе [77] мы изучили роль акустических сигналов самцов в брачном ритуале *D. virilis*. Было обнаружено, что удаление крыльев у самцов или арист у самок не приводили к остановке ритуала и отсутствию спаривания. Однако эти манипуляции привели к значительному снижению процентного содержания копуляций. Продолжительность почти всех элементов ухаживания увеличилась после удаления крыльев самца или арист у самок; продолжительность ощупывания и лизания существенно увеличилось. Этот результат соответствует данным, полученным LaRue с соавторами [78].

В настоящем исследовании мы сравнили роль акустических сигналов в брачном ритуале *D. virilis* и *D. lummei*, принадлежащих к филаде *D. virilis*, с *D. littoralis*, принадлежащему к филаде *D. montana* [72, 79]. *Drosophila littoralis* была представлена северной и южной популяциями. Мы записали брачный ритуал с помощью видеокамеры и дополнительно проанализировали задержку и общую продолжительность каждого элемента ухаживания. Когда акустический канал был заблокирован, мы определили две альтернативных ситуации: либо самка не слышит самца (бескрылые самцы или самки без арист), или наоборот, самец не слышит самку (бескрылые самки или самцы без арист). Мы предположили, что этот блок акустических сигналов будет более важным в ситуациях, когда самки не слышат самцов, чем наоборот, поскольку самки должны быть более

избирательными, чем самцы. Мы также предположили, что устранение акустического канала у *D. lummei* и *D. littoralis* может в основном приводить к увеличению продолжительность ощупывания и лизания, как мы ранее показали у *D. virilis* [77]. Однако, учитывая результаты Ноikkala [80], мы ожидали, что блокировка акустического канала повлияет на успех в спаривании и структуру брачного ритуала в меньшей степени у *D. lummei* и *D. littoralis*, чем у *D. virilis*. Таким образом, мы предположили иное соотношение между компонентами нескольких сигналов у близкородственных видов дрозофил, не зависящие от их филогенетического отношения, которые подразумевают быструю эволюцию мультимодальных сигналов.

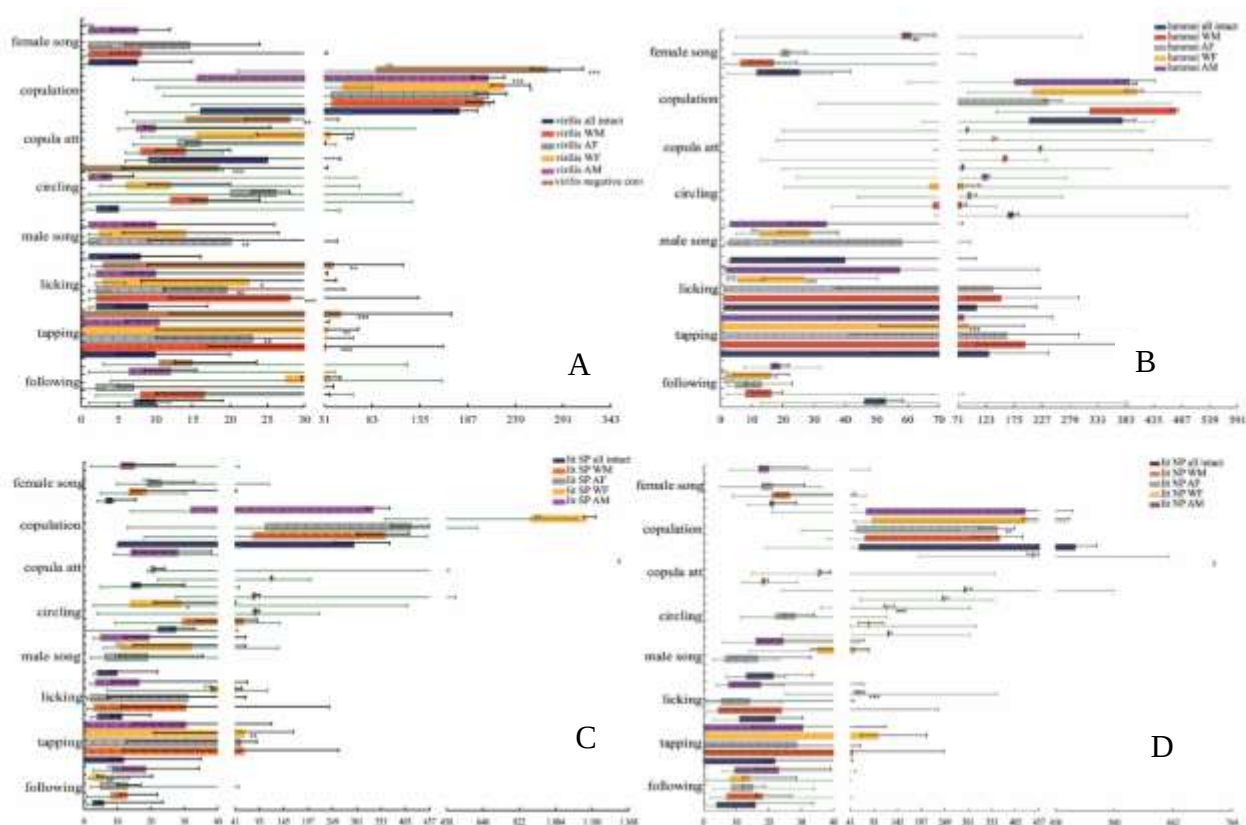


Рисунок 27 - Длительности элементов брачного ритуала и их латентных периодов у *D. virilis* (A), *D. lummei* (B), южной популяции *D. littoralis* (C), северной популяции *D. littoralis* (D)

Было проведено пять серий экспериментов: тесты с интактными мухами (контроль), тесты с «немыми» мухами (бескрылыми самцами или самками) и тесты с «глухими» мухами (самцы или самки, лишённые арист). Мы выделили две ситуации: либо самка не слышала самца, либо, наоборот, самцы не слышали самок. Когда самки не слышали самцов, снижение числа копуляций было обнаружено у *D. virilis* и обеих популяций *D. littoralis*, но не у *D. lummei*. Когда самцы не слышали самок, снижение числа копуляций было обнаружено только у *D. littoralis*. Удаление арист у самцов *D. virilis* и *D. lummei* даже увеличило успешность спаривания, как у *D. virilis*, так и у *D. lummei*, по сравнению с

контролем, что можно объяснить гипотезой «сенсорной перегрузки». Изменения во временной структуре ухаживания обычно включали отсроченное начало основных элементов ухаживания (ощупывание, лизание и пение), а также изменение их продолжительности и общего времени ухаживания. Однако эти эффекты были более значительными у *D. virilis* и обеих популяций *D. littoralis*, чем для *D. lummei*. Результаты анализа длительности латентного периода и ритуала ухаживания представлены на рисунке 27. Таким образом, эффект блокировки акустического канала был различным у трех видов независимо от их филогенетического родства, и роль акустической коммуникации в поведении ухаживания, по-видимому, возрастала в порядке *D. lummei* - *D. virilis* - *D. littoralis*.

Подраздел 4.3 Влияние гена *quick-to-court* на брачное поведение *Drosophila melanogaster*

За почти столетнюю историю генетики такого сложного признака как репродуктивное поведение дрозофил [81] исследователям удалось выявить порядка сотни генов, мутации в которых, влияя на множественные биологические процессы, воздействуют и на брачное поведение. Это гены, связанные с морфологией, определением пола, дофаминергической и серотонинергической системами, синтезом феромонов, обучением и памятью, циркадным ритмом. Сравнительно недавно у *D. melanogaster* был открыт новый ген *quick-to-court* (*qtc*), влияющий на половое поведение самцов. Мутация в этом гене была впервые обнаружена в лабораторной линии с повышенной частотой ухаживания между самцами [82]. Кроме того, самцы с мутацией в гене *qtc* тратили меньше времени на ухаживание за самками. Для детальной оценки влияния этого гена на брачное поведение была получена делеция *qtc* [83] и проведен комплекс экспериментов, включающий в себя серию поведенческих тестов с использованием метода видеотипирования, а также запись и анализ акустического сигнала самцов.

Анализ представленности элементов в брачном ритуале обеих исследованных линий позволил выявить основные элементы, характеризующиеся высокой частотой: преследование, ощупывание и лизание. При этом, однако, делеция в гене *qtc* привела к значительному увеличению представленности лизания по сравнению с контролем (90% vs 58%). Сравнение доли успешных копуляций не дало значимых различий в процентном соотношении прокопулировавших пар. Кроме того, в парах с делецией *qtc* самцы быстрее начинали осуществлять преследование и лизание самок по сравнению с контрольными самцами (рисунок 26). Это согласуется с полученными ранее данными о том, что самцы с мутацией в гене *qtc* аномально быстро начинают ухаживать [82]. Интересно, что

наибольшей метаморфозе подвергся такой элемент брачного поведения, как лизание. Это подтверждает тот факт, что лизание является одним из ключевых элементов, необходимых самцу для перехода от ухаживания к копуляции [84].

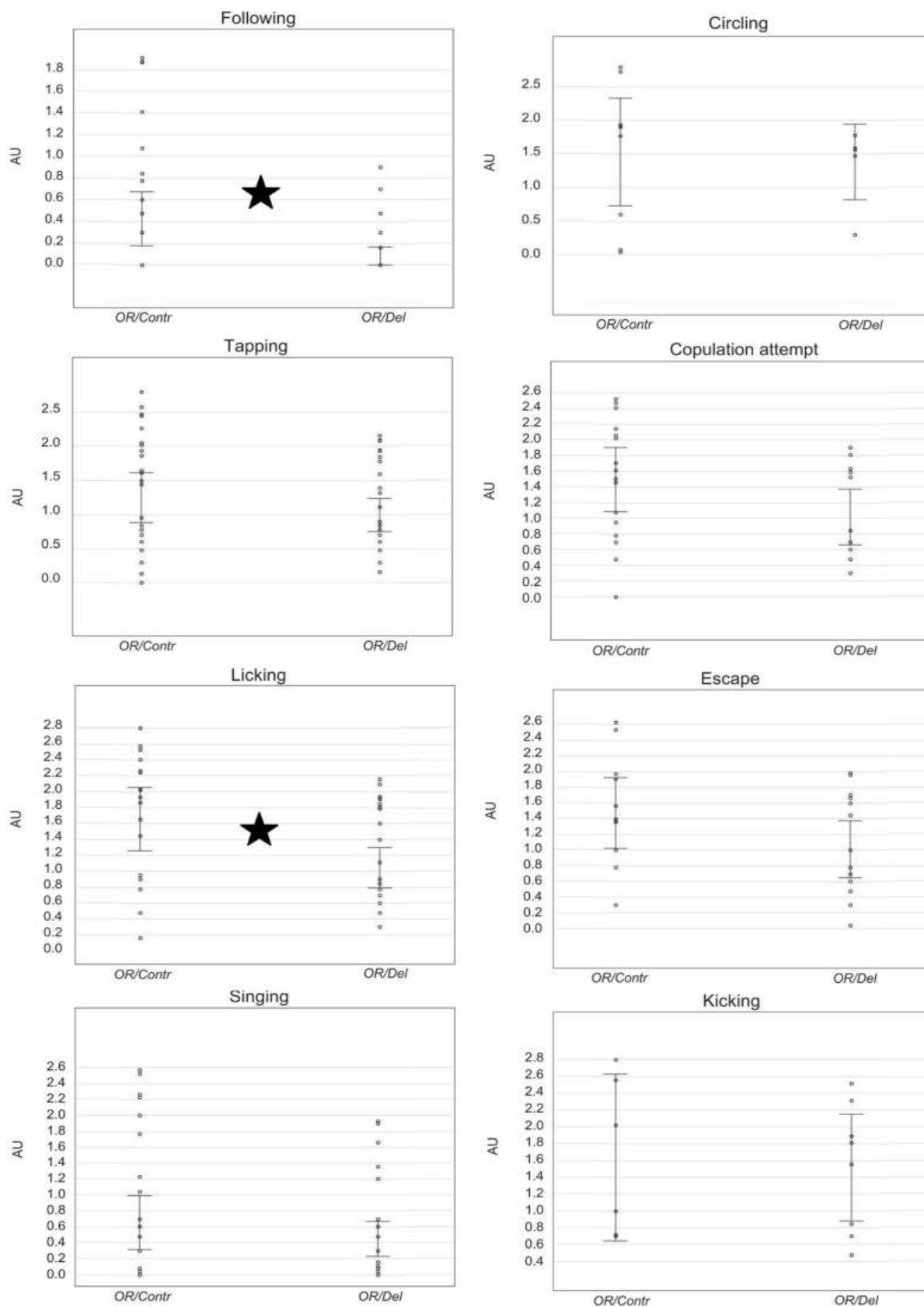


Рисунок 28 - Латентный период элементов брачного поведения

(AU – относительные единицы, трансформированные данные). OR/Contr – контрольная линия, OR/Del – линия с делецией *qtc*. Усы представляют собой 95% доверительный интервал.

Для проверки наличия полосспецифичных различий от делеции *qtc*, был проведен анализ параметров брачной песни в гетероспецифических тестах (рисунок 28). Ухаживая за самками *Oregon R*, самцы с делецией больше поют по сравнению с контрольными самцами; в то время как самцы *Oregon R* предпочитают больше петь контрольным, а не мутантным самкам. Помимо этого, по отношению к самкам с делецией самцы *Oregon R* позже начинают генерацию брачной песни. Другими словами, делеция *qtc* оказывает диаметрально противоположный эффект в зависимости от пола: делеция у самок приводит к снижению интенсивности ухаживания со стороны самцов дикого типа, тогда как делеция у самцов – к повышению интенсивности ухаживания по отношению к самкам дикого типа. Известно, что у *D. melanogaster* половое поведение самцов формируется и регулируется под воздействием двух транскрипционных факторов: *doublesex (dsx)* и *fruitless (fru)*, которые созревают (сплайсируются) по-разному у самцов и самок [85]. Ген *dsx* необходим для инициации ухаживания и песни [86-88]. Специфичная для самцов изоформа *fruM* определяет развитие нейронов мужского типа и вместе с этим большинство этапов ухаживания самцов [86, 89, 90]. Устранение функции *fruM* приводит к полной отмене ухаживания самцов, а эктопическая экспрессия *fruM* у самок формирует у них мужское брачное поведение. В настоящей работе мы исследуем ген *qtc*, который, видимо, не является транскрипционным фактором. QTC относится к суперскрученным белкам [91], белки такого типа часто связаны с аппаратом Гольджи [91]. *qtc* экспрессируется как у самцов, так и у самок, различия в уровне транскрипции между полами невелики [82], известно 12 мРНК, образующихся в результате альтернативного сплайсинга.

Таким образом, делеция *qtc* не оказывает сильного влияния на структуру брачного ритуала, но затрагивает исключительно некоторые из элементов поведения. Можно предположить, что у самцов и самок могут присутствовать разные сплайс-варианты *qtc*, которые также, как и разные сплайс-варианты *dsx* и *fru* участвуют в формировании поведенческого полового диморфизма. Пока это остается предположением, поскольку нет данных о распределении изоформ белка QTC у самцов и самок, а также о молекулярных механизмах его действия.

Заключение

В экспериментах с родственными видами дрозофил группы *virilis* было показано, что акустический канал может иметь альтернативное значение при модуляции брачного поведения у самцов и самок, по крайней мере у некоторых видов. При этом анализ особенностей брачного поведения *D. melanogaster* с полностью инактивированным геном

quick-to-court показал противоположный эффект мутантного аллеля на отдельные элементы брачного поведения самцов и самок, связанные именно с акустическим каналом. Это предполагает, что ген *quick-to-court* является частью генетической системы, определяющей половые различия программ брачного поведения, реализуемые через акустический канал.

По результатам исследований опубликованы три статьи в международных журналах [92-94].

Список использованных источников

54. Aplin L.M., Farine D.R., Morand-Ferron J., Cockburn A., Thornton A., & Sheldon B. C. Experimentally induced innovations lead to persistent culture via conformity in wild birds // *Nature*. – 2015. – Vol. 518. – Is.7540. – P. 538–541.
55. Galef B.G. Social learning and traditions in animals: Evidence, definitions, and relationship to human culture // *WIREs Cognitive Science*. – 2012. – Vol. 3. – Is.6. – P.581–592.
56. Heyes C.M., Galef B.G. (Eds.). *Social learning in animals: the roots of culture*. – 1996. San Diego, CA: Academic Press.
57. Laland K.N., Williams K. Shoaling generates social learning of foraging information in guppies // *Animal Behaviour*. – 1997. – Vol. 539. – Is.6. – P. 1161–1169.
58. Van Schaik C.P., Ancrenaz M., Borgen G., Galdikas B., Knott C.D., Singleton I., et al. Orangutan cultures and the evolution of material culture // *Science*. – 2003. – Vol. 299. – Is.5603. – P. 102–105.
59. Whitehead H. Geneeculture coevolution in whales and dolphins // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2017. – Vol. 114. – Is. 30. – P. 7814–7821.
60. Whiten A. Culture extends the scope of evolutionary biology in the great apes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2017. – Vol. 114. – Is. 30. – P. 7790–7797.
61. Alem S., Perry C.J., Zhu X., Loukola O.J., Ingraham T., Søvik E., et al. Associative mechanisms allow for social learning and cultural transmission of string pulling in an insect // *PLoS Biology*. – 2016. – Vol. 14. – Is. 10. – Article e1002564.
62. Chittka L., Leadbeater E. Social learning: Public information in insects // *Current Biology*. – 2005. – Vol.15. – P. 869–871.
63. Reznikova Z., Panteleeva S. An ant's eye view of culture: Propagation of new traditions through triggering dormant behavioural patterns // *Acta Ethologica*. – 2008. – Vol. 11. – P. 73–80.

64. Mery F., Varela S.A.M., Danchin E., Blanchet S., Parejo D., Coolen I., et al. Public versus personal information for mate copying in an invertebrate // *Current Biology*. – 2009. – Vol. 19. – Is. 9. – P. 730–734.
65. Germain M., Blanchet S., Loyau A., Danchin E. Mate-choice copying in *Drosophila melanogaster*: Impact of demonstration conditions and male-male competition // *Behavioural Processes*. – 2016. – Vol. 125. – P. 76–84.
66. Monier M., Nobel S., Isabel G., Danchin E. Effects of a sex ratio gradient on female mate-copying and choosiness in *Drosophila melanogaster* // *Current Zoology*. – 2018. – Vol. 64. – Is. 2. – P. 251–258.
67. Dagaëff A.-C., Pocheville A., Nobel S., Loyau A., Isabel G., Danchin E. *Drosophila* mate copying correlates with atmospheric pressure in a speed-learning situation // *Animal Behaviour*. – 2016. – Vol. 121. – P. 163–174.
68. Danchin E., Nobel S., Pocheville A., Dagaëff A.-C., Demay L., Alphan M., et al. Cultural flies: Conformist social learning in fruitflies predicts long-lasting mate-choice traditions // *Science*. – 2018. – Vol. 362. – Is. 6418. – P. 1025–1030.
69. Carulli J.P., Chen D.M., Stark W.S., Hartl D.L. Phylogeny and physiology of *Drosophila* opsins // *Journal of Molecular Evolution*. – 1994. – Vol. 38. – P. 250–262.
70. Lazopulo S., Lazopulo A., Baker J.D., Syed S. Daytime colour preference in *Drosophila* depends on the circadian clock and TRP channels // *Nature*. – 2019. – Vol. 574. – P. 108–111.
71. Throckmorton L.H. The virilis species group. In: Ashburner M., Carson H.L., Thompson Jr J.N (eds). *The genetics and biology of Drosophila*. 1982. Academic. London: 3B. pp. 227–296.
72. Spicer G.S. Reevaluation of the phylogeny of the *Drosophila virilis* species group (Diptera: Drosophilidae) // *Ann. Entomol. Soc. Am.* – 1992. – Vol. 85. – P. 11–25.
73. Møller A.P., Pomiankowski A. Fluctuating asymmetry and sexual selection // *Genetica*. – 1993. – Vol. 89. – P. 267–279.
74. Partan S.R., Marler P. Issues in the classification of multimodal communication signals // *Am. Nat.* – 2005. – Vol. 166. – P. 231–245.
75. Bro-Jørgensen J. Dynamics of multiple signalling systems: animal communication in a world of flux // *Trends Ecol. Evol.* – 2010. – Vol. 25. – P. 292–300.
76. Partan S.R. Ten unanswered questions in multimodal communication // *Behav. Ecol. Sociobiol.* – 2013. – Vol. 67. – P. 1523–1539.
77. Belkina E.G., Lazebny O.E., Vedenina V.Yu. The role of acoustic signals in courtship behavior of *Drosophila virilis* // *Biol. Bull.* – 2016. – Vol. 43. – P. 561–566.

78. LaRue K.M., Clemens J., Berman G.J., Murthy M. Acoustic duetting in *Drosophila virilis* relies on the integration of auditory and tactile signals // *Elife*. – 2015. – 4:e07277.
79. Spicer G.S., Bell C.D. Molecular phylogeny of the *Drosophila virilis* species group (Diptera: Drosophilidae) inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes // *Ann. Entomol. Soc. Am.* – 2002. – Vol. 95. – P. 156–161.
80. Hoikkala A. The importance of different courtship stimuli in the mating behaviour of European species of the *Drosophila virilis* group // *Ann. Zool. Fennici*. – 1988. – Vol. 25. – P. 257–263.
81. Sturtevant A.H. Experiments on sex recognition and the problem of sexual selection in *Drosophila* // *J. Anim. Behav.* – 1915. – Vol. 5. – P. 351–366.
82. Gaines P., Tompkins L., Woodard C.T., Carlson J.R. Quick-to-court, a *Drosophila* mutant with elevated levels of sexual behavior, is defective in a predicted coiled-coil protein // *Genetics*. – 2000. – Vol. 154. – P. 1627–1637.
83. Кравчук О.И., Михайлов В.С., Савицкий М.Ю. Простой и эффективный метод получения направленных делеций в геноме дрозофилы // *Генетика*. – 2015. – Т. 51. – № 11. – С. 1325–1329.
84. Mezzera C., Brotas M., Gaspar M., Pavlou H. J., Goodwin S. F., Vasconcelos M. L. Ovipositor extrusion promotes the transition from courtship to copulation and signals female acceptance in *Drosophila melanogaster* // *Curr. Biol.* – 2020. – Vol. 5. – P. 3736–3748.
85. Cande J., Stern D.L., Morita T., Prud'homme B., Gompel N. Looking under the lamp post: Neither fruitless nor doublesex has evolved to generate divergent male courtship in *Drosophila* // *Cell Rep.* – 2014. – Vol. 8. – Is. 2. – P. 363–370.
86. Kimura K., Hachiya T., Koganezawa M. et al. Fruitless and doublesex coordinate to generate male-specific neurons that can initiate courtship // *Neuron*. – 2008. – Vol. 59. – Is. 5. – P. 759–769.
87. Rideout E.J., Billeter J.C., Goodwin S.F. The sex-determination genes fruitless and doublesex specify a neural substrate required for courtship song // *Curr. Biol.* – 2007. – Vol. 17. – Is. 17. – P. 1473–1478.
88. Villella A., Hall J.C. Courtship anomalies caused by doublesex mutations in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 1996. – Vol. 143. – Is.1. – P. 331–344.
89. Datta S.R., Vasconcelos M.L., Ruta V. et al. The *Drosophila* pheromone cVA activates a sexually dimorphic neural circuit // *Nature*. – 2008. – Vol. 452. – P. 473–477.
90. Stockinger P., Kvitsiani D., Rotkopf S. et al. Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior // *Cell*. – 2005. – Vol. 121. – Is. 5. – P. 795–807.

91. Truebestein L., Leonard T.A. Coiled-coils: The long and short of it // *Bioessays*. – 2016. – Vol. 38. – Is. 9. – P. 903–916.
92. Belkina E.G., Shiglik A., Sopilko N.G., Lysenkov S.N., Markov A.V. Mate choice copying in *Drosophila* is probably less robust than previously suggested // *Animal Behaviour*. – 2021. – Vol. 176. – P. 175-183. – DOI: 10.1016/j.anbehav.2021.04.007. – Q1.
93. Belkina E.G., Lazebny O.E., Vedenina V.Yu. The Importance of acoustic signals in multimodal courtship behavior in *Drosophila virilis*, *D. lummei* and *D. littoralis* // *Journal of Insect Behavior*. – 2021. – DOI: 10.1007/s10905-021-09788-8. – Q3.
94. Belkina E.G., Lazebny O.E., Gornostaev N.G., Mikhailov V.S., Danilenkova L.V., Besedina N.G., Bragina J.V., Kamyshev N.G., Sokolov V.V., Kravchuk O.I. Influence of the quick-to-court gene deletion on courtship behaviour of *Drosophila melanogaster* // *Journal Genetics*. – 2021. – Vol. 100. – Art. no 37. – DOI: 10.1007/s12041-021-01284-4. – Q4.

РАЗДЕЛ 5. ИЗОЛИРУЮЩИЕ МЕХАНИЗМЫ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИ ВИДООБРАЗОВАНИИ

Введение

Современные представления о видообразовании позволяют заключить, что нет единственного эволюционного механизма, определяющего формирование изолирующих межвидовых барьеров. Дивергирующие виды изменяются разнообразными способами, под одновременным действием различных факторов, сходные результаты могут быть достигнуты через альтернативные пути, и обстоятельства места и времени действия эволюционных факторов играют большую роль в направленности эволюционного процесса. Адаптивную радиацию видов сопровождает появление различных форм несовместимости, включая пре- и постзиготическую несовместимость, накопление видоспецифической нейтральной изменчивости, как на молекулярно-генетическом, так и на фенотипическом уровне. Нейтральные молекулярные маркеры всегда имеют вторичный характер, представляя собой следствие дивергенции и формирующейся изоляции. В то же время причина дивергенции может быть в равной степени обусловлена как онтогенетическими и/или физиологическими инновациями, определяющими адаптации, так и первичной несовместимостью, возникающей вследствие мейотического драйва (робертсоновские транслокации), инфекционного видообразования (взаимодействия геномов хозяина и симбионта, приводящие к изоляции инфицированных популяций хозяина). Таким образом, сценарии эволюционной дивергенции видов сводятся к концепциям адаптивной радиации видов [95, 96] с формированием эффективных презиготических изолирующих барьеров [97, 98], аллопатрическому видообразованию с постепенным формированием постзиготической изоляции [99-102 и др.] и вариантам ускоренного формирования постзиготической изоляции популяций на общем ареале обитания [103, 104]. При этом возможные генетические механизмы, определяющие реализацию этих сценариев, весьма многообразны. Анализ этих механизмов представляется важной фундаментальной проблемой эволюционной генетики.

В данном разделе Отчета результаты представлены в трех подразделах, посвященных анализу формирования адаптивно-значимой изменчивости двух близкородственных видов хищных птиц из группы видов *Hierofalco* семейства *Falconidae* – балобана и кречета [105], реконструкции древних событий эволюционной дивергенции предковых видов дрозофил, связанных с ускоренным, фактически «мгновенным» видообразованием, по сохранившимся в районе консервативного гена *ras85D* «подписям» принимавших участие в этих событиях транспозонов [106], анализу таксономического

положения и адаптивно-значимых признаков у ископаемых видов клещей, найденных в янтарных окаменелостях [107-111]. Интерес к теме первого исследования связан с существованием в популяциях балобана двух гаплогрупп, условно называемых «восточной» и «западной» [112], время дивергенции которых значительно превышает время дивергенции гаплогруппы, характерной для кречета и предковой для нее «восточной» гаплогруппы балобана. При этом, оба вида обитают разных климатических условиях [113, 114], которые могут быть связаны с отбором изменений в митохондриальных белках.

Тема второго исследования связана с отмеченным нами феноменом неоднократной полной замены области промотора и предшествующего ему межгенного спейсера у эволюционно консервативного гена *ras85D* и его оротов у дрозофил разной степени таксономической близости. Такие изменения, связанные с геномными перестройками и инсерциями мобильных элементов, должны приводить к летальным мутациям и морфологическим нарушениям, несовместимым с выживанием гомозиготных фенотипов в природных популяциях. Генетико-автоматические процессы в этом случае за короткий срок приведут к полной элиминации таких аллелей из популяции. Однако фиксация таких аллелей и их наследование видами-потомками на разных ветвях эволюционного дерева предполагает действие специфических молекулярных механизмов быстрого восстановления функциональной активности гена и последующий успешный отбор новых аллелей. На вопросы, как часто и каким образом происходила замена этих участков, каким образом могла при этом сохраняться и поддерживаться функциональная активность гена, отвечает данная работа.

Работы, включенные в третий подраздел отчета, посвящены проблеме калибровки молекулярных часов. Различные группы организмов эволюционируют с существенно разной скоростью. Зная это, в современных филогенетических исследованиях, опирающихся на данные секвенирования, применяют так называемые "молекулярные часы" — относительную скорость появления изменений в геноме той или иной группы организмов. Однако, для калибровки "молекулярных часов" и, как следствие, построения корректных филогенетических деревьев, одних лишь данных секвенирования современных организмов недостаточно, поскольку в этом случае мы имеем дело лишь с текущим срезом, а не с историей эволюционных изменений. Исторические данные можно извлечь из ископаемых животных. Если возраст ископаемых измеряется в миллионах лет, то мы не можем анализировать их геном, однако в нашем распоряжении остаются морфологические признаки. В некоторых случаях древние организмы сохраняются в ископаемой летописи настолько хорошо, что у нас появляется возможность полноценно сравнивать их с

современными родственниками на родовом и даже видовом уровне. А редкие удачи — находки т. н. переходных форм [115] - указывают на пути эволюции современных групп организмов.

Одним из ценнейших источников палеонтологических находок по праву считается янтарь. В этой древней смоле сохраняются, как правило, относительно небольшие организмы, такие как насекомые и клещи. Важное достоинство янтарных ископаемых — высочайший уровень сохранности. Нередко отпечаток в смоле по уровню различимых деталей мало отличается от того, что исследователь может увидеть под микроскопом, разглядывая современного родственника древнего организма. Месторождений янтаря в мире много, и с каждым годом их находят всё больше. Возраст найденных месторождений янтаря также заметно различается, покрывая в целом диапазон от 20 до 230 миллионов лет. Для полноценного исследования внешней морфологии застывших в янтаре древних организмов требуется особая подготовка препаратов (резка и тонкая полировка), а также специальные методы микроскопии янтарных включений. Калибровка "молекулярных часов" проводилась на клещах (*Acari*), известных исключительно медленной скоростью эволюции. Клещи довольно часто встречаются в янтарях различных возрастов (преимущественно в диапазоне 35-100 млн лет), но их малые размеры (обычно менее 1 мм) диктуют необходимость применения специальных методических подходов. Были разработаны новые методы подготовки препаратов и микроскопической съёмки образцов, чтобы обеспечить их полноценное морфологическое сравнение с современными представителями тех же родов и семейств. Помимо клещей, разрабатываемые методы успешно применимы и для других групп ископаемых организмов [109].

Методы

В работе, посвященной анализу изменчивости цитохрома *b* балобана и кречета, использовали 16 полученных и четыре референсных полных последовательности гена *cyt b*. Образцы ДНК были выделены из линных перьев, полученных на базе ФГБУ "ВНИИ Экология" и из Коллекции линных перьев редких и особо ценных видов хищных птиц Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Выделение ДНК осуществлялось набором ДНК–Экстран-2 (Синтол, Россия). Для дальнейшего генотипирования образцов с помощью программ Primer-BLAST (NCBI, США) и PrimerSelect (DNASTAR, США) был разработан набор специфических перекрывающихся праймеров на полную последовательность гена *cyt b*. Амплификация и секвенирование по Сэнгеру проведены с использованием коммерческих наборов реактивов ScreenMix-HS (Евроген, Россия) и BigDye 3.1 (Applied Biosystems, США). Проверенные последовательности длиной 1143 пн загружены в базу данных GenBank (NCBI) под номерами MT431193–MT431208. Для

статистического анализа и филогенетических построений использовали программу MEGA X [116], моделирование на основе гомологии белков осуществлено на сервере SWISS-MODEL [117, 118]. Дополнительная визуализация проведена с помощью программы iCn3D на основе WebGL для интерактивного просмотра трехмерных макромолекулярных структур и химических веществ [119]. Расчеты взаимодействия цитохрома с другими белками электрон-транспортной цепи митохондрий методом иерархического прогнозирования I-TASSER [120, 121]. Предсказание функционального значения аминокислотных замен осуществлено с помощью сетевого программного инструмента PROVEAN, предсказывающего влияние изменения последовательности гена на функцию белка [122, 123]. Расчеты селективного влияния на структурные и биохимические свойства аминокислот в процессе филогенеза на основе качественных и категориальных статистических тестов проведены в программе TreeSAAP [124].

В работе, посвященной анализу закономерностей формирования эволюционно-значимой изменчивости области промотора и межгенного спейсера гена *ras85D*, использованы последовательности 38 видов дрозофил, полученные из базы данных «Genomes – NCBI Datasets», а также любезно предоставленные prof. Michael G Ritchie и dr. Venera I Tyukmaeva (University of St Andrews, Centre for Biological Diversity). Для определения позиций гена *ras85D* и ограничивающего межгенный спейсер расположенного выше гена применяли Nucleotide BLAST или tblastn. Выравнивание последовательностей проводилось в программе MEGA version 10.2.2, частично с применением метода ClustalW, частично в ручном режиме. В качестве маркеров гомологии некодирующих участков использовали эволюционно-консервативные мотивы (ECMs), определенные по последовательностям всех анализируемых видов инструментами аналитической платформы MEME version 5.4.1 – MEME [125, 126] и MAST [127]. Определение участков гомологии в границах межгенного спейсера каждой последовательности, включая прямые и инвертированные повторы, определяли с помощью инструмента YASS [128]. Поиск участков гомологии с мобильными элементами осуществляли по библиотеке GIRI Repbase, с использованием инструмента CENSOR и фильтра Hexapoda (Insects). Для определения точек старта транскрипции использовали публично доступные базы NCBI: SRA (для библиотек cDNA), EST, Nucleotide, TSA. Оценки обогащения области промотора элементами промотора осуществляли с применением алгоритма AME [129], letter-probability matrix (LPM) библиотеки JASPAR POLII motifs для элементов корового промотора, и полученных на основе позиционных весовых матриц (PWM) LPM для Ohler элементов из работы Rach et al. [130]. Оценки обогащения эволюционно-консервативных последовательностей сайтами связывания транскрипционных факторов (TF) получали с

использованием алгоритма AME, аналогично оценкам обогащения элементами промотора. В качестве базы данных мотивов использовали Combined Drosophila Databases. GO enrichment анализ проводили с использованием Базы Данных FlyEnrichr [131, 132]. Филогенетические построения и масштабирование по времени филогенетического дерева (timetree) проводили в программе MEGAX [116]. Использовали метод максимального правдоподобия, с применением Tamura 3-parameter model [133] по 42-м последовательностям гена *ras85D* и расположенного выше межгенного спейсера 38 видов дрозофил.

При исследовании ископаемых образцов клещей применяли методы шлифовки образцов янтаря с включениями ископаемых объектов и методы микроскопии. Задача подготовки препарата сводилась к созданию плоско-полированного параллелепипеда, незначительно превышающего по своему размеру исследуемый объект. В случае клещей, типичный размер препарата был в пределах от 3 до 0.3 мм. Полировка столь малых объектов не может быть осуществлена традиционными методами, применяемыми для янтаря, когда манипуляции производятся пальцами руки. Мы применяли разработанные ранее держатели и другое полировальное оборудование [115], позволяющее производить все операции, контролируя их под микроскопом. Для исследования и съёмки янтарных образцов использовались микроскопы Nikon E-800 с водно-иммерсионными (40x and 60x) и масляно-иммерсионным (100x) объективами, Zeiss AxioImager A2 с воздушными (40x, 63x) и масляно-иммерсионным (100x) объективами. Съёмку производили в проходящем свете с применением дифференциального интерференционного контраста. Для каждого образца с помощью цифровой камеры Olympus OM-D E-M10-II получали стеки кадров с переменной фокусировкой (до 200 кадров в стеке), которые затем преобразовывали в конечное изображение с повышенной глубиной резкости при помощи программы Helicon Focus 7.5.

Результаты

Подраздел 5.1. Нейтральная изменчивость цитохрома b у балобана и кречета

Установлено, что полученные последовательности не являются NUMT. Стандартный метод расчета соотношения частот dN/dS не показал наличия положительного отбора среди 16 исследуемых последовательностей гена *cyt b*, т.е. число синонимичных нуклеотидных замен больше, чем несинонимичных [134]. Выравнивание и сравнение оригинальных аминокислотных последовательностей балобана и кречета друг с другом, а также с референсными последовательностями сапсана, кречета и балобана (JX029991.1, NC_029359.1, KP337902.1 соответственно) показало несколько замен аминокислот

(таблица 7). Наиболее распространенная замена неполярной (гидрофобной) аминокислоты Ala на полярную (гидрофильную) Thr отмечена у всех балобанов из Крыма и двух из Алтае-Саянского региона в позиции 191 (571–573 пн). У образца FC16 из Алтае-Саянского региона обнаружена единичная замена неполярной аминокислоты Ile на полярную Thr в позиции 230 (687–690 пн). В последовательности cyt b образца FC09 из Крыма произошла замена неполярной аминокислоты Ala на Gly в позиции 294 (880–882 пн). Для образца FC38 из Крыма показаны замены полярных аминокислот Ser на Asn в позиции 305 (913–915 пн) и Thr на неполярную Ala в позиции 331 (991–993 пн).

Для описания степени вариабельности аминокислотных последовательностей проведено их выравнивание с последовательностями цитохрома b 17 представителей разных родов семейства Falconidae, доступными в базе данных NCBI. Было установлено, что сайты аминокислотных замен 191 и 294 показаны только для балобана и кречета, в то время как аминокислотные остатки 230, 305 и 331 имеют различные варианты у многих видов.

Таблица 7 - Распределение и варианты аминокислот в последовательности цитохрома b изучаемых образцов по сравнению с референсными последовательностями сапсана, кречета и балобана

Варианты сравниваемых последователь- ностей белков cyt b.	Позиции несовпадающих аминокислот cyt b и соответствующие им варианты кодонов				
	191: GCA/ACA	230: ATC/ACC	294: GCA/GGA	305: AGC/AAC	331: ACT/GCT
JX029991.1	Ala	Ile	Ala	Ser	Ala
NC_029359.1	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
KP337902.1	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FR5_Чукотка	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FR6_Камчатка	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC6_ACP	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC16_ACP	Ala	Thr	Ala	Ser	Thr
FC21_ACP	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC23_ACP	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC43_ACP	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC47_ACP	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC53_ACP	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC172_ACP	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC09_Крым	Thr	Ile	Gly	Ser	Thr
FC10_Крым	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC_Крым	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC23_Крым	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC25_Крым	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC38_Крым	Thr	Ile	Ala	Asn	Ala

Трехмерные модели цит *b* и расчет функциональной значимости аминокислотных замен построены на основе последовательности гена белка балобана под номером KP337902.1. Использование алгоритмов SWISS-MODEL и последующая визуализация в программе iCn3D (рисунок 29) позволили установить положение 191, 230, 294, 305 и 331 сайтов аминокислотных остатков в Н-спиралях белка 11, 13, 16, 17 и 18 соответственно.

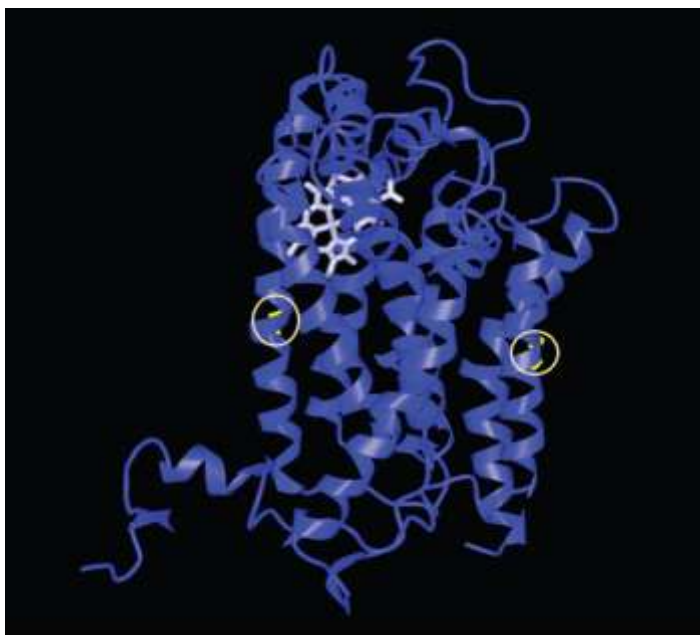


Рисунок 29 - Трехмерная структура цитохрома *b*, смоделированная на основе гомологии белков на сервере SWISS-MODEL и визуализированная в сетевой программе iCn3D. Желтым выделено положение сайтов аминокислотных замен – 191 на Н-спирали 11 (слева) и 331 на Н-спирали 18 (справа). Неме *b* обозначен светло-серым цветом.

Согласно результатам расчета методами I-TASSER установлено, что активный центр белка, комплементарно связывающийся с железосодержащим лигандом heme *b* (протогем IX), сформирован более чем двадцатью, от 42 до 187, специфичными сайтами посадки. В то же время взаимодействие цит *b* с убихиноном (кофермент Q) осуществляется через 13 аминокислотных остатков, от 18 до 229. Исследуемые сайты замен, 191 и 230, находятся вблизи от ключевых участков белка цит *b*, взаимодействующих с коферментом Q и протогемом IX. Предположительно они способны влиять на формирование функциональных связей указанных структурных элементов электрон-транспортной цепи с цит *b*. Для сайтов 230 и 294 предсказано вредное, а для остальных рассматриваемых замен нейтральное воздействие на функцию цитохрома *b* балобана. При прогнозировании сайты аминокислотных замен 191 и 331 (рисунок 29) получили соответственно 1.506 и 1.851 баллов относительно порогового значения.

Среди 16 особей исследуемых видов найдено семь гаплотипов *cyt b*, совокупно имеющих три ненейтральные аминокислотные замены, находящиеся под действием положительного отбора согласно программе TreeSAAP. Замена 191 аминокислоты наблюдается у всех балобанов с Крымского полуострова, при этом у образца FC38 обнаружены еще две аминокислотные замены. Для кодона 191 установлены изменения двух аминокислотных свойств, соответствующих заданным параметрам: энергия слабых (невалентных) взаимодействий (short and medium range non-bonded energy) и сжимаемость (compressibility) [135]. Эти свойства отнесены к третьей и пятой категориям значимости с вероятностью 99.9% и значениями 3.519 и 3.391 соответственно. Для кодона 305 наблюдается изменение свойств энергии слабых (невалентных) взаимодействий, а для кодона 331 – дополнительно свойства сжимаемости. У сапсана для аминокислотной замены в позиции 331 цитохрома *b* также обнаружено изменение этих двух характеристик. Предположительно, свойства найденных аминокислотных замен (энергия невалентных взаимодействий и сжимаемость) находятся под влиянием положительного стабилизирующего отбора и близкого к дестабилизирующему отбора соответственно.

Полученные результаты позволяют предполагать, что в формировании найденных митохондриальных гаплотипов балобанов с запада ареала могли принимать участие не только генетико-автоматические процессы, связанные с прохождением через рефугиумы, но и отбор, поддерживающий стабильную функциональную активность некоторых белков электрон-транспортной цепи. У балобанов, обитающих на Крымском полуострове, на фоне общей низкой изменчивости исследованных последовательностей гена *cyt b* выявлены три аминокислотные замены (191, 305 и 331 кодоны) с изменяющимися физико-химическими свойствами и, возможно, поддерживаемые положительным отбором. При этом замена в кодоне 191 является филогенетически значимой, формирующей отдельную гаплогруппу.

Подраздел 5.2. Эпизоды полной замены области промотора и межгенного спейсера у консервативного гена *ras85D* и быстрое восстановление его функциональной активности в ходе эволюционной дивергенции видов дрозофил

Эволюционно-консервативные мотивы (ЕСМ). Локус, представляющий интерес как потенциально содержащий близко расположенные элементы регуляции экспрессии *ras85D*, составляет спейсер между TSS *ras85D* и TSS предыдущего гена, 5'UTR *ras85D* и первый интрон, разрывающий 5'UTR примерно посередине. Формальным критерием общего эволюционного происхождения является значимая гомология последовательностей, полученная при выравнивании. С помощью алгоритмов поиска эволюционно-

консервативных мотивов MEME и MAST были определены наборы ЕСМ, присутствующих в составе данного локуса у большинства исследованных видов дрозофил.

Границы ЕСМs и значимость гомологии зависят как от степени их сходства, так и от их общего числа в общем наборе последовательностей. Добавление в анализ близкородственных видов с высокой гомологией последовательностей увеличивает шансы выявления участков, сверхпредставленных в данных последовательностях. Поэтому поиск ЕСМs проводился в двух вариантах – по 23-м видам дрозофил из разных филогенетических клад (вариант А, обозначения ЕСМ*А) и по 37-и (вариант В, обозначения ЕСМ*В), включая близкородственные виды из подгрупп *melanogaster* и *pseudoobscura* и группы *virilis*.

Результаты анализа последовательностей 23-х видов в графическом виде представлены на рисунке 30. На рисунке последовательности выровнены в области от промотора до 1-го экзона. Виды подродов *Drosophila* и *Sophophora* сгруппированы в верхней и нижней частях схемы соответственно, вид *D. busckii*, представитель подрода *Dorsilopha*, расположен между ними. Приведены значения статистической значимости паттернов ЕСМs на каждой последовательности, оцененные после их выделения и картирования алгоритмами MEME и после дополнительного выравнивания алгоритмами MAST. В соответствии с этими значениями, только последовательность *D. willistoni* имеет низкие, хотя и значимые E-value, что связано с вырожденностью большинства выявленных ЕСМs у этого вида.

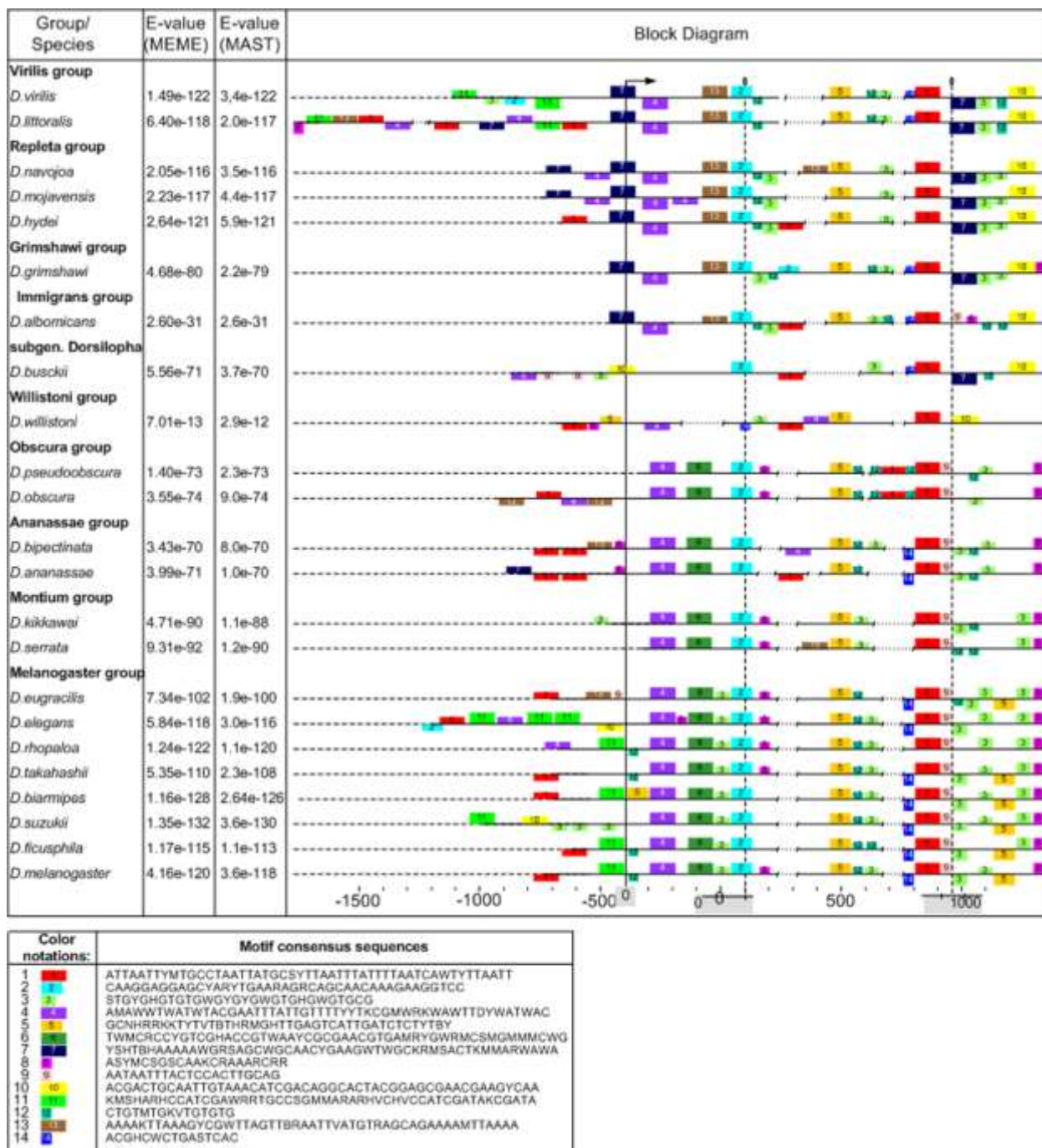


Рисунок 30 - Изменчивость межгенного спейсера, области промотора, 5'UTR и интрона 1 у видов дрозофил разной степени родства

а - схема распределения эволюционно консервативных последовательностей и инсерционно-делеционного полиморфизма в анализируемой области гена *ras85D*. б - структура эволюционно-консервативных последовательностей, полученных с применением алгоритма MEME.

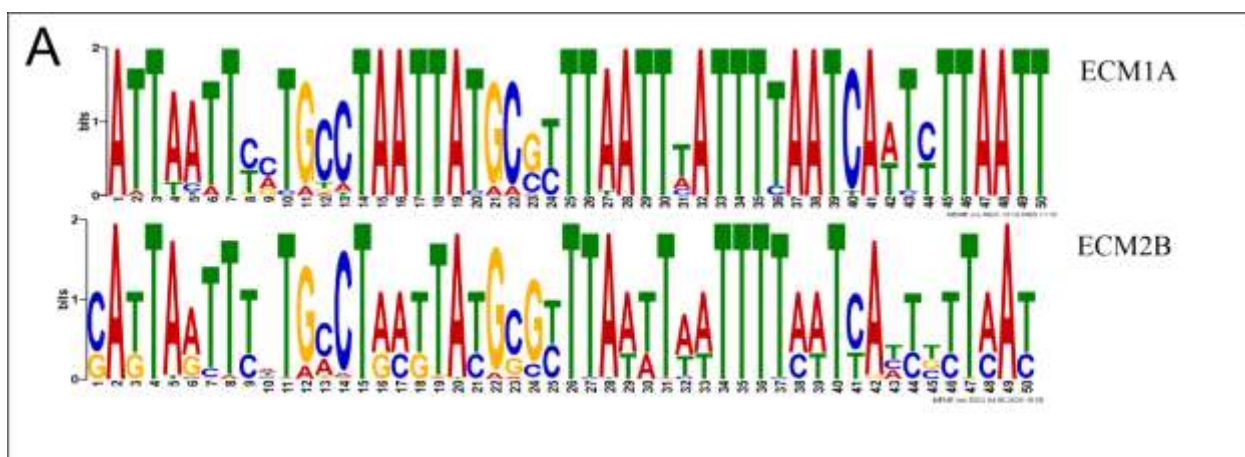
На схеме боксы над линией показывают расположение ECMs на «+»-цепи, под линией – на «-»-цепи. Уменьшенная высота боксов маркирует вырожденные ECMs. Темно-серые боксы показывают делеции, выявленные при выравнивании последовательностей. В верхней части - виды подрода *Drosophila* (*D. virilis* – *D. albomicans*), в нижней части – виды подрода *Sophophora* (*D. willistoni* – *D. melanogaster*). *Dorsilopha D. busckii* (подрод *Dorsilopha*) расположен между подродами *Drosophila* и *Sophophora*.

Ряд выявленных консервативных мотивов характерен для обоих вариантов анализа, не совпадая в точности, но проявляя значительное сходство. Они занимают совпадающие или перекрывающиеся позиции относительно границ структурных элементов гена. Соответствия их порядковых номеров приведены в таблица 8. Пример сравнения логотипов последовательностей (*sequence logo*) приведен на рисунке 31.

Таблица 8 - Гомология эволюционно-консервативных мотивов, выделенных из полного (37 sp.) и редуцированного (23 sp.) набора последовательностей области промотора *ras85D*.

Set A (23 sp.), conservative_sequence	цепь	Set B (37 sp.), conservative_sequence	цепь
ECM2 (E=3.6e-257)	+	ECM1 (E=1.4e-734)	+
ECM1 (E=2.7e-315)	+	ECM2 (E=1.3e-738)	+
ECM3 (E=1.2e-234)	-	ECM3 (E=1.8e-356)	+
ECM12 (E=2.4e-028)	-	ECM3 (E=1.8e-356)	+
ECM4 (E=7.9e-135)	+	ECM4 (E=7.9e-296)	+
ECM4 (E=7.9e-135)	+	ECM13 (E=4.7e-197)	-
ECM5 (E=1.3e-109)	+	ECM5 (E=2.8e-441)	+
ECM7 (E=9.7e-069)	-	ECM8 (E=3.5e-220)	+
ECM7 (E=9.7e-069)	+	ECM9 (E=1.9e-294)	+
ECM4 (E=7.9e-135)	-	ECM7 (E=3.7e-271)	+/-*
ECM13 (E=3.8e-026)	+	ECM11 (E=1.2e-257)	+

* - мотив 7 из 2-го набора представлен вырожденной палиндромной последовательностью, гомологичной в 5'-области фрагменту мотива 4 с «минус» цепи из 1-го набора, и в 3' – области – этому же фрагменту с «плюс» цепи.



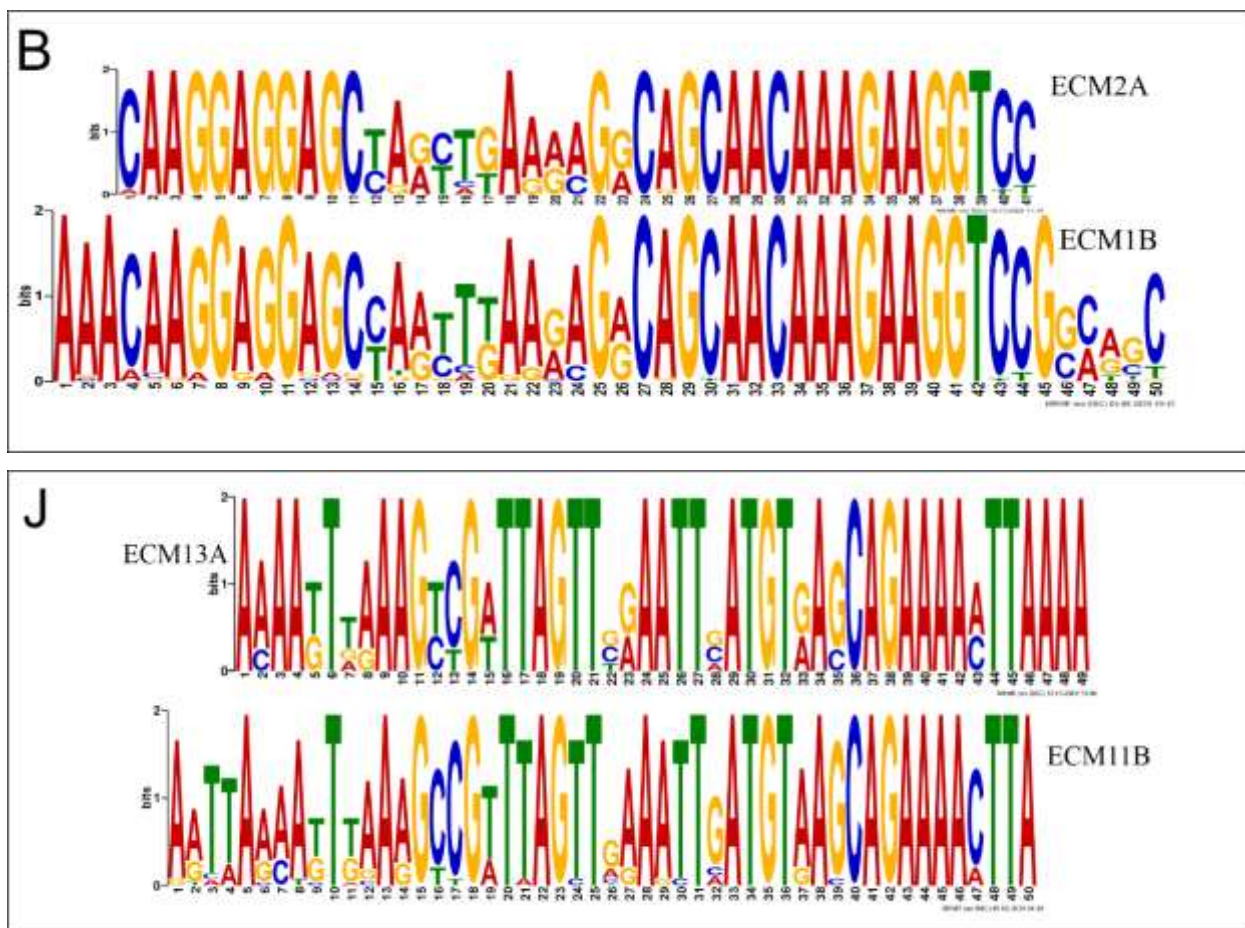


Рисунок 31 - Sequence logos выявленных ЕСМ. Примеры структурной гомологии эволюционно-консервативных мотивов, полученных из наборов последовательностей от 23-х и 37-и видов
(А) ЕСМ2А : ЕСМ1В; (В) ЕСМ1А : ЕСМ2В; (J) ЕСМ13А : ЕСМ11В.

Указывая номер ЕСМ, здесь и далее мы будем иметь ввиду порядковые номера мотивов, полученных при анализе набора последовательностей от 23-х видов, если не указано иное. Первые пять ЕСМs и мотив 12 представлены у всех видов. ЕСМs 3 и 12 представлены фрагментами, обогащенными АС-динуклеотидными повторами, и расположены в средней части интрона на плюс-цепи и во второй половине 5'UTR как на плюс-, так и на минус цепи. Распределение ЕСМs 1, 2, 3 и 5 предполагает, что область первого интрона и участка 5'UTR от небольшого фрагмента, фланкирующего интрон выше по течению и соответствующего ЕСМ2, до первого экзона имеет у всех видов общее эволюционное происхождение. Можно видеть, что эта область имеет многочисленные делеции и возможные вырожденные дупликации участков последовательности. ЕСМ4, расположенный вблизи TSS, представлен у всех видов, но его расположение различается у видов из разных подродов дрозофил. У представителей подрода *drosophila* этот мотив находится на минус-цепи и граничит с ЕСМ7, расположенным в области промотора и специфичным для данных видов. ЕСМ7 представлен у этих видов также сразу за областью

интрона на противоположной цепи. У представителей подрода *sophophora* ЕСМ4 расположен на плюс-цепи и смещен на 49 п.о. от TSS ниже по течению. Исключение составляет вид *D. willistoni*, дивергировавший раньше других от общего предка представленных видов подрода *sophophora*, у которого вырожденная последовательность ЕСМ4 также определяется на минус цепи, как и у видов подрода *drosophila*. У *D. busckii*, представителя подрода *Dorsilopha*, этот мотив в вырожденном виде смещен выше по течению от TSS и расположен на минус цепи в начале межгенного спейсера (рисунок 28).

Область межгенного спейсера наиболее изменчива, ее размеры меняются от более 2000 п.о. у представителей гр. *virilis* до практически полного отсутствия у ряда видов гр. *obscura* (*D. pseudoobscura*, *D. persimilis*), у *D. serrata* из гр. *montium*. Гомологию последовательностей можно выявить только в отдельных группах видов, имеющих значительную филогенетическую близость. Так, ЕСМ11, выявлен у видов гр. *melanogaster*, субгрупп *melanogaster*, *rhopaloea*, *ficusfila*, *suzukii*. Его позиция может существенно смещаться относительно промотора, в частности за счет инсерций и размножения АС-повторов в составе ЕСМ3, как у *D. suzukii*. В подрode *Drosophila* ЕСМ11 обнаружен только в группе *virilis*. Он расположен на минус-цепи дистальнее промотора. Общая картина изменчивости всей некодирующей последовательности позволяет предположить, что основную роль в регуляции экспрессии гена *ras85D* играют мотивы, расположенные в области 5'UTR и 1-го интрона. Даже в тех случаях, когда на эту область приходится перестройка, ЕСМ4 восстанавливает свое положение.

Генное окружение *ras85D* и перестройки. Ген *ras85D* расположен в составе Е-элемента Меллера, который соответствует 2-й хромосоме у дрозофил группы *virilis* [136] и правому плечу хромосомы 3 у дрозофил группы *melanogaster*. У вида *D. virilis* ген находится на плюс-цепи хромосомы, у *D. melanogaster* – на минус-цепи. В результате закрепившихся в ходе эволюции геномных перестроек ближайшее генное окружение *ras85D* у видов группы *virilis* отличается от всех остальных видов дрозофил. Гены, расположенные «выше по течению» (up-stream) от гена *ras85D* у видов группы *virilis* (*GJ23372* (ортолог гена *CG31344 D. melanogaster*), *GJ23373* (*D.m. Rpb7*) и *GJ23843* (*D.m. CG12241*)), отдалены в геноме *D. melanogaster* на 5710 kВ. Гены, находящиеся в этом месте у остальных видов (кроме *D. willistoni*): *Rlb1* (ортолог гена *GJ10856* у *D. virilis*), *mRpL47* (*D.v. GJ10316*), *JHDM2* (*D.v. GJ10857*) и *CG8176* (*D.v. GJ10858*), в геноме *D. virilis* отдалены на 680 Kb от гена *ras85D*. Генное окружение, характерное для видов группы *melanogaster*, остается неизменным и у других видов дрозофил из обоих подродов, например, у *D. pseudoobscura*, *D. ananassae*, *D. grimshawi*, *D. mojavensis*. Только у *D. willistoni* два гена -

Rlb1 и *mRpL47* в результате инверсионной перестройки поменялись местами и расположены на противоположной цепи хромосомы.

Участие мобильных элементов в формировании структуры области промотора гена *ras85D*. Поиск следов инсерций мобильных элементов проводился по всей длине последовательности от предполагаемой TSS расположенного upstream гена до 1-го экзона *ras85D*. Результаты анализа приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Гомология последовательностей 5'UTR, первого интрона и межгенного спейсера видов дрозофил с последовательностями транспозонов.

species	DNA Transposon	LTR Retrotr.	Non-LTR Retrotr.
<i>D.willistoni</i>	Homo5_hAT ^{IS}	Gypsy1 ^P	-
<i>D.pseudoobscura</i>	P-1 ^{IN*}	-	L2-10 ^{IN*}
<i>D.persimilis</i>	-	-	L2-10 ^{IN*}
<i>D.obscura</i>	P-3 ^{IS} , Helitron-N1 ^{IS} , HelitronN-1 ^{IS} , In.rep ^{IS}	-	-
<i>D.suzukii</i>	Homo10 hAT ^{IS}	Gypsy-5 ^{IS} , Gypsy-23 ^{IN***}	-
<i>D.takahashii</i>	Hoana5/hAT ^{P*}	-	-
<i>D.eugracilis</i>	-	invader3-Gypsy ^{IS} , Gypsy-11 ^{IS}	-
<i>D.elegans</i>	P-1N1 ^{IS} , piggyBac-N1 ^{IS} , Hoana5/hAT ^{P*} , hAT-1 ^{P*}	Gypsy-1 ^{IS} , Gypsy-N1B ^{5'UTR*}	-
<i>D.ananassae</i>	-	Gypsy1-LTR ^{IS*} , Gypsy20-I ^{IS*}	-
<i>D.bipectinata</i>	Transib-8 ^{IS*} , Transib-2 ^{IS*}	Gypsy-37 ^{IS*} , BEL-17 ^{IS*}	-
<i>D.kikkawai</i>	Transib-1 ^{IS}	Gypsy-24 ^{IS} , Gypsy-2 ^{IS}	-
<i>D.busckii</i>	-	Gypsy-1 ^{IS}	-
<i>D.albomicans</i>	Mariner-4 ^{IS}	Gypsy-24 ^{P***}	-
<i>D.hydei</i>	-	-	R1-4B ^{IS***}
<i>D.mojavensis</i>	hAT-2 ^{IS*}	-	Jockey-7 ^{IS*} , R1-3 ^{IN***}
<i>D.grimshawi</i>	-	BEL-7 ^{IS**}	CR1-1 ^{IS***}
Sp. gr. virilis	X – In.rep. ^{IS*}	-	-
<i>D.kanekoi</i>	hAT-8 ^{IS*V/K} , Helitron-like-5 ^{IS*V/K}	-	L2-10 ^{IN****}
<i>D.ezoana</i>	DNA8-78 ^{IS*V/K} , Helitron-N10 ^{IS*V/K}	Gypsy-22 ^{IN*****}	-
<i>D.littoralis</i>	hAT-11 ^{IS*V/K} , Helitron-N10 ^{IS*V/K} , hAT-N36 ^{IS*V/K}	Gypsy-22 ^{IN*****}	-
<i>D.lummei</i>	LTR Retrotr.	Gypsy-1 ^{IS*V/K} , Gypsy-22 ^{IN*****}	-
<i>D.virilis</i>	PARISa ^{5'UTR***}	BEL-10 ^{IN*****}	-
ancestral virilis-kanekoi s/gr.	Polinton-2 ^{IS*V/K} , Helitron-N10 ^{IS*V/K} , Helitron-1 ^{IS*V/K}	Gypsy-22 ^{IN*****}	-

Верхние индексы указывают на регион-специфическое положение мотива (IS-межгенный спейсер, Р-промотор, 5'UTR, IN-первый интрон), а звездочки обозначают гомологию выровненных последовательностей на уровне: * V / K - подгруппы *virilis* - *kanekoi*, * - собственная группа видов, ** - две родственные группы видов, *** - собственный подрод, **** - два родственных подрода. Предковая последовательность группы *virilis* была сгенерирована в программе MEGA (метод максимального правдоподобия, Тамура 3-параметрическая модель + гамма-распределение).

Из результатов анализа были исключены элементы последовательности, проявляющие гомологию с участками *transposable elements* у всех проанализированных видов. Исключены также варианты гомологии, представленные преимущественно микросателлитными повторами.

Согласно результатам, в формировании эволюционной изменчивости области промотора гена *ras85D* могли принимать участие ДНК-транспозоны (*DNA transposons*), относящиеся к суперсемействам *P*, *Helitron*, *hAT*, *Mariner*, *PiggyBac*, *Transib*, *Paris*, *DNA8* и *Polinton*; ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (*LTR Retrotransposons*), такие как *Gypsy*, *BEL*, и ретротранспозоны без длинных концевых повторов (*Non-LTR Retrotransposons*), такие как *L2*, *R1*. События встраивания и потери транспозонов в область исследуемой некодирующей последовательности в ходе эволюционной дивергенции видов дрозофил картированы на филогенетическом дереве видов (рисунок 32).

Область промотора гена *ras85D* у видов подродов *Drosophila* и *Sophophora* представлена тремя основными паттернами расположения ECMs, имеющими независимое происхождение. 54 нуклеотида перед ECM4 у видов групп *montium*, *obscura* и *ananassae*, являющиеся частью промотора, демонстрируют выраженную гомологию не только между собой, но также с представителем рода *Scaptodrosophila* – *S. lebanonensis*, что указывает на предковое состояние данного участка у этих трех групп видов. В данном участке обнаруживается гомология с началом LTR ретротранспозона *BEL*, которая продолжается у *D. ananassae* и *D. bipectinata* в дистальном направлении. В расположенной выше части спейсера у этих видов проявляется гомология с терминальными повторами of DNA-транспозонга *Transib* и LTR-ретротранспозона *Gypsy*. У *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, а также *D. serrata* гомология в данной области нарушена крупными делециями, что может быть следствием рекомбинации между сходными мотивами в составе мобильных элементов, участвующих в формировании данной области. Так у *D. kikkawai* в этой области обнаруживаются следы встраивания транспозона группы *Gypsy*, а у *D. obscura* инвертированные повторы фланкируют область межгенного спейсера, приближаясь в проксимальной части практически вплотную к области общей гомологии. Данные повторы

расположены в непосредственной близости или перекрываются с мотивами, характерными для концевых повторов ДНК-транспозонов.

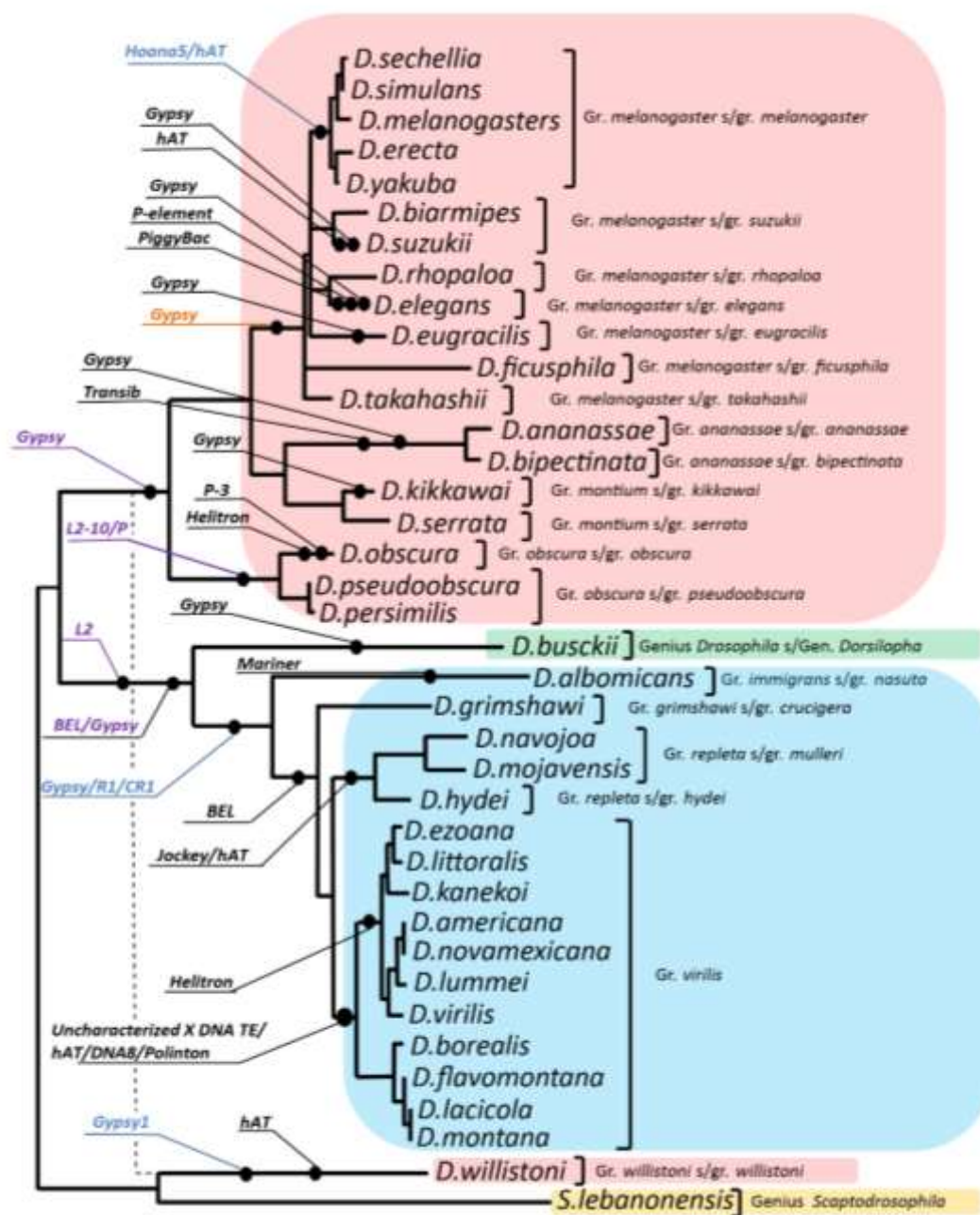


Рисунок 32 - Распределение выявленных событий инсерций и делеций транспозонов на эволюционном дереве проанализированных видов дрозофил

Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия, с применением Tamura 3-parameter model по последовательностям гена *ras85D* и 3'UTR 37 видов дрозофил. Выноски определяют классы транспозонов и события вставки на ветвях эволюционного дерева. Черным цветом отмечены инсерционные события в область межгенного спейсера, голубым – в область промотора, фиолетовым – в первый интрон, оранжевым – в проксимальную часть 5'UTR.

Для видов группы *melanogaster* по последовательностям *D. takahashii* и *D. elegans* удалось идентифицировать гомологию области промотора с инвертированными повторами DNA transposons суперсемейства hAT. Это указывает на общее эволюционное происхождение последовательности межгенного спейсера, включая промотор *ras85D*, у большинства видов этой группы, путем инсерции мобильного элемента до дивергенции основных подгрупп группы *melanogaster*. У видов подгрупп *melanogaster*, *ficuspila* и *rhopaloea* делетирована короткая базальная часть данной инсерции, порядка 10 п.о. У видов *D. elegans*, *D. suzukii* и *D. eugracilis* отмечены более поздние независимые инсерции мобильных элементов, относящихся к группам *P*, *hAT* и *Gypsy*, в область первой инсерции в районе промотора. При этом у *D. eugracilis* это привело к потере области общей гомологии с другими видами. Область спейсера, имеющая общее происхождение у видов данной группы полиморфна и накопила множественные делеции и точечные замены в дистальной части. При этом границы делеций у разных видов не совпадают, что свидетельствует о независимых событиях потери участков последовательности. У филогенетически более далеких видов субгрупп *melanogaster* и *suzukii* делеции накапливаются вдоль всей области гомологии, и без предварительного выравнивания с другими сестринскими видами, общее эволюционное происхождение этих участков неочевидно.

У *D. willisoni* область надежной гомологии некодирующей последовательности начинается в районе первого интрона, но небольшой фрагмент последовательности длиной 20 п.о. в области промотора показывает строгую гомологию с видами групп *montium*, *obscura* и *ananassae*. Область межгенного спейсера (IGS) у этого вида сформировалась в результате инверсионной перестройки, и наиболее вероятным участником этого события является ретротранспозон, родственник *Gypsy*, гомология с LTR которого показана для участка последовательности *D. willisoni* сразу за областью промотора.

У видов подрода *Drosophila* (*D. hydei* и *D. grimshawi*) ECM7 в области промотора проявляет гомологию (65-70%) с 5'-UTR of Non-LTR retrotransposons R1 и CR1. Различия последовательностей проявляются на участке выше промотора на 70 п.о. и приводят к формированию четырех независимых паттернов, характеризующих виды групп *virilis*, *repleta*, *grimshawi* и *immigrans*. У *D. albomicans* (гр. *immigrans*) данная область проявляет гомологию с DNA transposon Mariner, у *D. grimshawi* – с LTR retrotransposon BEL, у *D. mojaveensis* наблюдалось сходство с Non-LTR retrotransposon Jockey или DNA transposon hAT. У видов группы *virilis* инверсионная перестройка, захватившая район промотора гена *ras85D*, сопровождалась появлением инвертированных повторов, фланкирующих почти весь межгенный спейсер. Оценки положения и структуры повторов у 11 видов группы *virilis*, проведенные с помощью инструмента YASS, свидетельствуют о принципиальном

сходстве инвертированных повторов и их присутствии у всех видов данной группы. В районах начала и конца межгенного спейсера присутствует от двух до четырех фрагментов, расположенных последовательно и демонстрирующих значимую гомологию инвертированных последовательностей (Score > 82; bit-score > 25.3; E-value < 0.044). Выравнивание всей области межгенного спейсера видов группы *virilis* представлено на схеме (рисунок 33). Область прямых повторов занимает центральную часть межгенного спейсера, и отдельные прямые повторы, представляющие собой дублицированные участки левого инвертированного повтора (далее – Ir-a), расположены в его средней части. В результате Ir-a составляет 730 п.о. и оказывается длиннее правого инвертированного повтора (далее - Ir-b), составляющего 380 п.о. Оба повтора претерпели в ходе эволюции у разных видов разнообразные делеции, как видно из схемы расположения гомологичных участков последовательности у разных видов на нижней части рисунок 33. Делеционный механизм дивергенции повторов подтверждается наличием выраженной гомологии перекрывающихся фрагментов этих повторов. Вырожденные последовательности, гомологичные инвертированным повторам Ir-a и Ir-b от каждого из 11 видов группы обнаруживаются в геноме *D. virilis* методом BLAST в 37 позициях в составе разных скаффолдов. Их длина составляла от 54-х до 310-и п.о., при этом длина 16 фрагментов превышала 190 п.о.

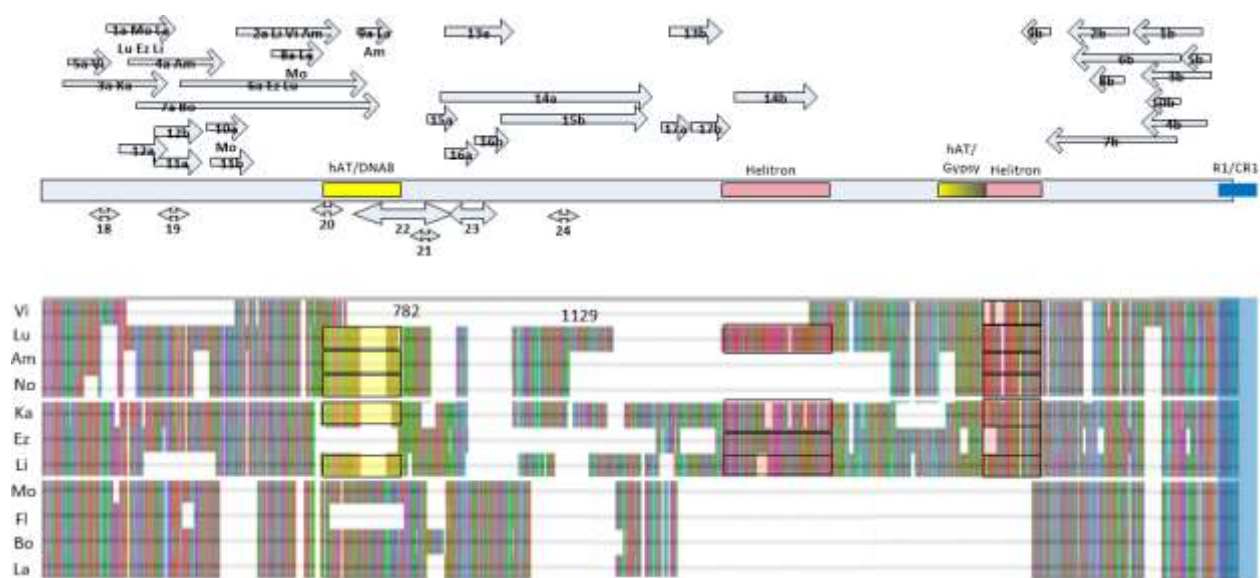


Рисунок 33 - Структура расположенного выше межгенного спейсера *gas85D* у видов *Drosophila* группы *virilis*

Стрелки указывают пары прямых и инвертированных повторов, а также палиндромы, идентифицированные в вышестоящем межгенном спейсере *gas85D* у видов *Drosophila* группы *virilis*. Гомологичные повторы обозначены одинаковыми номерами. Дистальный повтор каждой пары обозначен «а», проксимальный - «b». Vi – *D. virilis*; Lu – *D. lummei*; Am

– *D. americana*; No – *D. novamexicana*; Ka – *D. kanekoi*; Ez – *D. ezoana*; Li – *D. littoralis*; Mo – *D. montana*; Fl – *D. flavomontana*; Bo – *D. borealis*; La – *D. lacicola*.

Мы предположили, что следы длинных концевых повторов данного мобильного элемента могут быть обнаружены по границам древних перестроек. В том числе той, которая привела к изменению генного окружения гена *ras85D* у предка группы *virilis* относительно порядка генов, характерного для других видов подродов *Drosophila* и *Sophophora*. Для получения структуры, характерной для группы *virilis*, из предковой, сохранившейся у *D.melanogaster* и *D.grimshawi*, необходимо, как минимум, две инверсии. Одна приходится на межгенные спейсеры генов *ras85D* – *Rlb1* и *CG31344* – *Caf1-55*, а другая разворачивает область образовавшегося блока *Rlb1* – *Caf1-55* в противоположную сторону (рисунок 34). Порядок генов на участке второй хромосомы, соответствующем скаффолдам *sc_13047* и *sc_12855*, у вида *D. virilis* отличается от других видов группы из-за еще одной инверсии (2A), описанной ранее [137], которая произошла при участии ДНК-транспозона DAIBAM (суперсемейство hAT) и затронула с одной стороны все тот же спейсер *Caf1-55* – *Rlb1*, а с другой захватила ген *invadolin*. Как и ожидалось, на предпромоторную область гена *Rlb1 D.virilis* приходится одна из копий инвертированного повтора Ir-b длиной 190 п.о., проявляющая наибольшую гомологию с повтором Ir-b *D. lacicola*. Она занимает область от инвертированного повтора DAIBAM до TSS гена *Rlb1* и продолжается дальше в область 5'-UTR гена *Rlb1*. В геномах *D. montana* и *D. americana*, не подвергшихся перестройке 2A, область гомологии с повторами длиннее, и составляет порядка 300 п.о., т.е. более 80% повтора Ir-b.

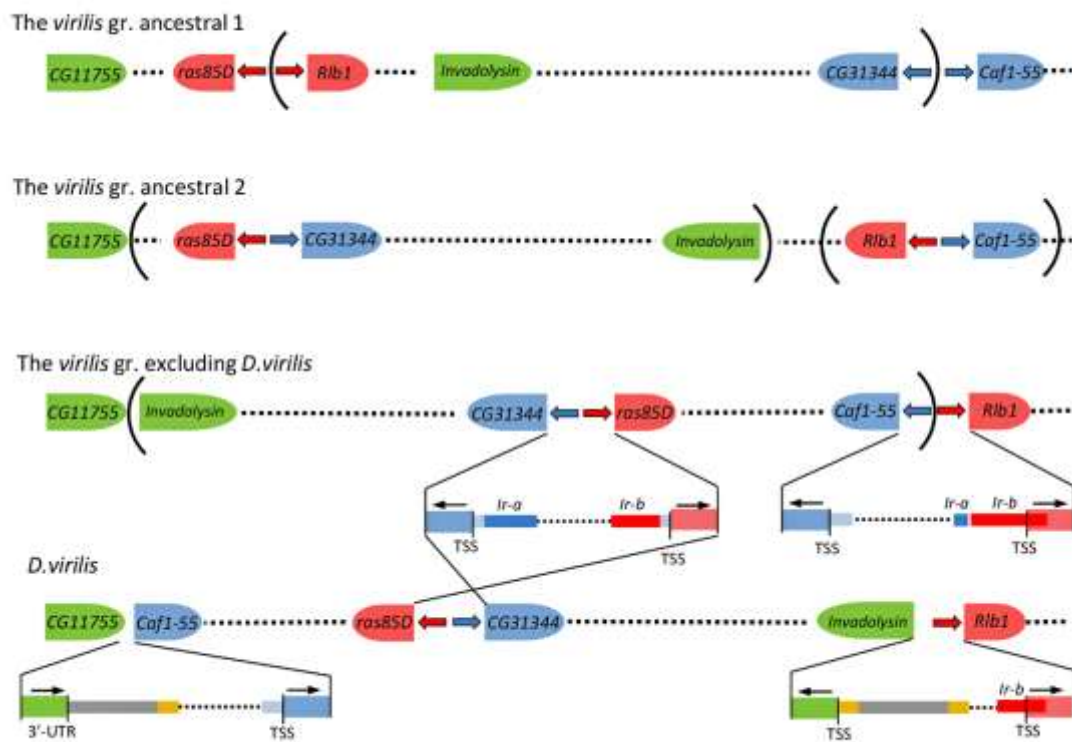


Рисунок 34 - Схема возможных перестроек хромосомы 2 у предка *Drosophila* группы *virilis*, которые необходимы для изменения генного окружения по сравнению с сохраненным у более далеких видов

Синие и красные стрелки - инвертированные повторы *Ir-a* и *Ir-b*, соответственно, которые отмечают сайты встраивания двух копий *Uncharacterized X DNA Transposon* в спейсеры *ras85D - Rlb1* и *CG31344 - Caf1-55* у предка группа *virilis*. Элементы *DAIBAM* окрашены в желтый цвет (инвертированные концевые повторы) и серый [37]. Остатки предковых последовательностей окрашены в голубой цвет. Номенклатура генов соответствует названиям ортологов *D. melanogaster*. Изображение не в масштабе.

Еще одна копия, которая должна находиться в районе *Caf1-55* и соответствовать *Ir-a*, не была обнаружена в геноме *D. virilis*. Однако в геномах *D. americana* и *D. montana* в центральной части спейсера *Caf1-55 - Rlb1*, выше по течению области гомологии с элементом *Ir-b* на 46 п.о., расположен фрагмент длиной 83 п.о. из правой части повтора *Ir-a*, но ориентированный головой в сторону гена *Caf1-55*, т.е. в направлении, противоположном ожидаемому. Сходный эффект наблюдается в экспериментах с индуцированной геномной нестабильностью с химерными ДНК транспозонами Р *D. melanogaster*, имеющими нарушения фланкирующих инвертированных повторов [138, 139]. Активация транспозазы в этом случае приводит к формированию полных или частичных делеций самих копий транспозонов и downstream последовательностей, и к инсерциям инвертированных фрагментов последовательностей. Анализ распределения гомологичных повторов в геноме *D. virilis* и положение таких повторов в области границ

перестройки, захватившей межгенный спейсер гена *ras85D* у видов группы *virilis*, позволяет определить эти повторы как фрагменты LTR древнего ДНК-транспозона.

Учитывая общее происхождение и гомологию повторов Ir-b из районов межгенных спейсеров *ras85D* – CG31344 и *Rlb1* – *invadolysin* у *D. virilis*, можно оценить время дивергенции этих повторов, прошедшее с момента начала накопления изменчивости между двумя копиями транспозонов, а также время дивергенции правого и левого LTR одного транспозона. Дивергенция двух повторов (Ir-b) предковой копии транспозона из спейсера *ras85D* - *Rlb1* показана относительно повторов из другой копии (Ir-a) (внешняя группа) (рисунок 35). Timetree построено с учетом калибровочных оценок времени дивергенции видов *D. lummei* – *D. novamexicana* (2.9 млн. лет), видов субгруппы *D. montana* (4.8 млн. лет) и всех видов группы *virilis* (9-9.5 млн. лет), полученных Morales-Hojas с использованием мультилокусных данных [140]. Время дивергенции повторов Ir-b, расположенных рядом с генами *ras85D* и *Rlb1*, т.е. с момента, когда транспозон утратил свою автономность, составляет при этом 20 млн. лет.

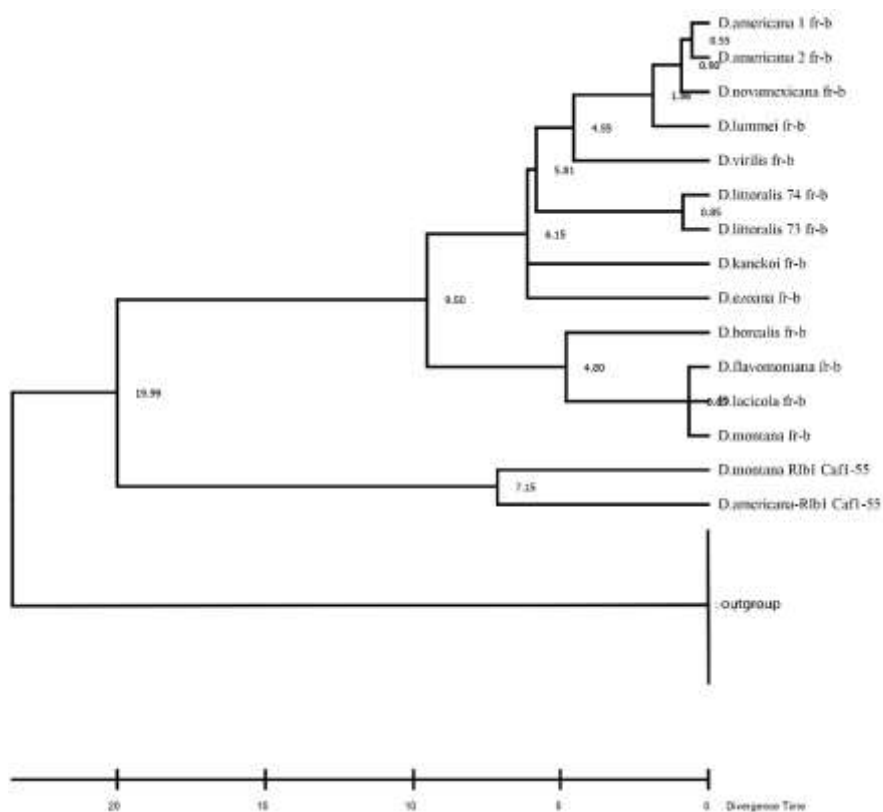


Рисунок 35 - Расчетное время возникновения предковой перестройки, основанное на времени накопления вариабельности гомологичных повторов Ir-b

Шкала времени в нижней части рисунка дана в миллионах лет. Временное дерево, полученное с помощью метода RelTime [141, 142]. Временное дерево было вычислено с использованием трех калибровочных ограничений. Расчетное значение логарифма правдоподобия показанной топологии составляет -4498,05. Дискретное гамма-распределение использовалось для моделирования различий в скорости эволюции между сайтами (три категории (+ G, параметр = 3,0235)). Дерево нарисовано в масштабе, длина

ветвей измеряется относительным числом замен на сайт. Этот анализ включал 28 нуклеотидных последовательностей. В окончательном наборе данных было всего 700 позиций.

Можно заключить, что мобильные элементы «отметили» своим присутствием практически все события, связанные со значительными изменениями последовательности межгенного спейсера, расположенного «выше по течению» гена *ras85D*. При сравнении родственных видов можно видеть деградацию областей, сформированных в результате инсерций и перестроек. Причем отсутствие следов кодирующих последовательностей, характерных для соответствующих классов транспозонов, в составе межгенного спейсера у родственных видов, свидетельствует о быстрой деградации значительной части последовательности мобильных элементов.

Структура и источники происхождения промотора *ras85D* у разных видов. Замена области промотора предполагает, что при отсутствии новой точки сборки транскрипционного комплекса ген будет инактивирован, и в случае консервативных генов с ключевыми функциями в значимых биологических процессах полученный летальный аллель будет вытеснен из популяции. Присутствие таких аллелей, фиксированных у разных видов, свидетельствует о высокой скорости восстановления функциональной активности гена после перестройки области промотора. Рассмотрим структуру промоторов и точек старта транскрипции (TSS) гена *ras85D* и его ортологов у изученных видов.

Использование публично доступных баз NCBI: SRA (для библиотек cDNA), EST, Nucleotide, TSA, тем не менее, оставляет открытым вопрос о соответствии представленных в них данных по cDNA реальному положению TSS. Для оценки точности определения TSS по этим данным мы сравнили полученные результаты с данными анализа TSS стандартными методами определения экпированных концов транскриптов - cap-trapped expressed sequence tag (EST), cap analysis of gene expression (CAGE), 5'-end serial analysis of gene expression (SAGE). Форма распределения TSS строго связана с особенностями регуляции экспрессии – узкие промоторы определяют экспрессию генов «роскоши» (luxury genes), имеющих пространственное и временное ограничение экспрессии, в то время как широкие промоторы определяют постоянную и повсеместную экспрессию генов домашнего хозяйства (housekeeping genes) [143-146].

Ген *ras85D* экспрессируется во всех клетках организма на протяжении всей жизни, но его уровень экспрессии в зависимости от ткани и стадии развития может отличаться на порядок и более, в соответствии с данными SRA из публичной базы данных ENA (European Nucleotide Archive), занимая, таким образом, промежуточное положение между генами домашнего хозяйства и регулируемыми генами. Форма промотора этого гена также

демонстрирует признаки промотора “широкого с пиком”: ряды расположены плотно на участке примерно 100 п.о., и имеют выраженный пик в середине участка (рисунок 36). На рисунке видно, что SAGE и CAGE данные хорошо подтверждают друг друга, отличаясь только большей выраженностью пиков TSS для данных SAGE, что вызвано, вероятно, недоучетом биохимического фона, формируемого деградирующими и повторно экспонированными фрагментами. Данные EST также подтверждают отмеченную форму промотора, несколько сужая область локализации TSS и приближая ее к узким промоторам, что связано с недостаточностью данных EST [146]. Данные SRA не позволяют точно определить форму промотора, но достаточно точно маркируют область мажорной экспрессии гена.

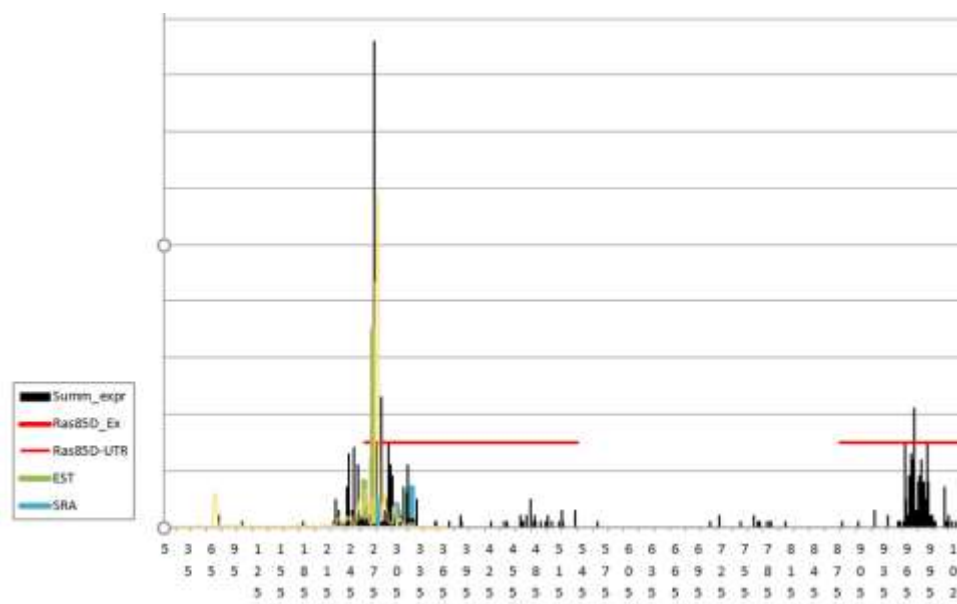
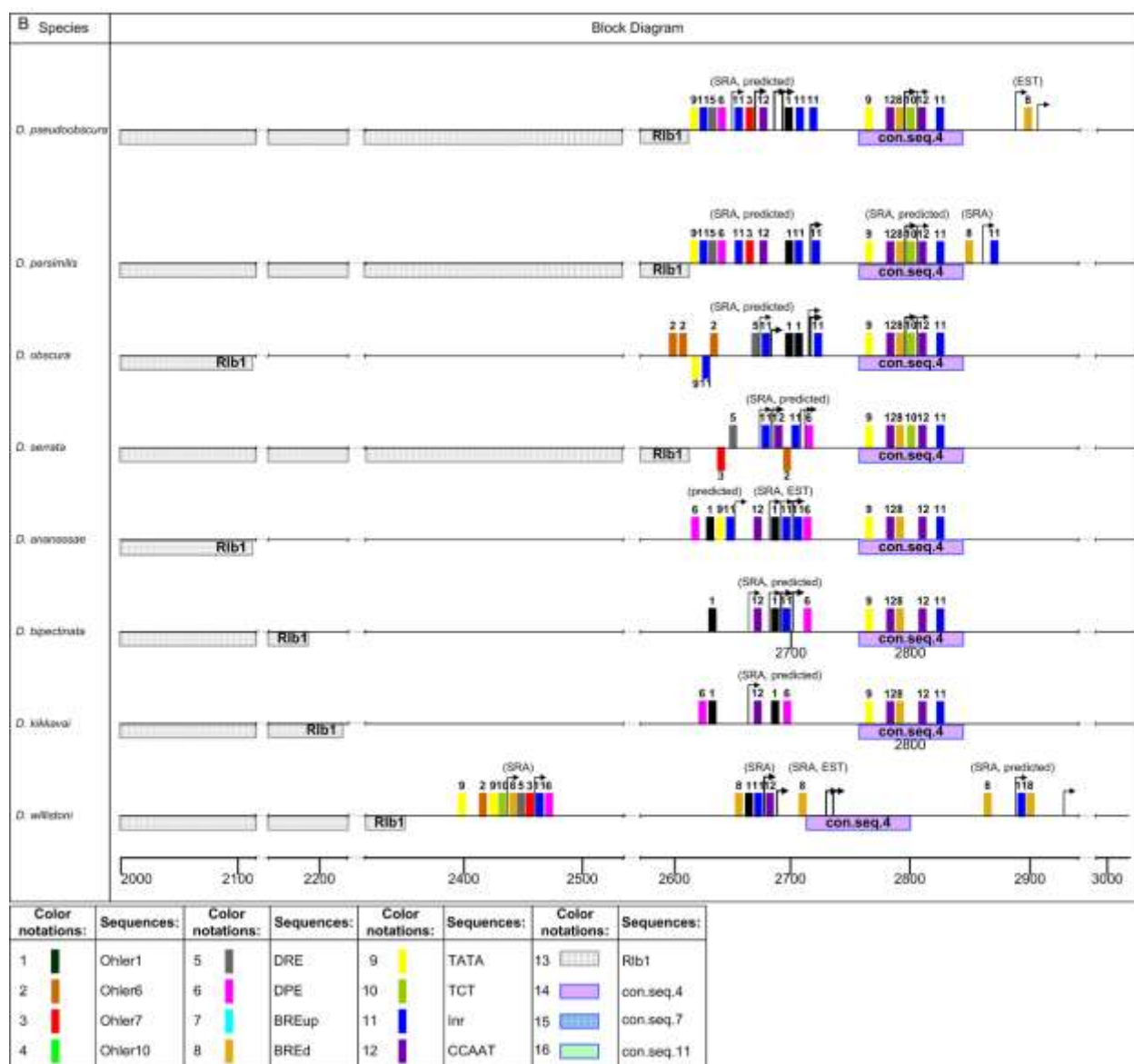


Рисунок 36 - Частоты рядов TSS ras85D у *D. melanogaster* в области межгенного спейсера и 5'UTR

Горизонтальные красные линии отмечают границы фрагментов 5'UTR, разорванного 1-м интроном. Черным цветом выделены суммарные данные по частотам рядов TSS, полученные методом 5'-SAGE по выборкам эмбрионов, личинок, молодых самок, молодых самцов, старых самок, старых самцов (MachiBase); желтым цветом отмечены данные, полученные на выборке эмбрионов методом CAGE [46], зеленым и синим – ряды библиотек EST и SRA.

Для большинства видов доступны исключительно SRA данные и результаты прогнозируемых оценок возможных TSS (Predicted data), к которым в некоторых случаях добавляются данные библиотек TSA и EST. Результаты анализа картирования потенциальных TSS и соответствующих им промоторов схематично представлены на рисунке 37А, В и С. Подтверждением правильности локализации промотора являлось совпадение локализации TSS у анализируемого вида по данным из разных источников, совпадение с предсказанной TSS, совпадение позиций у близкородственных видов.



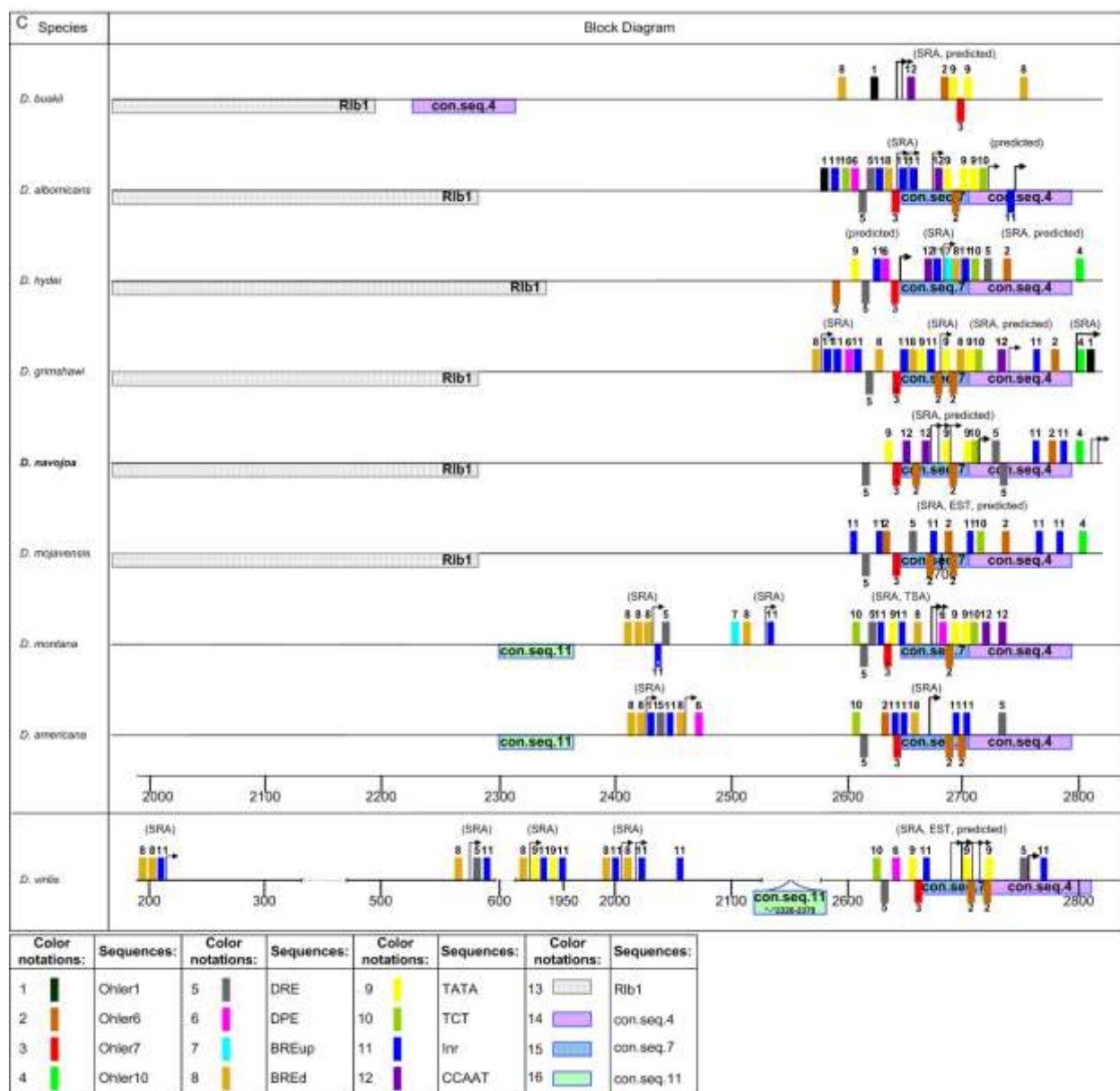


Рисунок 37 - Паттерны промоторных элементов в TSS-областях гена *ras85D* и его ортологов у исследованных видов дрозофилы

(A) - Распределение элементов в промоторной области в группе *melanogaster*. (B) - Распределение элементов в промоторной области в группах *obscura*, *montium*, *ananassae*, *willistoni*. (C) - Распределение элементов в промоторной области подрода *Drosophila*. Шкала под линией показывает положение от начала общего выравнивания. Цветные прямоугольники представляют собой промоторные элементы. Элементы, показанные под прямой линией, указывают на гомологию с минус-цепью ДНК. TSS отмечены стрелками. Ген, расположенный выше по течению, отмечен в левой части диаграмм.

Большинство видов, относящихся к группе *melanogaster* подрода *Sophophora*, за исключением видов *D. eugracilis* и *D. suzukii*, показывают высокую гомологию участка последовательности, маркированного началом сплошного покрытия ридами. Этот участок примерно соответствует предсказанной TSS *ras85D* *D. melanogaster*, захватывает область в 100 п.о. вокруг TSS, включая ECM 11 upstream (расположенную выше по течению), и вплотную примыкает к ECM 4. Характерной особенностью предполагаемого промотора

является обязательное присутствие элементов Ohler7 и DRE, которыми обогащена данная область. Оценки обогащения получены как относительно последовательности межгенного спейсера, так и относительно случайно сгенерированных последовательностей на основе нуклеотидного состава данного фрагмента при помощи алгоритма AME. Такое распределение свидетельствует о действии отбора, поддерживающего консервативную структуру и положение данных элементов в области промотора. В этой области также встречаются элементы BRE down (BRE^d), Initiator (Inr) и Downstream Promoter Element (DPE), обогащение которыми не подтверждается достоверно относительно последовательности межгенного спейсера, и распределенные случайным образом внутри самого спейсера. Старты транскрипции, маркирующие дистальные позиции TSS, могут варьировать в этой области в пределах 50 п.о., но значительное увеличение числа ридов SRA, предполагающее наибольшую частоту стартов, в большинстве случаев связано с позицией элемента Ohler7.

У видов *D. eugracilis* и *D. suzukii* из группы *melanogaster* качественные изменения последовательности межгенного спейсера захватывают область промотора, характерного для других видов этой группы, частично у *D. eugracilis* и полностью у *D. suzukii* (рисунок 37A). У *D. eugracilis* делетирована большая часть спейсера, а область промотора осталась в том же положении относительно ECM4, но потеряла элемент DRE и приобрела элементы TATA-box и Ohler1. При этом резкое увеличение числа ридов опять связано с позицией элемента Ohler7. У *D. suzukii* начало области непрерывного покрытия ридами SRA сместилось upstream на 100 п.о. ECM4, в соответствии с данными SRA. Согласно данным по позициям ридов из библиотеки TSA, подтверждается отмеченная TSS и добавляется еще одна, расположенная дистальнее на 250 п.о. В обеих TSS 5'-концы дистальных ридов расположены левее элементов Ohler1. Во второй, наиболее удаленной TSS обнаруживаются также элементы TCT и BRE^d, в ближней – дополнительно Inr с TATA и BRE^d в каноническом положении, и расположенные downstream Ohler6, Ohler7, Ohler10, и на комплементарной цепи – DRE. Предсказанные TSS для этого вида расположены значительно «ниже по течению» в области сплошного покрытия ридами.

Область предполагаемого промотора у семи видов групп *obscura*, *montium* и *ananassae* смещена примерно на 40 п.о. относительно ECM4, по сравнению с видами группы *melanogaster*, и имеет иной состав элементов промотора и паттерн их взаимного расположения (рисунок 37B). Распределение дистальных TSS в этой области у проанализированных видов также колеблется в пределах 50-60 п.о. Для области промотора у данных видов характерно наличие элементов CCAAT-box, TATA-box, Inr, DPE, Ohler1 и Ohler7, и значимое обогащение по последним двум элементам. Состав элементов промотора

у видов групп *montium* и *ananassae* меняется незначительно, и представлен преимущественно элементами Ohler1, CCAAT-box, Inr, DPE. Исключение составляет вид *D. serrata*, у которого делеция значительной части межгенного спейсера достигает области промотора, и сопровождается появлением элемента Ohler1 на «-»-цепи и элемента DRE на «+»-цепи. Вырожденные последовательности элементов Ohler6 и Ohler7 отмечены только на «-»-цепи. Промотор видов группы *obscura* обладает характерными особенностями: у видов *D. pseudoodscura* и *D. persimilis* также делетирована почти вся область межгенного спейсера; промотор находится на границе с некодирующей последовательностью гена *Rlb1*; область локализации элементов Ohler1 и расположенных downstream элементов Inr смещена правее; в состав промотора входят элементы Ohler7 и DRE. При практически полной гомологии последовательностей промотора этих видов граница TSS *D. persimilis* смещена downstream на 70 п.о., согласно данным SRA. Последовательность межгенного спейсера *D. obscura* сформирована при участии DNA-транспозонов, и в левой части промотора фрагмент от расположенных на «+»-цепи элементов TATA-box и Inr до элементов Ohler7 и CCAAT-box заменен на фрагмент, содержащий TATA-box и Inr на «-»-цепи, и на «+»-цепи несколько близкорасположенных элементов Ohler6, DRE и Inr.

Перестройка межгенного спейсера у *D. willistoni* заходит глубоко в область первого интрона, захватывая всю первую половину области 5'UTR. При этом TSS, маркирующие область сплошного покрытия ридами, расположены в единственном участке последовательности, длиной 27 п.о., проявляющем выраженную гомологию с последовательностями видов групп *montium* и *ananassae*, соответствующими характерному для них промотору *ras85D*. Структура расположения элементов похожа на левую часть промотора указанных видов, где элемент Ohler1 расположен дистальнее Inr и CCAAT-box. Область одиночных стартов у *D. willistoni* находится на 200 п.о. выше основного промотора. Ей соответствует локализация элемента Ohler7, в паре с элементом DRE, и каноническое положение элементов TCT и Inr-DPE.

Виды подрода *Drosophila* проявляют выраженную гомологию и уникальный для этих видов паттерн области промотора (рисунк 37С). Она включает ЕСМ 7, расположенный выше фрагмент длиной около 40 п.о. и половину расположенного на комплементарной цепи downstream ЕСМ4. Дистальные позиции TSS варьируют в пределах 50 п.о. и распределены в основном на левой (дистальной) половине ЕСМ7. Позиции стартов, маркирующих области максимального, или резко нарастающего покрытия ридами, в пределах обсуждаемого промотора, также значительно варьируют, от середины ЕСМ7 до 3'-конца инвертированного ЕСМ4 или еще правее. В этом случае можно говорить о соответствии формы промотора «широкому», но нет основания полагать, что у него есть пик. Состав

элементов промотора значимо обогащен мотивами Ohler6 и Ohler7, как по встречаемости относительно остальной области межгенного спейсера, так и по отношению к случайно сгенерированной выборке на основе анализируемых фрагментов. Элемент DRE не показывает значительного обогащения относительно последовательности всего спейсера, но его положение в определенной позиции промотора неслучайно. Элемент Ohler7 в этом промоторе всегда расположен перед последовательностью ECM7 на «-»-цепи, элементы DRE расположены: первый – перед элементом Ohler7, и второй – в начале ECM4. Элемент DRE представляет собой палиндром, и проявляющие наибольшую гомологию последовательности представлены на обеих цепях. Большинство TSS не показывает зависимости от положения элемента Ohler7. Элемент Ohler6 также встречается преимущественно на «-»-цепи. Последовательность промотора обогащена коровыми элементами INR, DPE, CCAAT-box и BRE^d, относительно их встречаемости в составе межгенного спейсера, но их неслучайное распределение внутри самой последовательности промотора не подтверждается.

Вид *D. busckii* подрода *Dorsilopha* не имеет сколько-нибудь заметной гомологии с остальными видами в последовательности, маркированной TSS. Тем не менее, размер 5'UTR транскриптов примерно соответствует таковым остальных видов, и в области старта присутствуют элементы Ohler1, CCAAT-box, Ohler6, Ohler7 (на противоположной цепи) и TATA-box (рисунок 37C). Мотив Ohler1, предваряющий TSS у *D. busckii*, отмечен в этом положении у *D. albomicans* и видов групп *ananassae*, *montium* и *willistoni*.

Таким образом, возможная область основного промотора у разных видов дрозофил сформирована на основе последовательностей, имеющих различное происхождение, что соответствует выводам о регулярном захвате перестройками некодирующей области гена *ras85D* вплоть до первого интрона. Мы отметили как минимум шесть вариантов различающихся структур промотора, характерных для изученных видов. Это структура, отмеченная для видов группы *melanogaster*, независимый вариант у *D. suzukii*, структура, характерная для групп *montium*, *ananassae*, *obscura*, независимые структуры у *D. willistoni* и *D. busckii*, и общая структура для видов подрода *Drosophila*. Состав родственных структур промоторов, представленных у каждого из трех наборов видов (рисунок 37A, 37B, 37C), может меняться в связи с накопившимися точечными заменами, инсерциями/делециями и граничащими с промотором перестройками, сохраняя, тем не менее, свои основные черты, особенно в правой, базальной части промотора. Все выявленные структуры несут в качестве основных, постоянно присутствующих мотивов Ohler elements, чаще всего Ohler1, Ohler6 и Ohler7, причем два последних элемента обнаруживаются также на противоположной цепи. Как было отмечено в других работах, элемент DRE часто сопровождает Ohler7.

Функциональная значимость эволюционно-консервативных мотивов (ECMs).

В области локализации гена *ras85D* у *D. melanogaster* высокопроизводительными методами ChIP-chip и Chip-seq показано связывание 43-х транскрипционных факторов (TF) и их партнеров по транскрипционному комплексу из 20 суперсемейств TF и четырех семейств белков коактиваторов и корепрессоров [147, 148]. Статистическая оценка обогащения восьми выбранных ECMs сайтами связывания TF показала, что 23 из них неслучайным образом распределены по этим последовательностям (таблица 10).

Таблица 10 - Обогащение эволюционно-консервативных последовательностей сайтами связывания транскрипционных факторов (MEME Suite 5.4.1, algorithm AME).

Motif / control	2A/1B	1A/2B	3A/3B/12A	4A/4B/13B	5A/5B	7A/8B/9B	4A/7B	13A/11B
P-val. ^{1,2} < 0.01; E-val. ^{1,2} < 0.05	D, kni, lola, Trl, disco	Dll, en, Ubx, bab1, fru	Trl, twi, Med	BEAF-32, kni, pnr, ttk, Ubx, lola, sens, Dll, en	lola, BEAF-32, disco, dl, pnr, kni	kni, lola, sc/da,	Ubx, bab1, disco, lola, Med, sens, D, Dll, en	D, lola, pnr
P -val. ¹ < 0.01 E -val. ¹ < 0.05	Med		h, lov, ato/da	pho		twi		

P, E-val.^{1,2} – скорректированное р-значение вероятности случайного обогащения сайтами связывания TF и ожидаемое количество ложноположительных результатов, полученные с использованием двух вариантов наборов контрольных последовательностей – (1) нарезанием фрагментов сходной длины из области межгенного спейсера, 5'-некодирующей последовательности и 1-го интрона, за исключением фрагментов анализируемого мотива, и (2) сгенерированных случайными перестановками на основе анализируемого консервативного набора фрагментов. P, E-val.¹ – показатели р и E, значимые только для оценок с использованием контрольных последовательностей, полученных способом (1). Буква рядом с номером ECM обозначает набор последовательностей, по которому проводился анализ. A – set1 (23 вида), B-set2 (37 видов).

Наиболее часто представлены сайты связывания TF lola и kni – в составе шести и четырех ECMs соответственно. Обогащение сайтами связывания для TF D, disco, Dll, en, Med, pnr, Ubx показано в составе 3х ECMs и для TFs– bab1, BEAF-32, sens, Trl, twi показано в составе двух ECMs.

Выявленный набор TF обладает широким спектром функций, от организации хроматина и коактивации и корепрессии транскрипционных комплексов, до контроля процессов деления и дифференцировки клеток, клеточной гибели, сегментации и морфогенеза органов и систем организма. Контроль активности экспрессии гена *ras85D*, таким образом, прямо связан с онтогенетическими процессами в ходе эмбриогенеза и

развития личинки и куколки дрозофилы. Эволюционный консерватизм предполагает поддержку состава ECMs отбором, определяющим набор обязательных для выполнения регуляторных функций. Для определения специфичных функций для каждого из рассматриваемых ECMs был предпринят GO анализ обогащения биологических процессов, характеризующих полученные для этих мотивов наборы сайтов связывания TFs.

Биологические процессы, выявленные в результате GO enrichment analysis, можно разделить на две группы – определяющие общую активность экспрессии гена, и зависящие от ткани, от типа и состояния клеток и от стадии развития. Для анализа GO-процессы ранжировали по скорректированным p-значениям (adjusted p-val.) и отбирали первые 10 GO-процессов, связанных с тканевой и возрастной специфичностью, а также все общие GO-процессы, попадающие в границы полученных p-значений. Наборы анализируемых генов представлены исключительно транскрипционными факторами и белками хроматина, поэтому из состава общих GO-процессов удаляли все процессы, характеризующие формальную связь с промоторами, ДНК, транскрипцией.

Усиление транскрипции характерно для наборов TF, полученных для ECM 2A и 3A/12A последовательность 1A не связана с усилением или ослаблением базовой экспрессии гена. Для оставшихся ECMs 4A, 5A, 7A, 13A показаны оба направления изменения базовой экспрессии гена.

GO-процессы, связанные с тканевой и клеточной специфичностью, показывают функциональные различия ECMs. Так, действие последовательности 2A на экспрессию гена *ras85D* опосредует его участие в контроле деления клетки, морфогенезе слюнных желез, системы трахей, иннервации сетчатки, сегментации эмбриона и клеточных ответах на BMP и экдизоновые стимулы. ECM 1A необходим для контроля развития ножных, крыловых, глазных и генитального дисков и передне-задней поляризации клеток. ECMs 3A/12A опосредуют участие гена в дорзо-вентральной поляризации клеток, развитии нервной системы, дифференциации нейронов и фоторецепторов, формировании кутикулы; ECM 5A – в сегментации эмбриона и развитии сердца, циркуляторной системы, лимфатической железы и периферической нервной системы; ECMs 7A – в регуляции митотического цикла, формировании нейробласта и дифференцировке стволовых клеток, дифференцировке хет и развитии периферической нервной системы и мальпигиевых сосудов; ECMs 4A – в опосредованной регуляции метаболизма макромолекул, развитии гениталий, антенн, гальтер, крыльев и ног, и дифференцировке фоторецепторов. ECM 13A по функциональной активности проявляет сходство с ECMs 5A.

Можно отметить, что ECMs 7A и 13A как по вероятному составу сайтов связывания транскрипционных факторов, так и участию в GO-процессах, в значительной степени

дублируют регуляторные функции остальных мотивов, присутствующих в обязательном порядке в некодирующих последовательностях данного гена и сохраняющих свой порядок и положение на цепи. ЕСМ4 отличается тем, что обладает набором уникальных регуляторных функций для данного кластера консервативных мотивов, сопровождает downstream область промотора у большинства видов, сохраняет свое положение по отношению обязательных мотивов, но может оказываться в инвертированном положении.

Представленная картина дивергенции структуры межгенного спейсера и некодирующей последовательности гена *ras85D* у дрозофил предполагает несколько важных эволюционных выводов. Они касаются скорости и возможных механизмов восстановления функциональной активности гена после замены промотора и существенной части регуляторных последовательностей, а также локализации регуляторных последовательностей гена *ras85D* в области межгенного спейсера и некодирующей последовательности.

1) Высокая изменчивость предпромоторной области и дистальной части 5'UTR связана с перестройками, вызванными инсерциями мобильных элементов. Эти части последовательности имеют независимое эволюционное происхождение.

2) Критически важные для регуляции процессов развития и функционирования клеток мотивы (ЕСМs) располагаются ниже промотора и наравне с областью промотора могут переноситься на эволюционно-новые последовательности с помощью механизмов генетической конверсии.

3) Эволюционные изменения регуляторной области консервативного гена, приводящие в большинстве случаев к его инактивации или несовместимым с нормальным развитием нарушениям, могут быть восстановлены до приемлемого уровня в кратчайшие сроки, фактически мгновенно на шкале эволюционного времени. Восстановление может происходить при помощи конверсионных или аналогичных им механизмов.

4) Исходя из общих представлений о формировании адаптаций и изолирующих барьеров в ходе эволюции, консервативные гены должны поддерживать гомеостаз организма и служить тем фундаментом, на котором строятся все эволюционные инновации. Однако полученные результаты предполагают, что периодические (но не критические) изменения регуляторной активности гена, в ходе эволюции его некодирующей последовательности, могут накладывать свой эффект на онтогенетический процесс и поддерживаться отбором, также приводя к эволюционно-значимым изменениям.

Подраздел 5.3. Анализ морфологических признаков и определение таксономического положения ископаемых образцов

Разработка новых подходов к оптической микроскопии янтарных ископаемых.

Традиционная оптическая микроскопия высокого разрешения предполагает использование масляно-иммерсионной оптики и применение покровного стекла, отделяющего объектив и иммерсионное масло от препарата. При этом рабочее расстояние объектива, как правило, очень мало — порядка 0.2мм для объективов с увеличением 60х и 100х. Этой глубины вполне достаточно для исследования тонких объектов, придавленных покровным стеклом. Янтарные же ископаемые нередко имеют большую глубину, поскольку они застыли в янтаре в их более естественных позах. Исключить покровное стекло — один из естественных путей почти двукратного увеличения рабочей глубины. Однако, следует избегать контакта иммерсионного масла с янтарём, поскольку масло способно проникать в малейшие трещины в янтаре и необратимо менять оптические свойства уникального образца, что недопустимо. В качестве альтернативы маслу мы разработали и успешно применили в качестве иммерсионной среды насыщенный раствор фруктозы, имеющий достаточно высокую оптическую плотность (1.49 при 25°C, по сравнению с 1.51 у иммерсионного масла и 1.55 у янтаря) (рисунок 38) [107].

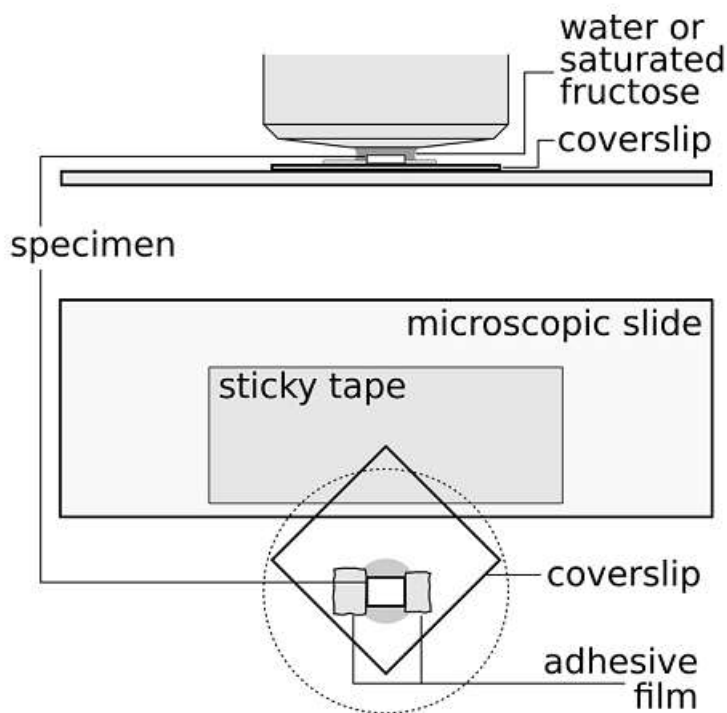


Рисунок 38 - Схематическое изображение метода закрепления и микроскопической съёмки янтарного препарата с применением воды или насыщенного раствора фруктозы в качестве иммерсионной жидкости

В куске Ливанского янтаря, возраст которого примерно 129 миллионов лет (Меловой период, времена динозавров) была найдена пара клещей, относящихся к группе

астигматических клещей (*Astigmata*). Это важная в практическом отношении группа, поскольку в неё входят клещи пищевых продуктов, которые заражают хлеб и муку, и паразиты животных — ушные клещи, чесоточный зудень, перьевые клещи. В эту же группу входят и клещи домашней пыли, вызывающие аллергию и астму у полутора миллиардов людей на Земле.

У астигматических клещей есть несколько жизненных стадий, одна из которых предназначена для расселения. Сам по себе клещ далеко уйти не может, поэтому ему приходится искать средство передвижения. Расселительная стадия астигматического клеща заметно отличается от других его форм. У неё нет ротового аппарата и большей части кишечника, а значит, она не питается. Она имеет гипертрофированные органы чувств, предназначенные для поиска хозяина-переносчика. Также у неё имеются присоски, чтобы надёжно прикрепиться к хозяину на время путешествия. Расселение происходит на насекомых либо в фолликулах («луковицах») волос млекопитающих или под кожей млекопитающих и птиц. Разделение задач между несколькими стадиями развития одного организма — распространённый путь эволюционного успеха. Другие примеры такого разделения — гусеницы и бабочки, или плавающая расселительная личинка у многих прикрепленных ко дну морских организмов.

До настоящего момента вопрос появления и эволюции расселительной стадии астигматических клещей оставался загадкой. Например, не было понятно, появилась ли эта стадия из другой в процессе постепенного накопления изменений (филетический градуализм) либо скачкообразно (модель прерывистого равновесия). При более подробном изучении клещей из Ливанского янтаря выяснилось, что они способны ответить на этот вопрос. Оказалось, что оба клеща относятся к той самой расселительной стадии — у них были четко выраженные присоски. Но одновременно у них же обнаружился хорошо развитый ротовой аппарат. Это означает, они могли не только искать переносчика и путешествовать на нём, но и питаться, как и взрослая стадия клеща. Следовательно, появление расселительной стадии в эволюции происходило путем постепенного накопления изменений, а не скачкообразно, как предполагалось на основании строения современных клещей.

Описанный нами клещ, учитывая масштаб его отличий от современных родственников, был отнесен к новому (описанному нами) семейству *Levantoglyphidae* (рисунок 39) [107]. По всей вероятности, в процессе длительной эволюции это семейство полностью вымерло. Нам также удалось частично реконструировать поведение и экологию ископаемого клеща. Как и многие современные астигматы, он расселялся на насекомых. Несмотря на развитый ротовой аппарат, во время путешествия этот клещ не питался. Он

также обладал хорошо развитыми органами чувств, способными находить хозяина по движению и запаху. При обнаружении хозяина он мог совершить прыжок на расстояние, примерно в 30 раз превышающее длину его собственного тела.

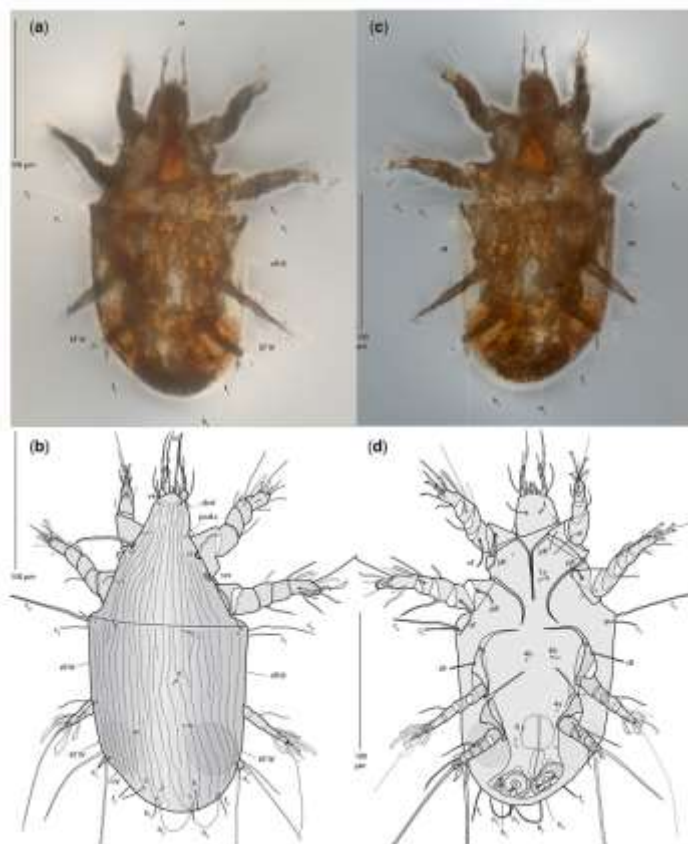


Рисунок 39 - Ископаемый клещ *Levantoglyphus sidorchukae*, голотип, новые вид и род, расселительная стадия, общие фото с дорсальной и вентральной стороны (А, С) и соответствующие рисунки (В, D)

Другая находка в Бирманском янтаре (возраст около 98 млн лет) позволила нам поставить наиболее древнюю отметку в истории эволюции другого семейства клещей, *Sejidae* (рисунок 40) [108]. Нами была найдена и подробно исследована пара личинок этих клещей, имевших все признаки указанного семейства. Более точное определение оказалось нам недоступно, поскольку для него требовалось проанализировать признаки взрослых особей, а не личинок.

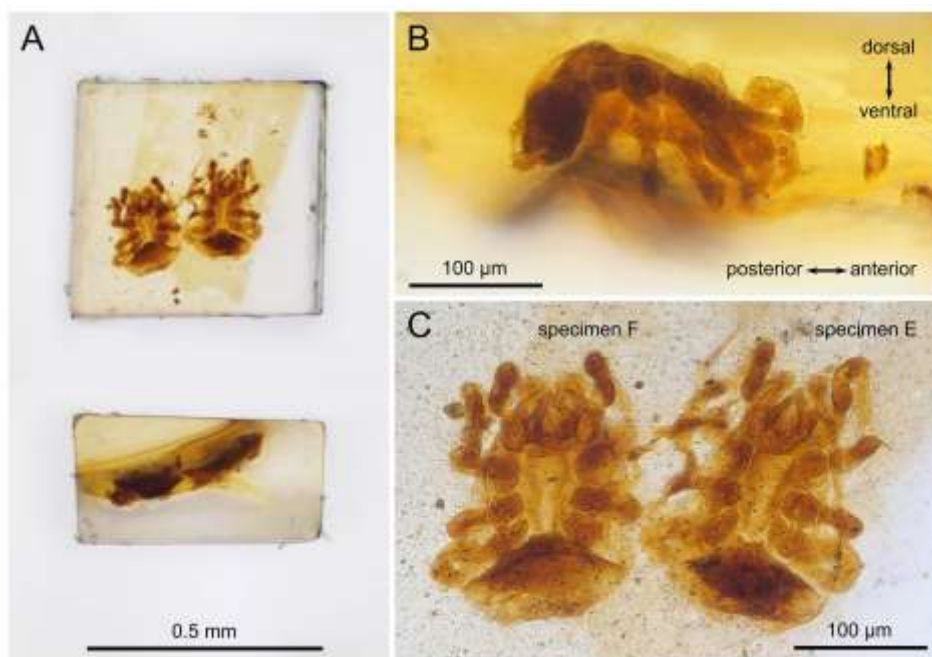


Рисунок 40 - Ископаемые клещи семейства Sejidae, две личинки
А - фотографии плоско-полированного образца янтаря; В - вид клеща сбоку; С - вид с дорсальной стороны.

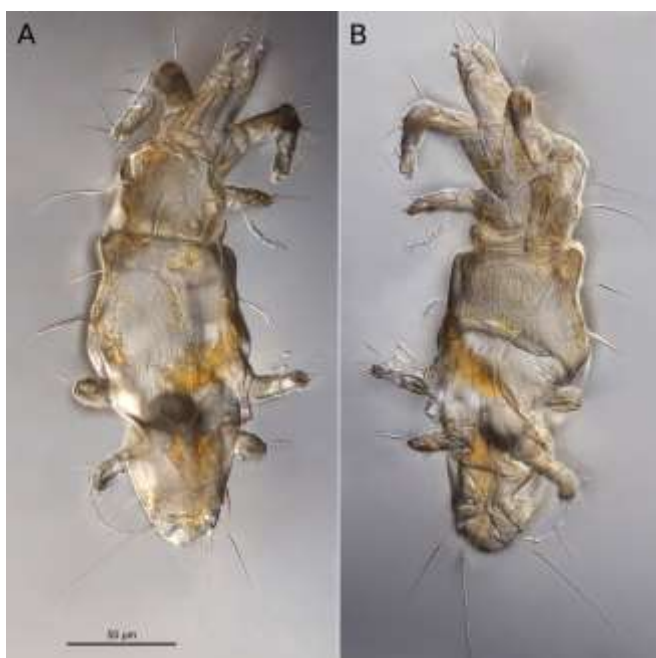


Рисунок 41 - Ископаемый клещ *Barbutia theroni*, новый вид, голотип, самка
А - вид с дорсальной стороны; В - вид с вентральной стороны.

Мы описали ископаемых представителей ещё нескольких семейств клещей: Barbutiidae (рисунок 41) [110], Tarsocheylidae, Dolichocybidae and Acarophenacidae [111]. Во всех случаях возраст янтаря оценивается около 35 млн лет. Исключительная сохранность этих янтарных ископаемых позволила нам использовать предельное увеличение оптической микроскопии и сделать полноценные описания новых ископаемых видов (а в одном случае и нового рода).

Заключение

Полученные результаты указывают на возможный отбор при формировании исследуемых видов тех вариантов гена *cutb*, которые обеспечивают адаптации на молекулярном уровне. Можно предположить, что часть изменчивости мтДНК у балобанов и кречетов является ненейтральной, вносящей отдельный вклад в формирование генетической структуры этих видов.

В ходе эволюции предпромоторная область и промотор консервативных генов могут полностью заменяться последовательностями с независимым происхождением, в кратчайшие сроки восстанавливать активность промотора и необходимый для поддержания жизнеспособности и реализации онтогенетических программ паттерн регуляции экспрессии. В связи с этим встает вопрос – являются такие изменения нейтральными, или способны формировать совершенно неожиданный тип адаптаций, связанный с изменением общего уровня экспрессии генов домашнего хозяйства под влиянием изменившейся структуры регуляторной области и промотора.

Результаты анализа ископаемых образцов позволяют лучше понять эволюцию различных, в то числе экономически и медицински важных, групп клещей. С помощью данных об ископаемых мы также можем более точно откалибровать "молекулярные часы" и рассчитать относительную скорость эволюции различных групп клещей, а также сравнить эти данные с основными геологическими процессами, происходившими в истории Земли — такими, как появление и исчезновение океанов и континентов. Разрабатываемые микроскопические методы, такие как применение насыщенного водного раствора фруктозы в качестве иммерсионной жидкости, могут найти применение в других научных областях, где использование иммерсионного масла по тем или иным причинам нежелательно.

По результатам работы опубликованы статьи в журналах Q1, Q2 и Q4.

Список использованных источников

95. Gavrillets, S. Fitness landscapes and the origin of species. Princeton Univ. – 2004. Press, Princeton, NJ. 432 pp.
96. Gavrillets S., Losos J.B. Adaptive radiation: contrasting theory with data // Science. – 2009, – Vol.323. – N 5915. – P.732-737.
97. Coyne J.A., Orr H.A. Patterns of speciation in *Drosophila* // Evolution. – 1989, – Vol. 43, – Is.2. – P. 362–381.
98. Coyne J.A., Orr H.A. “Patterns of speciation” revisited // Evolution – 1997. – Vol. 51. – Is.1, – P. 295–303.
99. Dobzhansky T. Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids // Genetics. – 1936. – Vol.21. – N 2. – P. 113-135.

100. Muller H.J. Bearing of the *Drosophila* work on systematics // pp. 185-268 in *The New Systematics*, edited by J. S. Huxley, 1940. Clarendon Press, Oxford.
101. Gavrillets S. Evolution and speciation on holey adaptive landscapes // *Trends Ecol. Evol.* – 1997. – Vol.12. – Is. 8. – P. 307–312.
102. Kondrashov A.S., Sunyaev S., Kondrashov F.A. Dobzhansky-Muller incompatibilities in protein evolution // *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, – 2002. – Vol. 99. – N 23. – P.14878-14883.
103. King M. Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach // *Heredity*. – 1987. – Vol. 59, – Pt.1. – P. 1-6. DOI: 10.1038/hdy.1987.90.
104. Ayala FJ, Coluzzi M. Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 – Vol.102. – Suppl. 1, – P. 6535-6542.
105. Рожкова Д.Н., Зиневич Л.С., Карякин И.В., Сорокин А.Г., Тамбовцева В.Г., Куликов А.М. Ненейтральная изменчивость цитохрома b у балобана *Falco cherrug* grey, 1834 и кречета *Falco rusticolus* L // *Генетика*. – 2021. – Т. 57. – No. 4. – С. 454-463. DOI: 10.31857/S0016675821040123. – R – Rozhkova D.N., Zinevich L.S., Karyakin I.V., (...), Tambovtseva V.G., Kulikov A.M. Non-Neutral Cytochrome b Variability in the Saker *Falco cherrug* Grey, 1834 and Gyrfalcon *Falco rusticolus* L. // *Russian Journal of Genetics*. – 2021. – Vol. 57. – No 4. – P. 468-476. DOI: 10.1134/S1022795421040128. – Q4.
106. Chekunova A.I., Sorokina S.Yu., Sivoplyas E.A., Bakhtoyarov G.N., Proshakov P.A., Fokin A.V., Melnikov A.I. , Kulikov A.M. Episodes of rapid recovery of the functional activity of the *ras85D* gene in the evolutionary history of phylogenetically distant *Drosophila* species // *Frontiers in Genetics*. – 2021 in press.
107. Klimov P., Vorontsov D., Azar D., Sidorchuk E., Braig H., Khaustov A., Tolstikov A. A transitional fossil mite (Astigmata: Levantoglyphidae fam. n.) from the early Cretaceous suggests gradual evolution of phoresy-related metamorphosis // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – Art. No. 15113. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94367-2>**Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.**
108. Joharchi O., Vorontsov D.D., Walter D.E. Oldest determined record of a mesostigmatic mite (Acari: Mesostigmata: Sejidae) in Cretaceous Burmese amber // *Acarologia*. – 2021. – Vol. 61, – P. 641–649. <https://doi.org/10.24349/goj5-BZms> Q3
109. Giłka W., Zakrzewska M., Lukashevich E., Vorontsov D., Soszynska-Maj A., Skibińska K., Cranston P. Wanted, tracked down and identified: Mesozoic non-biting midges of the subfamily Chironominae (Chironomidae, Diptera) // *Zoological Journal of the Linnean Society*. – 2021. – zlab020. – P. 1–19. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlab020>**Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.**

110. Khaustov A., Vorontsov D., Perkovsky E., Klimov P. First fossil record of mite family Barbutiidae (Acari: Raphignathoidea) from late Eocene Rovno Amber, with a replacement name *Hoplocheylus neosimilis* nomen novum (Tarsocheylidae) // Systematic and Applied Acarology. – 2021. – Vol. 26, P. 973–980. DOI: <https://doi.org/10.11158/saa.26.5.12>**Ошибка!**

Недопустимый объект гиперссылки.

111. Khaustov A., Vorontsov D., Perkovsky E., Lindquist E. Review of fossil heterostigmatic mites (Acari: Heterostigmata) from late Eocene Rovno Amber. I. Families Tarsocheylidae, Dolichocybidae and Acarophenacidae // Systematic and Applied Acarology. – 2021. – Vol. 26. – N 1. – P. 33–61. DOI: <http://dx.doi.org/10.11158/saa.26.1.3>**Ошибка!**

Недопустимый объект гиперссылки.

112. Weir J.T., Schluter D. Calibrating the avian molecular clock // Mol. Ecol. – 2008. – Vol. 17. – P. 2321–2328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03742.x>

113. Nittinger F., Gamauf A., Pinsker W. et al. Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data // Mol. Ecol. – 2007. – Vol. 16. – P. 1497–1517.

114. Potapov E., Sale R. The Gyr Falcon. London: T & AD Poyser, 2005. 360 p.

115. Sidorchuk E.A., Vorontsov D.D. Preparation of small-sized 3D amber samples: state of the technique // Palaeoentomology, – 2018. – Vol.1, – P.80–90. <https://doi.org/10.11646/palaeoentomology.1.1.10>**Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.**

116. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. – 2018. – Vol. 35. – P. 1547–1549. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

117. Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective // Electrophoresis. – 2009. – Vol. 30. – P. S162–S173. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>.

118. Benkert P., Biasini M., Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models // Bioinformatics. – 2011. – Vol. 27. – P. 343–350. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>

119. Wang J., Youkharibache P., Zhang D. et al. iCn3D, a web-based 3D viewer for sharing 1D/2D/3D representations of biomolecular structures // Bioinformatics. – 2020. – Vol. 36. – N 1. – P. 131–135. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz502>

120. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction // Nat. Protoc. – 2010. – Vol. 5. – P. 725–738. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>

121. Yang J., Yan R., Roy A. et al. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction // *Nat. Methods.* – 2015. – Vol. 12. – P. 7–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
122. Choi Y., Sims G.E., Murphy S. et al. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – N 10. – e46688. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
123. Choi Y. A fast computation of pairwise sequence alignment scores between a protein and a set of single-locus variants of another protein // *Proc. ACM Conference on BCB.* N.Y.: ACM, – 2012. – P. 414–417. DOI: <https://doi.org/10.1145/2382936.2382989>
124. Woolley S., Johnson J., Smith M.J. et al. TreeSAAP: selection on amino acid properties using phylogenetic trees // *Bioinformatics.* – 2003. – Vol. 19. – N 5. – P. 671–672. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg043>
125. Bailey T.L., Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers // *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 2. 1994. pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California.
126. Bailey T.L., Bodén M., Buske F.A., Frith M., Grant C.E., Clementi L., Ren J., Li W.W., Noble W.S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching // *Nucleic Acids Research.* – 2009. – Vol. 37. – P. 202-208. DOI: [10.1093/nar/gkp335](https://doi.org/10.1093/nar/gkp335)
127. Bailey T.L., Gribskov M. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches // *Bioinformatics.* – 1998. – Vol. 14, – N.1. – P. 48-54.
128. Noe L., Kucherov G. YASS: enhancing the sensitivity of DNA similarity search // *Nucleic Acids Research.* – 2005. – Vol. 3. – N 2. – P.540-543. DOI: [10.1093/nar/gki478](https://doi.org/10.1093/nar/gki478)
129. McLeay R.C., Bailey T.L. Motif Enrichment Analysis: a unified framework and an evaluation on ChIP data // *BMC Bioinformatics.* – 2010. – Vol. 11. – Art. N 165. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-165>
130. Rach E.A., Yuan H.Y., Majoros W.H., Tomancak P., Ohler U. Motif composition, conservation and condition-specificity of single and alternative transcription start sites in the *Drosophila* genome. *Genome Biology.* – 2009. – Vol.10. – Art. N R73, DOI: [10.1186/gb-2009-10-7-r73](https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-7-r73)
131. Chen E.Y., Tan C.M., Kou Y., Duan Q., Wang Z., Meirelles G.V., et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics.* – 2013. – Vol. 14. – Art. N 128. DOI: [10.1186/1471-2105-14-128](https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128)
132. Kuleshov M. V., Jones M. R., Rouillard A. D., Fernandez N. F., Duan Q., Wang Z., et al. Enrichr: a Comprehensive Gene Set Enrichment Analysis Web Server 2016 Update // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. – P. 90–97. DOI:[10.1093/nar/gkw377](https://doi.org/10.1093/nar/gkw377)

133. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases // *Molecular Biology and Evolution*. – 1992. – Vol. 9. – P. 678-687. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752
134. Yang Z., Nielsen R., Goldman N., Pedersen A.M. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites // *Genetics*. – 2000. – Vol. 155. – P. 431–449.
135. Рубин А.Б. Биофизика. - М.: Книжный дом “Университет”, 1999. - 448 с.
136. Митрофанов В.Г., Чекунова А.И., Зеленцова Е.С., Гаузе Л.Н., Бахтояров Г.Н. Локализация последовательности *Dras1* на политенных хромосомах у видов *Drosophila* группы *virilis* // *Цитология*. – 2011. – Т. 53. – No 6. – С. 513-516.
137. Reis M., Vieira C.P., Lata R., Posnien N., Vieira J. Origin and Consequences of Chromosomal Inversions in the *virilis* Group of *Drosophila* // *Genome Biol. Evol.* – 2018. – Vol. 10. – P. 3152–3166. DOI:10.1093/gbe/evy239.
138. Georgiev P., Tikhomirova T., Yelagin Vol., Belenkaya T., Gracheva E., Parshikov A., et al. Insertions of hybrid P elements in the yellow gene of *Drosophila* cause a large variety of mutant phenotypes. *Genetics*. – 1997. – Vol. 146. – P. 583-594. DOI:10.1093/genetics/146.2.583
139. Pomerantseva E., Biryukova I., Silicheva R., Savitskaya E., Golovnin A., Georgiev P. Transposition of Regulatory Elements by P-Element-Mediated Rearrangements in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 2006 – Vol. 172. – P. 2283-2291. DOI: 10.1534/genetics.105.052803
140. Morales-Hojas, R., Reis, M., Vieira, C.P., Vieira, J. Resolving the phylogenetic relationships and evolutionary history of the *Drosophila virilis* group using multilocus data. *Mol Phylogenet Evol.* – 2011. – Vol. 60. – P. 249-258. DOI: 10.1016/j.ympev.2011.04.022
141. Tamura K., Battistuzzi F.U., Billig-Ross P., Murillo O., Filipski A., Kumar S. Estimating Divergence Times in Large Molecular Phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. P.19333-19338. DOI: 10.1073/pnas.1213199109
142. Tamura K., Qiqing T., Kumar S. Theoretical Foundation of the RelTime Method for Estimating Divergence Times from Variable Evolutionary Rates // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35, – P. 1770-1782. DOI:10.1093/molbev/msy044
143. Hendrix D.A., Hong J.W., Zeitlinger J., Rokhsa D.S., Levine M.S. Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2008. – Vol. 105, – P. 7762-7767. DOI: 10.1073/pnas.0802406105
144. Ni T., Corcoran D.L., Rach E.A., Song S., Spana E.P., Gao Y., et al. (). A paired-end sequencing strategy to map the complex landscape of transcription initiation. *Nat Methods*. – 2010. – Vol. 7, – P. 521-527. DOI: 10.1038/nmeth.1464

145. Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol.* – 2010. – Vol. 339, – P. 225-229. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.08.009
146. Hoskins R.A., Landolin J.M., Brown J.B., Sandler J.E., Takahashi H., Lassmann T., et al. Genome-wide analysis of promoter architecture in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* – 2011. – Vol. 1. – P. 182-192. DOI: 10.1101/gr.112466.110.
147. modENCODE Consortium et al. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. // *Science.* – 2010. – Vol. 330. – N 6012. – P.1787-1797. DOI: 10.1126/science.1198374
148. Nègre N., Brown C.D., Ma L., Bristow C.A., Miller S.W., Wagner U., et al. A cis-regulatory map of the *Drosophila* genome // *Nature.* – 2011. – Vol. 471. – P. 527-531. DOI: 10.1038/nature09990

Раздел 6. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ, ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ РЫБ

Введение

Изучение путей и механизмов возникновения биологического разнообразия на - одна из приоритетных задач эволюционных исследований [149]. Рыбы имеют ряд биологических особенностей, которые делают их удобными объектами таких исследований. Среди рыб северного полушария имеется целый ряд полиморфных видов и видовых комплексов, внутри которых происходят активные процессы видообразования, привлекающие интерес эволюционных биологов. В течение ряда лет мы исследуем закономерности формо- и видообразования на примере лососевых рыб, гольцов р. *Salvelinus* (Salmonidae, Teleostei), - одних из наиболее изменчивых и полиморфных позвоночных животных [150].

На своём обширном ареале гольцы образуют большое число группировок и форм, в том числе симпатрических морфотипов, занимающих разные экологические ниши в озёрных и речных биотопах. Обилие таких находящихся на разных стадиях диверсификации «пучков» форм позволяет проследивать общие закономерности и специфические черты формирования фенотипической сегрегации и репродуктивной изоляции в серии параллельных, но независимых процессов формообразования, протекающих в разных частях ареала. Гольцы широко изучаются во всём мире [151], тем не менее, их изменчивость и закономерности ее возникновения исследованы явно недостаточно, о чём свидетельствуют непрекращающиеся публикации, посвящённые описанию новых форм и анализу их эволюционной дивергенции [152, 153]. В частности, ввиду труднодоступности арктических и горных местообитаний рода остаются малоизученными значительные участки его области распространения - в первую очередь, в сибирской части ареала и Северо-Восточной Азии. Поскольку формообразование у гольцов, являющихся самой холодолюбивой пресноводной рыбой, тесно связано с климатическими изменениями и гидрографическими перестройками в ледниковые эпохи, большую важность имеет изучение путей их расселения в плейстоцене, истории реколонизации освобождающихся от ледников водоёмов, адаптивной радиации в этих водоёмах и вторичных контактов между изолированными филогенетическими линиями.

В 2021 г. основное внимание было уделено решению следующих задач:

1. обобщению многолетних исследований взаимоотношений трёх симпатрических форм арктического гольца *Salvelinus alpinus* в одном из озёр Забайкалья и изменений в структуре популяции и в биологии форм под антропогенным воздействием; изучению истории расселения арктического гольца в Байкальском регионе и

- филогеографии арктического гольца в области вторичного контакта трёх филогенетических линий вида на севере Восточной Сибири;
2. оценке роли температуры, как внешнего фактора, определяющего морфологическую и экологическую диверсификацию пучка видов гольцов *S. malma* оз. Кроноцкое (Камчатка);
 3. изучению физиологических особенностей четырех эндемичных симпатрических гольцов оз. Эльгыгытгын (Чукотка), различающихся по трофической специализации и образу жизни;
 4. изучению внешних и внутренних факторов, лежащих в основе диверсификации двух симпатрических экоморф мальмы, населяющих р. Камчатка.

Материалы и методы

Задача 1. Материал, использованный в работах, опубликованных в 2021 г. и представленных в настоящем отчёте, собран в двух озёрах северного Забайкалья в ходе экспедиций 1997-2019 гг., а также в 10 заполярных водоёмах плато Путорана, низовий Хатанги и дельты Лены в 1975-2020 гг. Рыб отлавливали жаберными сетями; по стандартным методикам [154] проводили биологический и морфометрический анализы, анализ питания [155], анализ возраста и роста [156], брали образцы тканей для генетического анализа. Морфометрический анализ включал изучение меристических (счётные признаки) и пластических (промеры тела) признаков, в последнем случае использовали как оригинальные промеры (для построения «онтогенетических каналов» [157], так и преобразованные с использованием аллометрических коэффициентов для устранения эффекта размера логарифмы оригинальных промеров [158]. ДНК выделяли из фиксированных 96%-ным этанолом жировых плавников, кусочков мышечной ткани или семенников с помощью коммерческого набора Diatom DNA Prep 100 (ООО «Лаборатория Изоген»). Секвенировали фрагмент (534–543 пар оснований), включающий весь левый участок контрольной области митохондриальной ДНК гольцов, используя праймеры и условия, описанные в работе [159]. При обработке данных использовали программы STATISTICA v. 12.0, FISAT II v. 1.2.2, Geneious, Seqscape v. 2.5 и др.

Задача 2. Материалом послужили онтогенетические серии гольцов, выращенные в разных температурных режимах. Оценка температур на нерестилищах производилась с помощью температурных датчиков Starmon mini temperature loggers (Star Oddi, Iceland), установленных на год на нерестилищах разных морф кроноцких гольцов. Точность измерения равнялась 50 mK. Частота измерений – 1 измерение в минуту. На нерестилищах каждой из морф устанавливали 3 датчика. Затем, полученные данные аппроксимировались

для получения сглаженной годовой динамики температур. Онтогенетические серии гольцов были получены в 2018 г. в результате выращивания оплодотворенной икры и молоди в лабораторных условиях при динамике температур, точно повторяющей природную, и при стандартной температуре. Сравнение онтогенетических серий проводилось по таким показателям как стандартная длина, вес и темпы онтогенеза (время перехода из одной стадии развития в другую).

Задача 3. Сбор материала осуществлен в 2020 г. Для оценки физиологических показателей отлавливались взрослые рыбы ставными жаберными сетями в разных горизонтах озера. У рыб производился отбор крови с помощью вакуумных систем забора крови (Vacurette) и отбирался кусок мышечной ткани. В качестве показателей физиологического состояния рыб оценивались: концентрация гемоглобина в крови, концентрация глюкозы в крови, концентрация белка в крови, концентрация липопротеинов в крови, общая концентрация жиров в мышцах, интенсивность перекисного окисления липидов в крови и уровень тиреоидных гормонов. Проводился анализ паразитофауны и спектра питания рыб.

Задача 4. Сбор материала (молоди и взрослых рыб на нерестилищах) в природных популяциях осуществлялся в 2017 г. Экспериментальная часть: инкубация икры, выращивание личинок и молоди проводились в 2017-2019 гг. Сравнение онтогенеза проводилось по таким показателям как: время перехода из одной стадии развития в другую, стандартная длина, темпы краниогенеза, скорость оссификации отдельных элементов спланхнокраниума. Для моделирования разных гормональных статусов у рыб использовали общепринятые методики. Моделирование токсичного воздействия осуществлялось с учетом естественных концентраций.

Результаты и обсуждение

Задача 1. Опубликованы результаты многолетних исследований структуры полиморфной популяции арктического гольца из оз. Токко (бассейн Олёкмы) и её изменений под антропогенным воздействием [160]. Исследования охватывали периоды 1997-2001 гг., когда популяция находилась в относительно стабильном состоянии, и 2013-2019 гг., когда она подверглась жёсткому прессу неконтролируемого рыболовства. Изучены морфология, возраст, рост, питание, размножение и раннее развитие гольцов. Показано, что в озере обитали три формы арктического гольца, различающиеся по темпу роста – крупная, мелкая и карликовая (рисунки 42 а, 43).

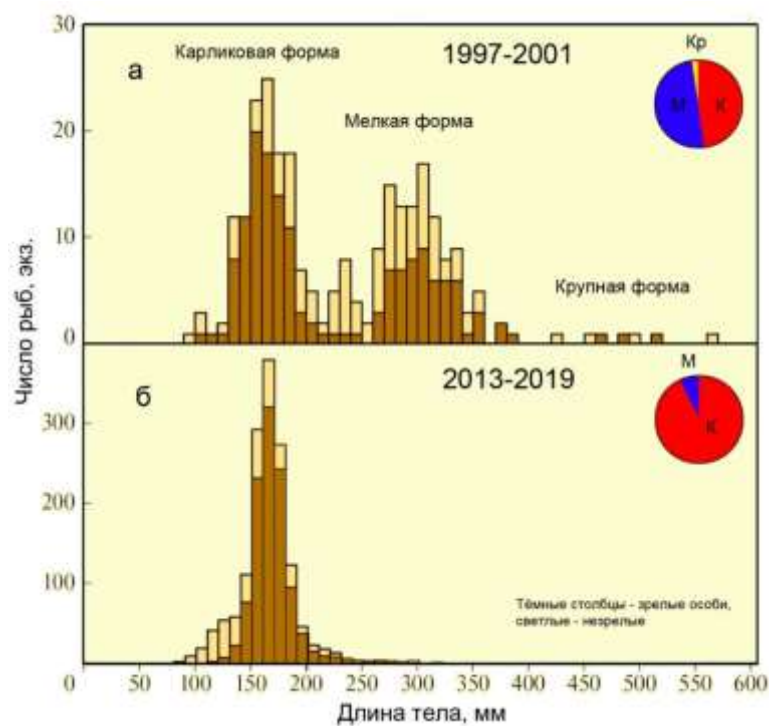


Рисунок 42 - Размерный состав арктических гольцов *Salvelinus alpinus* из оз. Токко (столбчатые диаграммы) и соотношение трёх форм в уловах (круговые диаграммы) (а) - 1997–2001 гг. (б) - 2013-2019 гг., иллюстрирующие исчезновение крупной формы, сокращение численности мелкой и резкое возрастание численности карликовой.

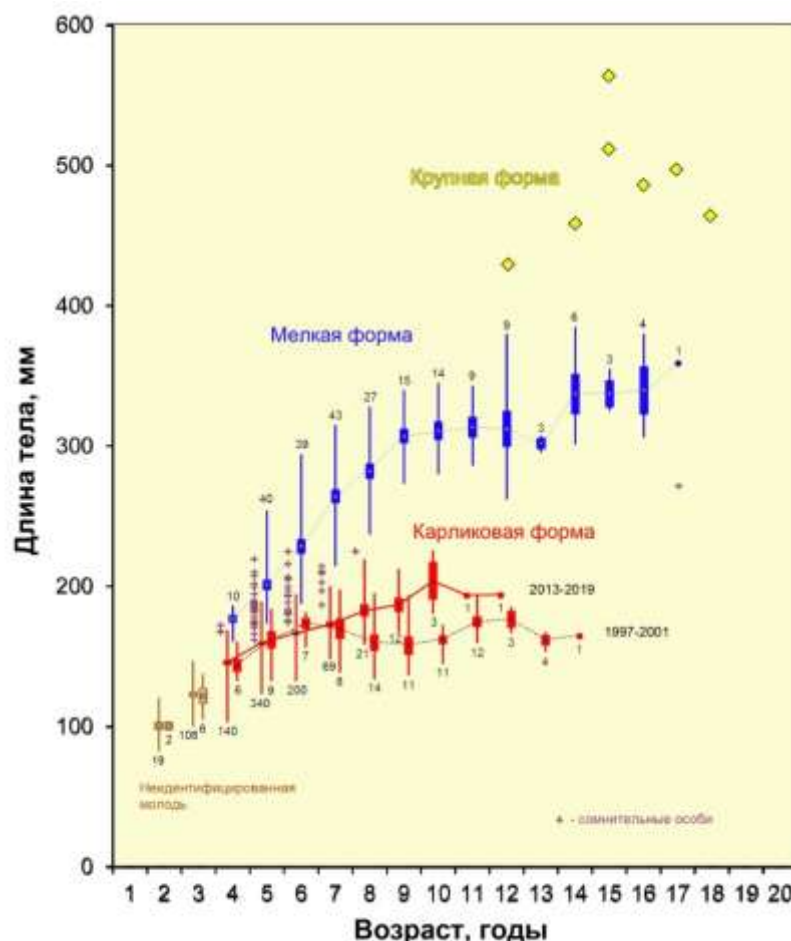


Рисунок 43 - Темп роста трёх форм арктического гольца *Salvelinus alpinus* из оз. Токко

– средние значения (точки), пределы варьирования (вертикальные линии) и удвоенные ошибки среднего (прямоугольники) длины тела в возрастных группах.

Между всеми формами обнаружены значительные экологические различия, а между карликовой и двумя другими – также существенные морфологические различия (рисунок 44). Мелкая и крупная формы морфологически близки и, видимо, являются эпигенетическими. Эти данные находятся в соответствии с результатами проведённого нами ранее микросателлитного анализа, согласно которым карликовая и мелкая формы достоверно различаются генетически, а мелкая и крупная генетически сходны.

Обнаружено, что в последние годы крупная форма исчезла, мелкая стала малочисленной, численность карликовой многократно возросла; резко сократилась доля старых особей карликовой и мелкой форм (рисунки 42 б, 44). Гольцы крупной формы были специализированными хищниками; мелкая форма ранее питалась преимущественно амфибиотическими насекомыми, а карликовая – амфибиотическими насекомыми и бентосом.

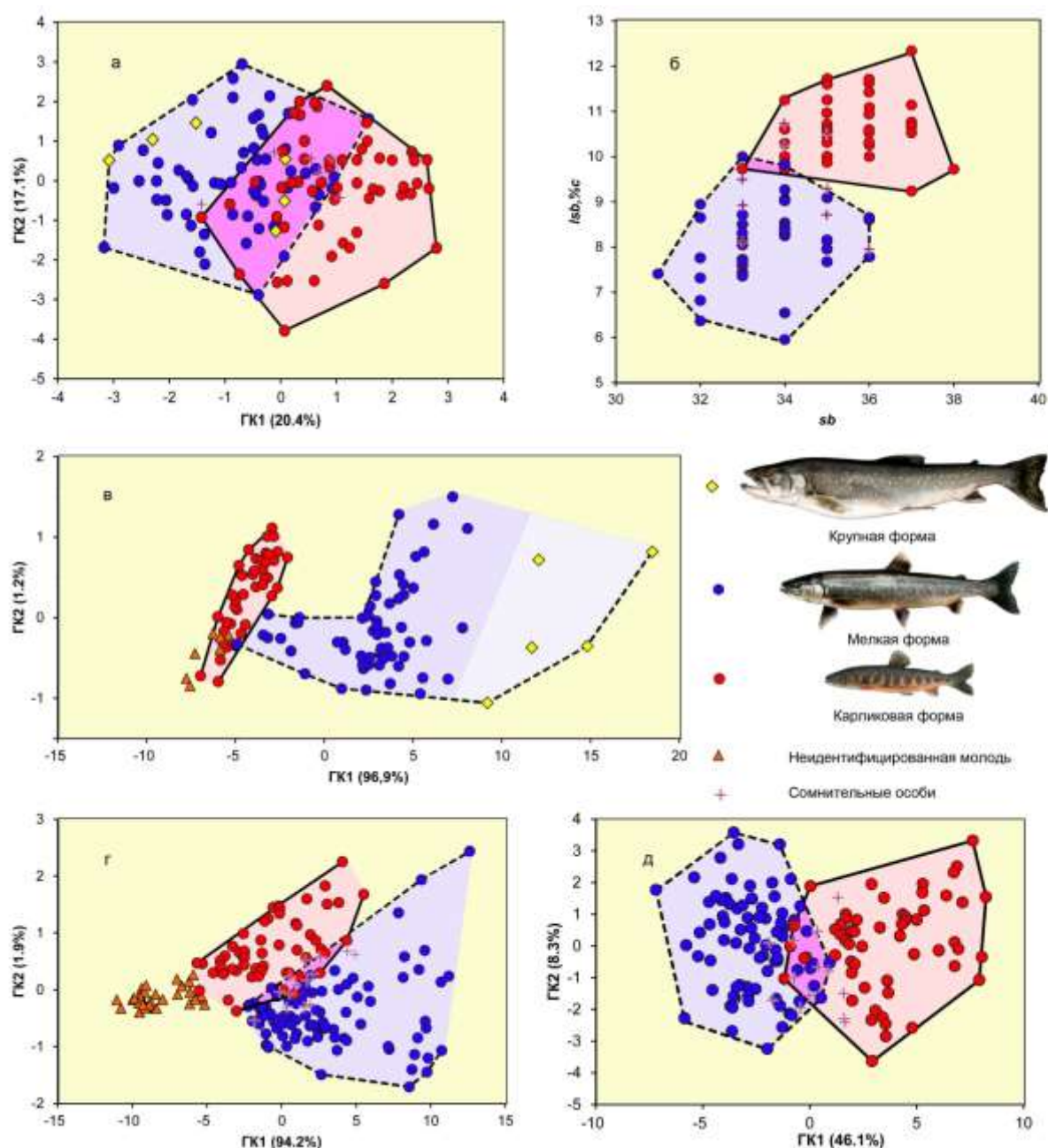


Рисунок 44 - Морфологические различия симпатрических форм арктического гольца *Salvelinus alpinus* из оз. Токко

а – по 9 меристическим признакам (распределение в пространстве первых двух главных компонент); б - по соотношению числа жаберных тычинок (*sb*) и индекса длины наибольшей жаберной тычинки (*lsb*, %); в-д – по пропорциям тела: в - онтогенетические каналы форм в пространстве первых двух главных компонент (абсолютные значения 27 промеров тела), 1997–2001 гг., г – то же, 2013–2019 гг.; д – различия карликовых гольцов и близкой к ним по размеру молодки мелких (особи длиной 13–24 см) в пространстве первых двух главных компонент по преобразованным по уравнению аллометрии логарифмам 26 промеров тела.

В настоящее время в связи с освобождением ниши хищника после исчезновения крупной формы мелкая перешла к ихтиофагии, а карликовая вслед за прекращением

хищничества со стороны крупной формы, снижением конкуренции со стороны мелкой формы и увеличением конкуренции внутри самой карликовой формы - преимущественно к планктофагии. Таким образом, и мелкая, и карликовая формы под влиянием антропогенного воздействия сменили свой трофический статус.

Исследование репродуктивных взаимоотношений и степени репродуктивной изоляции карликовой и мелкой форм показало, что первая нерестится с конца июля до середины августа на каменистых участках подводного берегового склона при температуре воды 5.0–6.5°; икра развивается до конца ноября–начала декабря при снижении температуры до 3.0–3.5°C. Вторая размножается поздней осенью, таким образом между этими формами имеет место темпоральная репродуктивная изоляция. Однако в последние годы нами отмечено, что некоторые мелкие гольцы нерестятся летом в одни сроки и в одних местах с карликовой формой. Полученные данные свидетельствуют о значительной, но неполной репродуктивной изоляции карликовой и мелкой форм и о том, что в настоящее время в связи с антропогенными изменениями в структуре популяции степень их интрогрессивной гибридизации возросла.

В рамках работ по изучению зоогеографии Байкальского региона опубликованы данные о находке в бассейне Байкала новой популяции арктического гольца, важной для понимания путей проникновения в него представителей ленской ихтиофауны. Известно, что в формировании гидрофауны оз. Байкал и водоёмов его бассейна важную роль играло вселение видов из соседних бассейнов [161, 162]. К числу таких видов относится арктический голец [163]. В последние десятилетия по мере накопления данных о его широком распространении в сопредельных частях бассейна Лены [159, 164, 165] стало очевидным, что заселение бассейна Байкала происходило из этого бассейна, скорее всего, через водораздел [166], однако конкретные пути оставались неясными. До недавнего времени в бассейне Байкала была известна только одна популяция арктического гольца [167]. Полтора десятилетия назад нами была обнаружена вторая [168], а теперь третья, в оз. Амут, расположенном в верховьях системы р. Верхняя Ангара [169] (рисунок 45). В отличие от первых двух, находящихся далеко от Байкало-Ленского водораздела, она проливает свет на вероятный путь проникновения этого вида в басс. Байкала, поскольку находится в 1 км от водораздельной линии на пологом участке водораздела с бассейном Витима (Мамы), где через него возможна миграция рыб даже без перехвата верховий рек. Вероятность инвазии в этом месте подтверждается тем, что в том же озере мы обнаружили ещё одного представителя ленской ихтиофауны - пестроногого подкаменщика *Cottus* cf. *roesilpus*, ранее не отмечавшегося в бассейне Байкала. Целенаправленные поиски позволили найти ещё три популяции этого вида в притоках северного Байкала [170].

Изучены морфология, возраст, рост, питание арктического гольца из оз. Амут в сравнении с другими гольцами бассейна Байкала, в частности, с гольцами из оз. Фролиха, свежие данные о которых опубликованы нами в прошлом году [171].

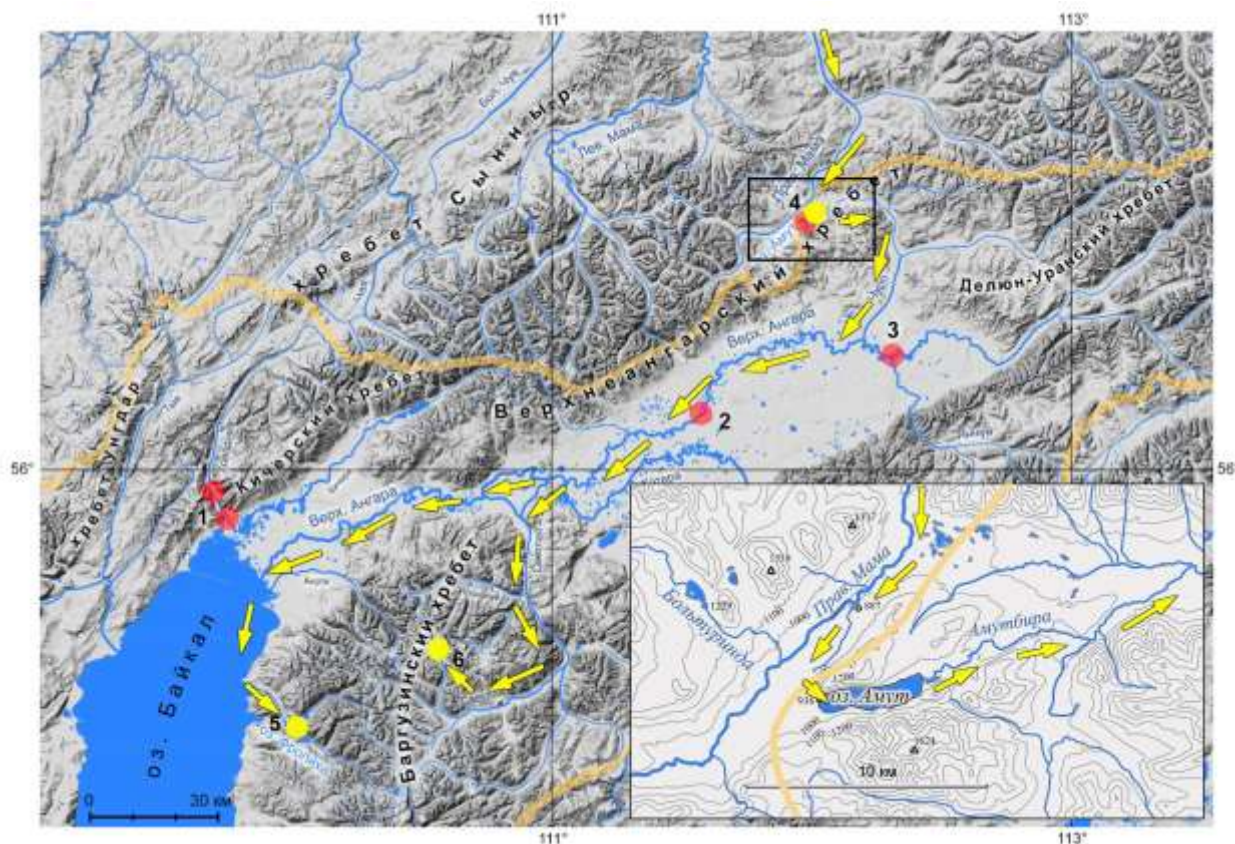


Рисунок 45 - Карта-схема северной части Байкало-Ленского водораздела. Граница водораздела показана светло-коричневой линией. Водоёмы, в которых отмечены пестроногий подкаменщик (1-4, красные кружки) и арктический голец (4-6, жёлтые кружки): 1 – р. Холодная; 2 – р. Верх. Ангара в районе пос. Нов. Уоян; 3 – р. Верх. Ангара в районе устья р. Янчуй; 4 – оз. Амут; 5 – оз. Фролиха; 6 – оз. Светлинское. Жёлтыми стрелками показан вероятный путь проникновения арктического гольца в бассейн Байкала и его распространения по нему.

Во всех популяциях арктического гольца из бассейна Байкала, включая оз. Амут, обнаружен широко распространённый предковый для сибирской подгруппы арктического гольца гаплотип контрольной области мтДНК SIB10, который также является единственным гаплотипом во всех популяциях сопредельных бассейнов Мамы и Чаи (система Лены) [159, 172]. Это подтверждает близкое родство байкальских популяций с их наиболее вероятными верхнеленскими предками из бассейна нижнего Витима.

Вопрос о времени проникновения арктического гольца в бассейн Байкала тесно связан с вопросом о времени его проникновения в забайкальскую часть бассейна Лены. Поскольку Восточная Сибирь не покрывалась сплошным ледниковым покровом, как Северная Европа [173], популяции арктического гольца могли существовать в ней

длительное время, не ограниченное послеледниковьем, как в северной Европе. В плейстоцене на территории Забайкалья было 4 оледенения убывающей мощности: самаровское ((290–260 – 230–200 тыс. лет назад), тазовское (180–130 тыс. лет назад), муруктинское ((90–100 – 50–55 тыс. лет назад) и сартанское (25–10 тыс. лет назад) [174, 175]. Во время этих оледенений на территории Восточной Сибири возникало гигантское ледниково-подпрудное Лено-Вилуйское палеозеро. Благодаря нему арктический голец смог попасть в удалённые от основной части ареала (побережья северных морей) внутренние области Восточной Сибири, в том числе в Забайкалье. Мы полагаем, что его проникновение в забайкальские горные верховья бассейна Лены могло произойти либо во время таяния самаровских ледников, либо в тазовское оледенение, когда Лено-Вилуйское озеро достигало границ Байкало-Станового нагорья [174, 175], т.е. 200–130 тыс. лет назад. После этого голец мог проникнуть в бассейн Байкала.

Таким образом, расширены представления о зоогеографии бассейна Байкала, об истории и путях проникновения в него аллохтонных видов рыб, а также о разнообразии до сих пор слабо исследованных арктических голецов и не исследованных пестроногих подкаменщиков этого бассейна.

Продолжены исследования филогеографии арктических России по данным анализа нуклеотидных последовательностей контрольной области мтДНК. Основное внимание было уделено изучению распространения выделенных по мтДНК трёх филогенетических линий арктического гольца в малоизученной области их контакта на севере Восточной Сибири. Проанализированы нуклеотидные последовательности мтДНК голецов из 10 заполярных популяций на участке от Енисея до Лены. На плато Путорана в озёрах Хантайское, Кета, Глубокое, Аян, Собачье отмечены гаплотипы атлантической подгруппы евроазиатской филогенетической группы, в последнем – совместно с гаплотипом сибирской подгруппы; атлантический гаплотип также найден в одном из озёр бассейна р. Хатанга. В районе дельты Лены обнаружены новые популяции голецов с гаплотипами сибирской подгруппы и берингийской группы (таблица 11, рисунок 46). Гаплотипы берингийской группы обнаружены у рыб, морфологически являющихся арктическими голецками, а не северной мальмой (*S. malma malma*), для которой характерны гаплотипы этой группы; они попали в их геном в результате древней интрогрессивной гибридизации с мальмой. Один из сибирских гаплотипов, найденных на Путоране и в дельте Лены, ранее отмечался в Забайкалье, в бассейнах Яны и Индигирки, ещё один, найденный на Путоране, отмечался в Забайкалье [176]. Новые данные вкупе с литературными позволяют уточнить ареалы трёх филогенетических линий и границы областей их перекрывания, свидетельствуют о широкой симпатрии гаплотипов атлантической и сибирской подгрупп в

водоёмах Таймырского района и подтверждают близкое родство гольцов сибирской подгруппы из всех основных областей её распространения.

Таблица 11 - Характеристика водоёмов, объём исследованного материала и обнаруженные гаплотипы контрольной области мтДНК у гольца *Salvelinus alpinus*

№	Водоёмы	Районы	Координаты		Форма гольца	Гаплотип	n, экз.
			с.ш.	в.д.			
1	Оз. Глубокое	П	69°16'	90°10'	«боганидская паляя»	SIB10	1
2	Оз. Собачье Р. Хоронен (приток оз. Собачье)	П	69°02'	91°15'	голец Дрягина	ATL32	1
			69°08'	91°55'	«боганидская паляя»	SIB20	2
3	Оз. Кета	П	68°41'	90°26'	«боганидская паляя»	ATL21(М)	1
4	Оз. Хантайское	П	68°17'	90°30'	Длиннотычиночный	ATL21(М)	9
5	Аян	П	69°10'	94°00'	«тыптушка»	ATL21(М)	2
					«гигант»	SIB4	2
					озёрно-речной	SIB4	1
					«путоранчик»	SIB4	7
6	Оз. Баяджяга	Х	72°11'	110°51'	крупная	ATL32	5
7	Оз. Дальнее	ДЛ	72°20.5'	125°39.5'	крупная	BER10	1
8	Оз. Переходное	ДЛ	72°20.5'	125°50'	крупная	SIB10	1
						SIB35	1
9	Оз. Булкурка-2	ДЛ	72°18'	126°10.5'	крупная	BER10	4
10	Оз. Ладаннах-Кюеле	ДЛ	71°48'	128°36'	крупная или мелкая	BER24	1
	Всего						39

Примечание. П – плато Путорана, Х – район Хатанги и Хатангской губы, ДЛ – дельта Лены.

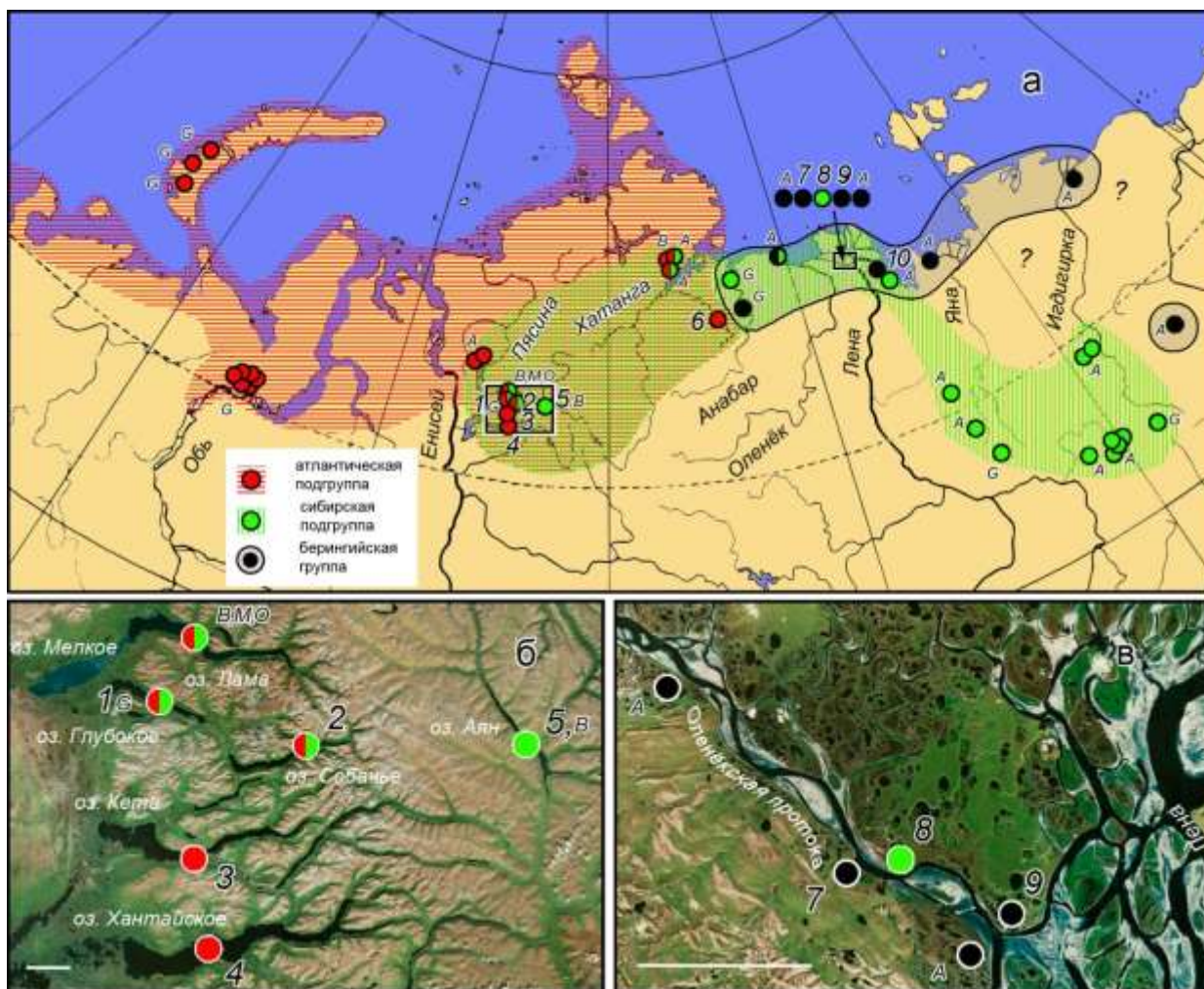


Рисунок 46 - Распространение трёх филогенетических линий гаплотипов контрольной области мтДНК арктического гольца *Salvelinus alpinus* на севере Сибири
а – карта-схема региона с ареалами групп и подгрупп гаплотипов; б – западная часть плато Путорана; в - участок Оленёкской протоки дельты Лены. Местоположение популяций, в которых проводилось изучение мтДНК: 1–10 – наши данные (нумерация как в табл. 1); В – Brunner et al., 2001; А – Alekseyev et al., 2009; М – Moore et al., 2015; О – Osinov et al., 2017, G – Гордеева и др., 2018) Масштаб на б,в - 20 км.

В 2021 г. проведены две экспедиции в бассейн р. Калар (приток Витима; Каларский район Забайкальского края) по изучению формообразования у арктического гольца. Первая – на озеро Каларский Даватчан для проверки предположения о весеннем нересте карликовой формы, обеспечивающем её темпоральную репродуктивную изоляцию от симпатрической крупной формы и изучения её размножения. Вторая – на обнаруженную нами группу населённых арктическим гольцом озёр в верховьях р. Чепы, притока р. Калар второго порядка, расположенную вблизи границы Забайкальского края с Амурской областью, для изучения особенностей симпатрической и аллопатрической дивергенции форм арктического гольца в группе мелких высокогорных озёр, образовавшихся при таянии

крупного плейстоценового ледоёма. Собран обширный материал для морфологических, экологических и генетических исследований.

Таким образом, в 2021 г. проведены исследования разнообразия, механизмов формообразования, истории расселения и филогеографии арктического гольца *Salvelinus alpinus*. Опубликованы результаты более чем 20-летнего изучения трофической экологии, морфологии, размножения и развития трёх симпатрических форм из озера Токко (северное Забайкалье). Обнаружены морфологические отличия карликовой формы от двух других; показано, что её репродуктивная изоляция достигается за счёт сдвига нереста на не характерное для гольцов летнее время. Долгосрочный мониторинг популяции показал, что в результате антропогенного воздействия произошли глобальные изменения её структуры, изменился трофический статус карликовой и мелкой форм и ослабели репродуктивные барьеры между ними. Обнаружена и описана третья в бассейне Байкала популяция арктического гольца. Эта находка позволила реконструировать вероятный путь проникновения гольца из бассейна Лены в бассейн Байкала через байкало-ленский водораздел. Сформулирована гипотеза колонизации арктическим гольцом Забайкалья из района северных морских побережий через плейстоценовое Лено-Вилуйское палеозеро 200-130 тыс. лет назад. В рамках продолжающихся исследований филогеографии арктических гольцов России проанализированы нуклеотидные последовательности мтДНК гольцов из 10 новых популяций плато Путорана, низовий Хатанги и дельты Лены. В результате уточнены ареалы трёх филогенетических линий гольца и границы областей их перекрывания, получены свидетельства широкой симпатрии гаплотипов атлантической и сибирской подгрупп в водоёмах Таймырского района и подтверждено близкое родство гольцов сибирской подгруппы из всех основных областей её распространения. Проведены две экспедиции в северное Забайкалье, в которых собран ценный материал по формообразованию у арктического гольца. По результатам проведённых работ опубликованы 3 статьи в журнале Q4 (Wos) – Q2 (Scopus).

Задача 2. В ходе исследования были определены нерестилища различных экоморф кроноцких гольцов [177] (рисунок 47) и определена годовая динамика температур на нерестилищах (рисунок 48).

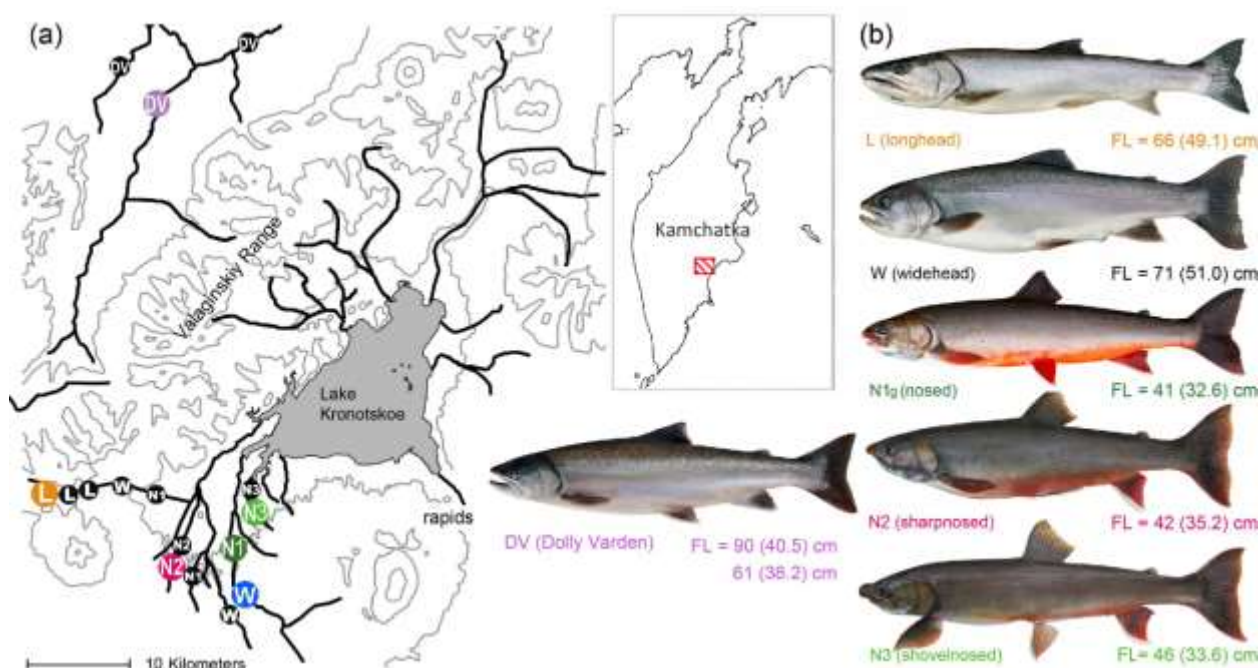


Рисунок 47 - Карта-схема нерестилищ различных морф кроноцких гольцов

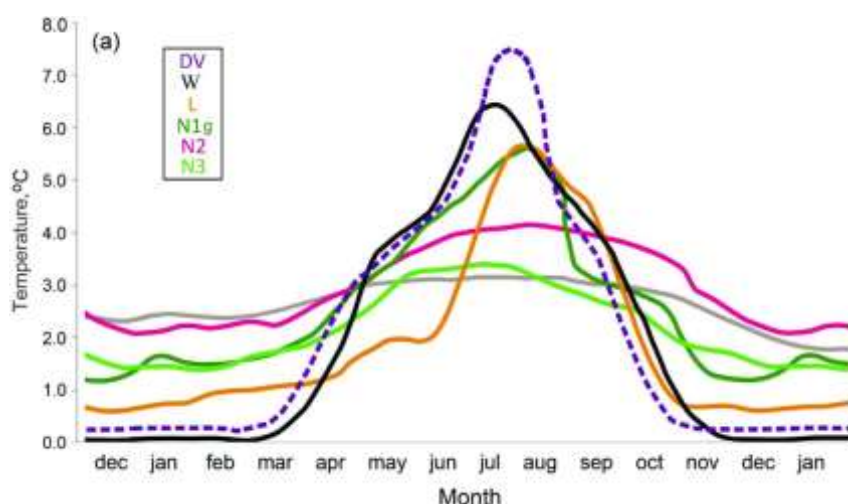


Рисунок 48 - Годовая динамика температур на нерестилищах кроноцких гольцов и предкового вида – проходной мальмы

В результате выращивания гольцов в разных температурных режимах была установлена зависимость их темпов роста и скорости онтогенеза от температур (рисунок 49). Показано, что именно температура является ключевым внешним фактором, определяющим такие важные онтогенетические события в жизни гольцов как выклев, выход из гнезда, начало активного питания и покатная миграция в озеро (рисунок 50). Различия температур на нерестилищах приводят к различиям в календарных сроках наступления данных событий и, как следствие, закладывают основу для экологической дифференциации гольцов. Кроме того, было установлено, что предковый вид – проходная мальма, обладает наибольшей степенью пластичности по отношению к внешним

температурам, в то время как узкоспециализированные формы демонстрируют адаптации к температурам, наблюдаемым на их нерестилищах. Все это указывает на ведущую роль температуры в процессах экологической и морфологической радиации пучка видов гольцов Кроноцкого озера.

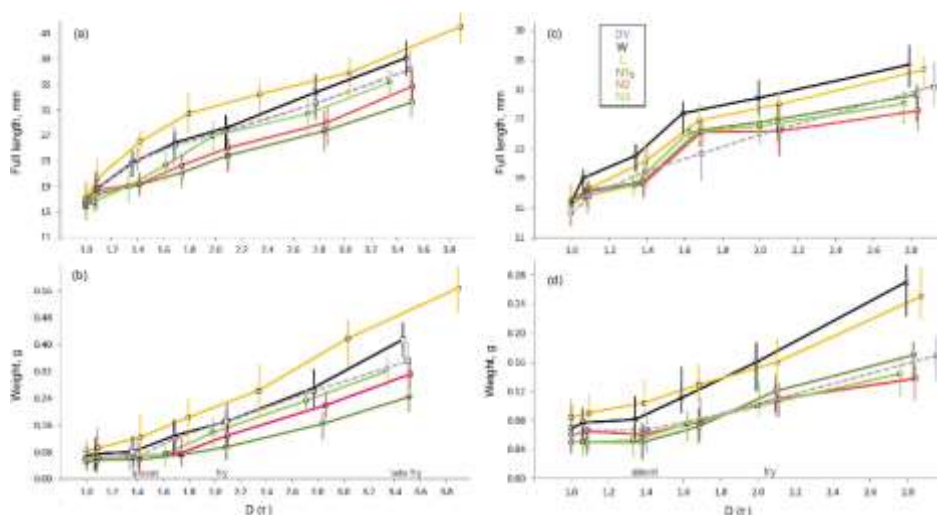


Рисунок 49 - Темпы роста (Full length) и набора веса (Weight) у экспериментальных гольцов, выращиваемых при естественных (a, b) и стандартной температуре (c, d)

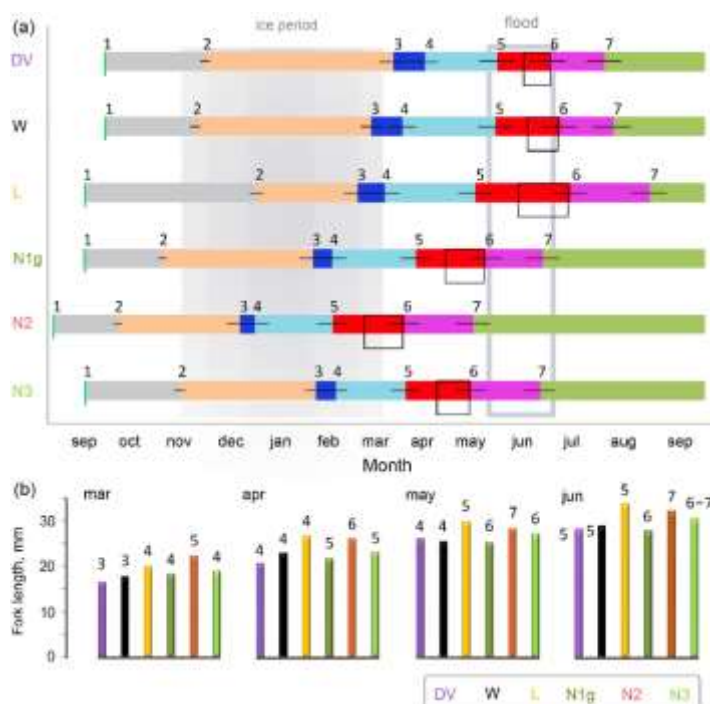


Рисунок 50 - Схема, демонстрирующая связь стадий развития гольцов (1-7) и их роста с фенологическими показателями (период ледостава, весеннее половодье)

Задача 3. Проведено сравнение физиологических показателей эндемичных гольцов (хищник – боганидская паля, *S. boganidae*: прибрежная и глубоководная морфа; планктоноядный – малоротая паля, *S. elgyticus*; бентофаг – длинноперая паля, *S. svetovidovi*), населяющих оз. Эльгыгытгын и различающихся по своей морфологии, экологии и образу жизни (рисунок 51).

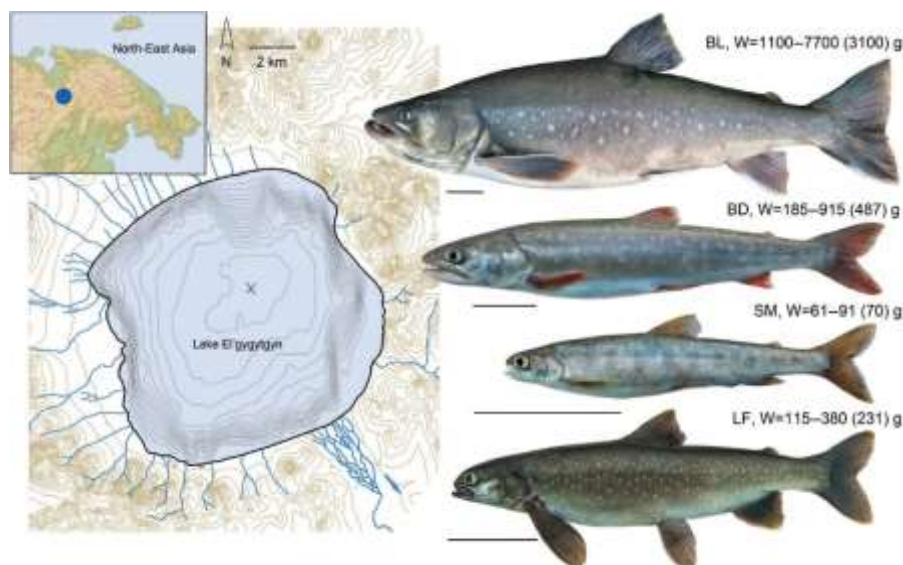


Рисунок 51 - Гольцы оз. Эльгыгытгын

BL/BD – боганидская паля, *S. boganidae*, прибрежная/глубоководная формы, SM – малоротая паля, *S. elgyticus*, LF – длинноперая паля, *S. svetovidovi*.

В результате исследования удалось обнаружить, что боганидская паля оз. Эльгыгытгын, ранее считавшаяся мономорфной, образует две морфологически и экологически различающихся морфы: глубоководная и прибрежная [178]. Сравнение физиологических показателей гольцов оз. Эльгыгытгын показало, что каждый из них обладает своим уникальным физиологическим фенотипом, связанным с особенностями экологии и образа жизни (рисунки 52, 53).

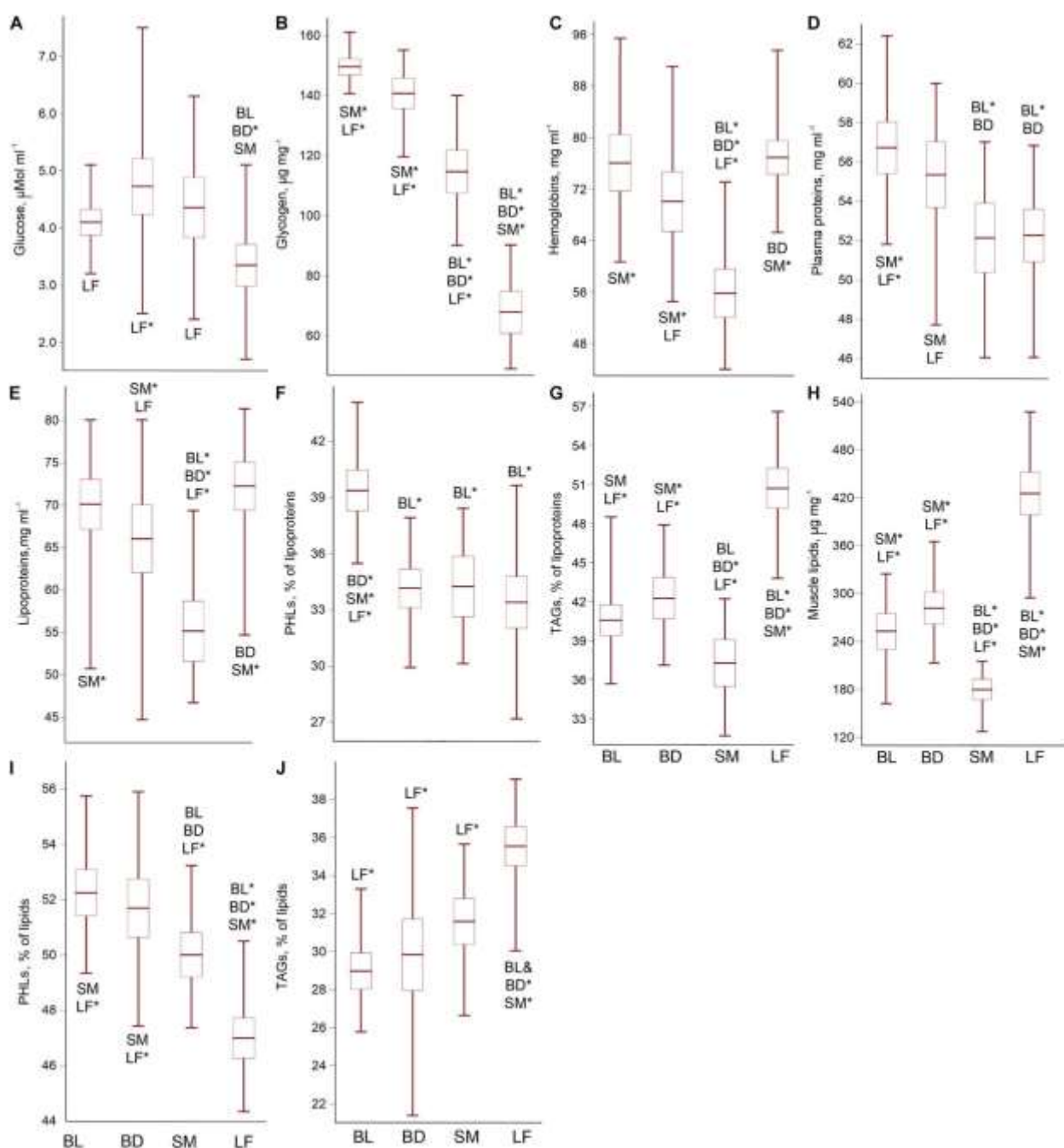


Рисунок 52 - Физиологические показатели гольцов оз. Эльгыгытгын

А – глюкоза крови, В – концентрация гликогена, С – уровень гемоглобина, D – протеины плазмы крови, E – липопротеины, F – % фосфолипидов в липопротеинах, G – % триацилглицеридов в липопротеинах, H – общие липиды мышц, I – % фосфолипидов в липидах мышц, J - % триацилглицеридов в липидах мышц.

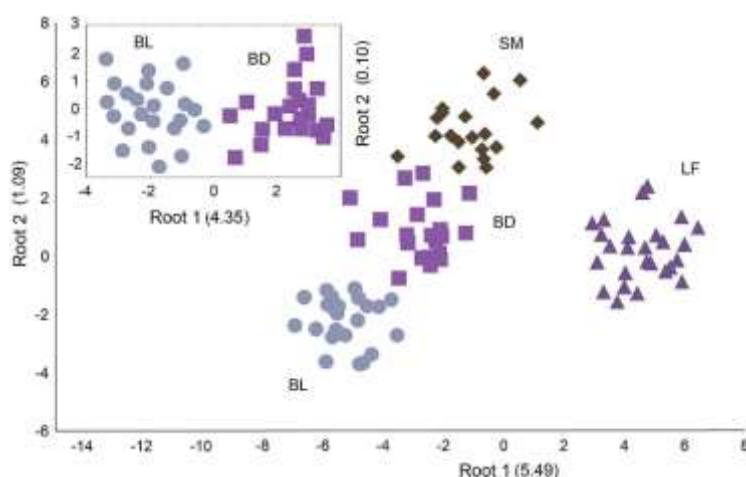


Рисунок 53 - Результаты сравнения физиологических фенотипов гольцов оз. Эльгыгытгын

Сравнение активности тиреоидной оси (рисунок 54) показало четкую связь между физиологическим фенотипом и данной эндокринной осью. Полученные данные позволили предположить сценарий освоения экстремально холодного и глубокого озера, возникшего более 3,5 млн лет назад в результате падения метеорита, гольцами р. *Salvelinus*.

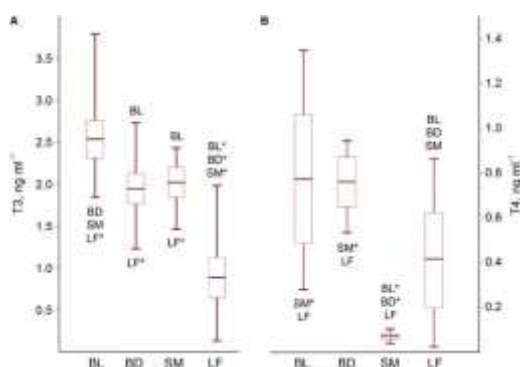


Рисунок 54 - Концентрация тиреоидных гормонов (Т₃ и Т₄) в плазме крови гольцов оз. Эльгыгытгын

Задача 4. В результате проведенных исследований были обнаружены внешние факторы и внутренние механизмы, лежащие в основе диверсификации двух экоморф мальмы в р. Камчатка: хищного каменного гольца и бентосоядной мальмы [179] (рисунок 54). Природные и экспериментальные данные показали, что основным внешним фактором является наличие растворенных в воде токсических веществ, присутствующих на нерестилищах каменного гольца, расположенных в зоне еловых лесов. Эти вещества образуются в результате разложения елового опада. На нерестилищах мальмы, расположенных в зоне широколиственных лесов, токсические вещества не образуются. При этом каменный голец демонстрирует высокую резистентность к токсическим веществам, связанную с активностью тиреоидной оси. Плейотропное влияние тиреоидных гормонов

приводит также к гетерохрониям в его развитии и, как следствие, формированию специфической морфологии и физиологии, позволяющим ему занять место хищника в экосистеме р. Камчатка. Зависимость резистентности к токсическим веществам, образующимся в результате разложения елового опада, а также темпов и сроков онтогенетических событий и особенностей физиологии от активности тиреоидной оси была подтверждена экспериментально и в природных популяциях (рисунок 55).

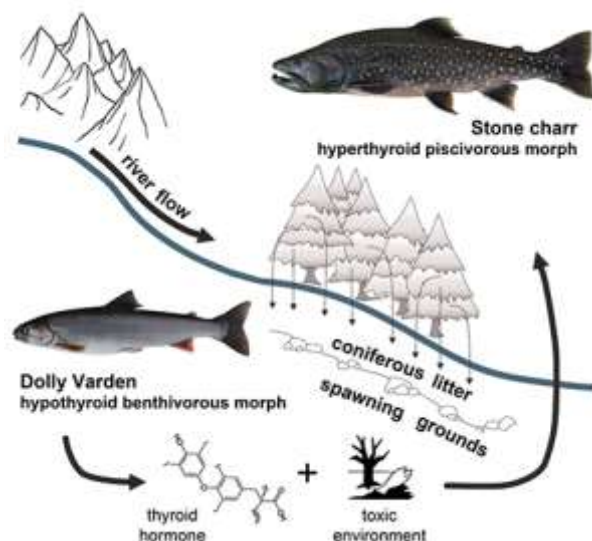


Рисунок 55 - Графический абстракт статьи, демонстрирующий связь внешних и внутренних факторов, определяющих экологическую и морфологическую диверсификацию каменного гольца и мальмы в р. Камчатка

Заключение

Изучены механизмы изменения онтогенетических траекторий морфологических и физиологических признаков в ходе видообразования у костистых рыб под влиянием внешних и внутренних факторов. По результатам работ опубликованы статьи в журналах *Animal Ecology* (Q1), *Frontiers in Ecology and Evolution* (Q1), *Plos One* (Q2).

Список использованных источников

149. Coyne J.A., Orr H.A. Speciation. Sinauer Associates Inc., 2004. Sunderland, MA, USA.
150. Klemetsen A. The most variable vertebrate on Earth // *J. Ichthyology*. - 2013. - Vol. 53. – No. 10. – P. 781-791.

151. Knudsen R., Klemetsen A., Alekseyev S., C.E. Adams . M. Power. The role of *Salvelinus* in contemporary studies of evolution, trophic ecology and anthropogenic change// *Hydrobiologia*. – 2016. – Vol. 783. – P. 1-9.
152. Doenz C.J., Krähenbühl A.K., Walker J., Seehausen O., Brodersen J. Ecological opportunity shapes a large Arctic charr species radiation // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2019. – Vol. 286. – N 1913. – P. 1-10.
153. Østbye K., Hassve M.H., Reris Tamayo A.M., Hagenlund M., Vogler T., Præbel K. “And if you gaze long into an abyss, the abyss gazes also into thee”: four morphs of Arctic charr adapting to a depth gradient in Lake Tinnsjøen // *Evolutionary Applications*. – 2020. – Vol. 13. – N 6. – P. 1240-1261.
154. Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб. - М.: Пищ. пром-сть, 1966. - 324 с.
155. Методическое пособие по изучению питания и пищевых отношений рыб в естественных условиях. - М.: Наука, 1974. - 254 с.
156. Baker T. T., Timmons L. S. Precision of ages estimated from five bony structures of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from the Wood River system, Alaska//*Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. – 1991. – Vol. 48, – P. 1007-1014.
157. Mina M.V., Mironovsky A.N., Dgebuadze Yu.Yu. Morphometry of barbel of Lake Tana, Ethiopia: multivariate ontogenetic channels // *Folia Zool.* – 1996. – Vol. 45. – Suppl. 1. – P. 109–116.
158. Reist J.D. An empirical evaluation of several univariate methods that adjust for size variation in morphometric data // *Can. J. Zool.* – 1985. – Vol. 63. – P. 1429–1439.
159. Alekseyev S.S., Bajno R., Gordeeva N.V., Reist J.D., Power M., Kirillov A.F., ... Matveev A.N. Phylogeography and sympatric differentiation of the Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.) complex in Siberia as revealed by mtDNA sequence analysis // *Journal of Fish Biology*. – 2009. – Vol. 75. – № 2. – P. 368-392.
160. Алексеев С.С., Самусенок В.П., Юрьев А.Л., Матвеев А.Н., Пичугин М.Ю., Хлыстов В.С., Коростелев Н.Б., Мишарина Е.А. Морфологическая и экологическая дифференциация симпатрических форм арктического гольца *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) в озере Токко (Северное Забайкалье) // *Вопросы ихтиологии*. – 2021. – Т. 61. – Вып. 1. – С. 65-87.
161. Матвеев А.Н., Самусёнок В.П. Происхождение (источники и пути проникновения) ихтиофауны озера Байкал // *Матер. науч. конф. «Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле»*. 2008. Новосибирск: Изд-во СО РАН. С. 401–414.

162. Пудовкина Т.А., Ситникова Т.Я., Матвеев А.Н., Щербаков Д.Ю. Родственные связи байкальских полихет рода *Manayunkia* [Polychaeta: Sedentaria: Sabellidae] по данным анализа CO1 с анализом истории расселения // Экол. генетика. – 2014. – Т. XII. – No 3. – С. 32–42.
163. Савваитова К.А., Максимов В.А., Медведева Е.Д. Даватчан *Salvelinus alpinus erythrurus* (Georgi) // Вопр. ихтиологии. – 1977. – Т. 17. – Вып. 2. – С. 203–219.
164. Алексеев С.С., Булдыгеров В.В., Пичугин М.Ю., Самусёнок В.П. Распространение арктического гольца *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) в Забайкалье // Вопр. ихтиологии. – 1999. – Т. 39. – No 1. – С. 48–56.
165. Alekseyev S.S., Samusenok V.P., Matveev A.N., Pichugin M.Yu. Diversification, sympatric speciation, and trophic polymorphism of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* complex) in Transbaikalia // Environ. Biol. Fish. – 2002. – Vol.64. – No 1–3. – P. 97–114.
166. Пронин Н.М., Матвеев А.Н., Самусенок В.П. и др. Рыбы озера Байкал и его бассейна. 2007. Улан-Удэ: Изд-во БурятНЦ СО РАН, 284 с.
167. Мухомедияров Ф.Б. К биолого-систематической характеристике даватчана // Тр. Вост.-Сиб. ун-та. – 1942. – Т. 2. – Вып. 3. – С. 119–126.
168. Самусёнок В.П., Алексеев С.С., Матвеев А.Н. и др. Вторая в бассейне Байкала и самая высокогорная в России популяция арктического гольца *Salvelinus alpinus* complex (Salmoniformes, Salmonidae) // Вопр. ихтиологии. – 2006. – Т. 46. – No 5. – С. 616–629.
169. Алексеев С.С., Самусенок В.П., Матвеев А.Н., Андреев Р.С., Самусенок И.В., Вокин А.И., Юрьев А.Л. Обнаружение арктического гольца *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) и пестроногого подкаменщика *Cottus* cf. *roscilopus* (Cottidae) в бассейне Верхней Ангары на водоразделе с системой Лены: новые данные о путях вселения представителей ленской ихтиофауны в бассейн Байкала // Вопр. ихтиологии. – 2021. – Т. 61. – No 3. – С. 314–325.
170. Андреев Р.С., Матвеев А.Н., Самусёнок В.П., Самусенок И.В., Юрьев А.Л., Вокин А.И., Алексеев С.С. Первые находки пестроногого подкаменщика *Cottus* cf. *roscilopus* Heckel, 1837 в бассейне Байкала // Изв. Иркутского госуниверситета. Серия: Биология. Экология. – 2020. – Т. 31. – С. 30–51.
171. Матвеев А.Н., Самусёнок В.П., Юрьев А.Л., Самусенок И.В., Андреев Р.С., Алексеев С.С. Эколого-биологическая характеристика рыб оз. Фролиха (Северный Байкал) // Изв. Иркутского госуниверситета. Сер.: Биология. Экология. – 2020. – Т. 32. – С. 50–82.
172. Гордеева Н.В., Алексеев С.С., Кириллов А.Ф. и др. Распространение, состав и родственные отношения филогенетических групп арктического гольца *Salvelinus alpinus* (L.) (Salmonidae) в европейской части России и Сибири по данным анализа нуклеотидных

последовательностей митохондриальной ДНК // *Вопр. ихтиологии*. – 2018. – Т. 58. – No 6. – С. 659–669.

173. Розенбаум Г.Э., Шполянская Н.А. Позднекайнозойская история криолитозоны Арктики и тенденции ее будущего развития. 2000. М.: Науч. мир, 100 с.

174. Еникеев Ф.И. Плейстоценовые оледенения восточного Забайкалья и юго-востока Средней Сибири // *Геоморфология*. – 2009. – Т. 2. – С. 33–49.

175. Еникеев Ф.И. Россыпеобразование в условиях гляциального морфогенеза восточного Забайкалья: Автореф. дис. ... докт. геол.-минерал. наук. 2011. Чита: Забайкал. ГУ, 41 с.

176. Гордеева Н.В., Алексеев С.С., Кириллов А.Ф., Романов В.И., Пичугин М.Ю.. Новые данные о распространении трёх филогенетических линий арктического гольца *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) в областях их контакта на севере Восточной Сибири // *Вопросы ихтиологии*. – 2021. – Т. 61. – No 5. – С. 545-552.

177. Esin E.V., Markevich G.N., Melnik N.O., Zlenko D.V., Shkil F.N. Ambient temperature as a factor contributing to the developmental divergence in sympatric salmonids // *PLOS ONE* – 2021. – Vol.16. – N 10. – e0258536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258536>

178. Esin E.V., Markevich G.N., Zlenko D.V. Shkil F.N. Thyroid-Mediated Metabolic Differences Underlie Ecological Specialization of Extremophile Salmonids in the Arctic Lake El'gygytgyn // *Front. Ecol. Evol.* – 2021. – Vol.9. – Art. N 715110. DOI: 10.3389/fevo.2021.715110

179. Esin E.V., Markevich G.N., Melnik N.O., Kapitanova D.V., Shkil F.N. Natural toxic impact and thyroid signalling interplay orchestrates riverine adaptive divergence of salmonid fish // *J Anim Ecol.* – 2021. – Vol. 90. – P. 1004 – 1019. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13429>

РАЗДЕЛ 7. ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ РАЗВИТИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ И ЗДОРОВЬЯ СРЕДЫ ПО БЛАГОПРИЯТНОСТИ ДЛЯ ЖИВЫХ СУЩЕСТВ. РАЗРАБОТКА ОСНОВ СОВРЕМЕННОГО МОНИТОРИНГА СОСТОЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Введение

Динамика численности популяции и ее возможные изменения являются индикатором состояния биоты при различных воздействиях окружающей среды, в том числе при изменении климата. Высокая плотность популяции может соответствовать как благоприятным условиям среды и высокому успеху размножения [180-183], так и неблагоприятному воздействию перенаселения, и низкому успеху размножения [183-186]. Показатель стабильности развития (степень флуктуирующей асимметрии морфологических признаков) обычно используется в качестве значимого популяционного параметра [187-189]. Ухудшение стабильности развития наблюдается при разных видах стресса [190-192]. Так, численность популяции может достигать настолько высокого уровня, что это отрицательно сказывается на стабильности развития. Такой эффект был зарегистрирован в ходе популяционных циклов [193, 194]. Крах циклической динамики в условиях изменения климата [195] свидетельствует о важности специального рассмотрения возможного соотношения изменений динамики популяции и стабильности развития.

Цель настоящей работы состоит в исследовании возможных изменений показателя стабильности развития обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L., 1758 в Центральной Сибири в условиях изменения климата. Четырехлетние циклы в этой популяции в прошлом веке сопровождались значительными изменениями показателей стабильности развития и успеха размножения, что свидетельствует о том, что высокая плотность является негативным фактором, влияющим на размножающихся самок [193]. Поисковая задача настоящего исследования – ответ на вопрос, наблюдаются ли изменения стабильности развития в современных условиях. Рабочей гипотезой является предположение о том, что обычные колебания численности популяции в изменившихся условиях не сопровождаются изменением стабильности развития, ухудшение стабильности развития может иметь место в случае неблагоприятного воздействия эффекта перенаселения в год пика численности популяции.

Материал и методы

Проведен анализ материала по обыкновенной бурозубке *Sorex araneus*, собранный в период 2014-2020 гг. в Центральной Сибири (восточный берег реки Енисей, Енисейская экологическая станция Института проблем экологии и эволюции РАН; 62° N, 89° E). Для исследования использовалась краниологическая коллекция Зоологического музея МГУ.

Было исследовано 200 особей. Сбор материала проводился по одной и той же методике ежегодно в течение 10 дней в конце июня и 10 дней в конце августа. Отлов проводился 20-метровыми канавками с двумя ловчими цилиндрами на расстоянии 5 м от концов канавки (места исследования и методы отлова подробно описаны в работе Sheftel [196]).

Был проведен анализ двух основных популяционных показателей, включая численность популяции и успех размножения. Число зверьков на 100 ловушко-суток использовали в качестве показателя численности популяции. Дополнительно велся расчет численности взрослых особей, родившихся прошлым летом, и молодых особей, родившихся этим летом. Показатель успеха размножения рассчитывался как отношение числа молодых особей, родившихся этим летом, к числу размножающихся самок. Показатель успеха перезимовки рассчитывался как отношение числа взрослых особей, пойманных в этом году, к числу молодых особей, пойманных прошлым летом.

Стабильность развития оценивалась по величине флуктуирующей асимметрии (как отклонения от идеальной симметрии морфологических признаков) [187, 197]. Использовали десять морфологических признаков (число отверстий на разных частях черепа) [194]. На первом этапе велся расчет разницы в числе отверстий на разных сторонах тела. Не было обнаружено значимой корреляции между асимметрией разных признаков, также, как и каких-либо свидетельств наличия направленной асимметрии и антисимметрии [192, 198]. Затем велся учет числа асимметричных признаков у каждой особи [199]. Средняя частота асимметричных проявлений на признак использовалась как интегральный показатель стабильности развития [193]. Для исследования использовали суммарные выборки молодых особей, этого года рождения (при соотношении полов 1:1 и отсутствии половых различий по изучаемым параметрам).

Результаты

Изменения численности за исследуемый период сопровождались изменением величины показателя флуктуирующей асимметрии (рисунок 56), значение которого достигает максимума в 2020 г. (разница между этим годом и годами низкой численности, 2014 и 2017 гг., статистически значима, $p < 0,05$). Такое снижение стабильности развития (увеличение величины флуктуирующей асимметрии) наблюдалось ранее во время популяционных циклов [193], при отсутствии значительных изменений стабильности развития во время популяционных флуктуаций [200]. Некоторые свидетельства положительной связи численности и флуктуирующей асимметрии ($r = 0,76$) и отрицательной связи численности и успеха размножения ($r = -0,56$) также отмечались ранее для популяционных циклов [193]. В то же время получены данные о положительной

корреляции численности как с количеством взрослых особей, родившихся прошлым летом ($r = 0,99$), так и с количеством молодых особей, родившихся этим летом ($r = 1,00$), при наличии положительной связи между количеством молодых и взрослых особей ($r = 0,98$), что указывает на роль условий среды [190, 193, 201]. Есть некоторые свидетельства отрицательной корреляции успеха размножения с количеством взрослых особей ($r = -0,68$). Существенно разные значения флуктуирующей асимметрии имеют место в годы сходных низких значений показателя успеха размножения (2016, 2017 и 2020 годы). Значение показателя успеха перезимовки колеблется от 0,34 до 0,87 в годы высокой численности и равно 0,01 в оба года низкой численности (2014, 2017). Есть тенденция положительной корреляции показателя успеха перезимовки с численностью популяции ($r = 0,71$) и отрицательной корреляции с успехом размножения ($r = -0,42$). Таким образом, за исследуемый период мы обнаруживаем определенные черты сходства как с популяционными циклами, так и с флуктуациями численности [193, 200, 201].

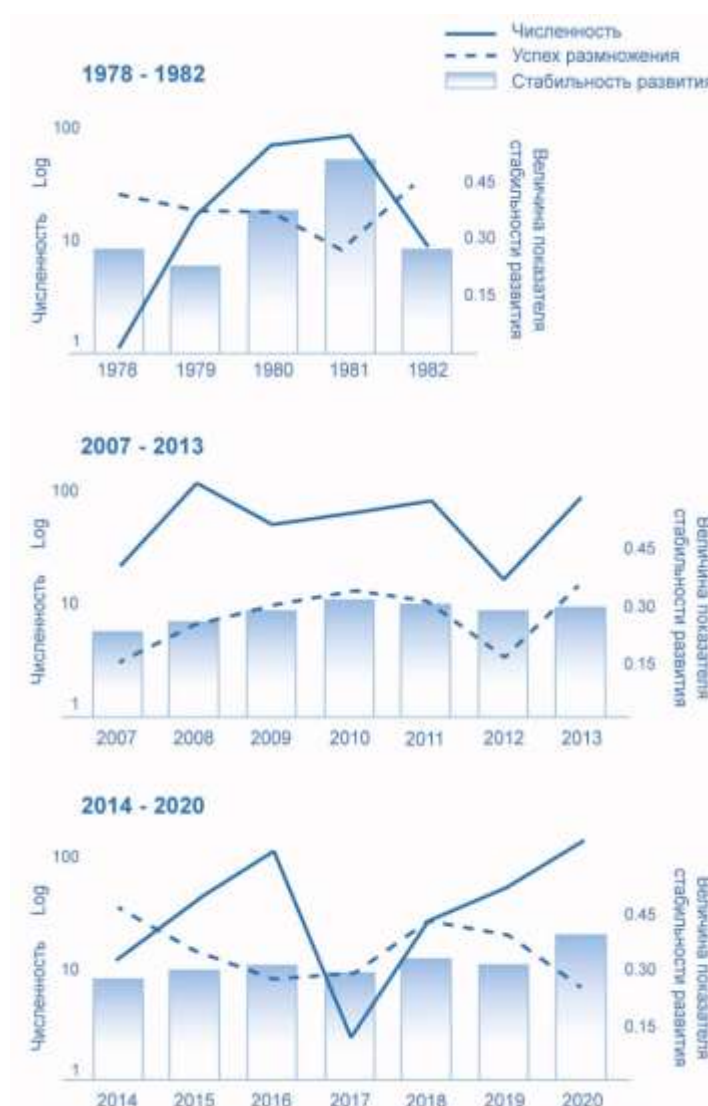


Рисунок 56 - Значения популяционных показателей в популяции обыкновенной бурозубки в Центральной Сибири в течение трех исследуемых периодов 1978-1982 гг. [193], 2007-2013 гг. [200] и 2014-2020 гг. (оригинальные данные). Численность: число зверьков на 100 ловушко-суток. Успех размножения: отношение числа молодых особей, родившихся этим летом, к числу размножающихся самок. Асимметрия: средняя частота асимметричного проявления на признак (для 10 краниологических признаков, число отверстий).

Популяционные циклы типичны для континентальных популяций со стабильным климатом, в то время как флуктуации численности типичны для популяций, населяющих районы климатической нестабильности [202-205]. Повсеместное изменение климата, связанное с усилением его нестабильности, приводит к коллапсу популяционной цикличности [195, 206-210]. Поскольку в случае перенаселения при достижении определенного порогового уровня численности популяции происходит ухудшение стабильности развития, оценка реальной ситуации в районах измененной динамики популяции является актуальной задачей.

В исследуемой популяции Центральной Сибири в условиях климатической стабильности прошлого века наблюдалась ярко выраженная четырехлетняя цикличность большинства видов сообщества мелких млекопитающих, включая обыкновенную бурозубку [196, 211]. Эффект перенаселения в год пика сопровождался низким успехом размножения и ухудшением стабильности развития [193].

Динамика численности популяции, выявленная в ходе повторного исследования в начале этого века, 2002-2013 гг., в условиях изменения климата больше соответствует флуктуациям численности, чем популяционным циклам. Тенденция положительной корреляции численности с успехом размножения служит подтверждением этому предположению. В этот период не получено свидетельств неблагоприятного воздействия высокой численности на стабильность развития. Это означает, что численность в исследуемый период не достигает критического порогового уровня для такого воздействия вследствие как климатической нестабильности, так увеличения богатства и емкости местообитаний в результате повышения температуры [200].

Динамика численности популяции в последний период исследования, 2014-2020 гг. имеет черты сходства с популяционными циклами, здесь наблюдается тенденция положительной корреляции численности с флуктуирующей асимметрией и отрицательной корреляции численности с успехом размножения. Несмотря на это, положительная корреляция численности популяции с количеством взрослых и молодых особей, а также с величиной показателя успеха перезимовки свидетельствует о влиянии условий среды, что характерно для флуктуаций численности популяции. Стабильность развития и показатели

успеха размножения варьируются независимо. Определенные изменения показателя успеха размножения в ходе колебаний численности популяции не сопровождаются изменением стабильности развития. В то время как ухудшение стабильности развития происходит в случае неблагоприятного воздействия перенаселения в год пика численности популяции, превышающего определенный пороговый уровень, возросший вследствие изменения климата.

Полученные результаты свидетельствуют о важности мониторинга возможных изменений природных популяций в связи с изменением климата. Параллельное исследование численности популяции и стабильности развития может обеспечить получение информации о возможных основных механизмах происходящих изменений.

Проведена оценка влияния климатических условий (зимних температур) на диагностический признак «зона спячки на поверхности резцов» [212]. Внутри- и межвидовая изменчивость паттерна, а также механизм образования “зоны спячки” на поверхности резцов выявленная у грызунов трех групп грызунов – сурков, сусликов и хомяков зависит от характера зимней спячки. Рост резцов у всех трех групп продолжается в период спячки. У сурков и сусликов, не питающихся в период спячки, нагрузка на резец до, в период и после спячки сильно меняется, прирост резца за период спячки минимальный, и на его поверхности образуется “зона спячки” и имеет два общих для сурков и сусликов признака – очень узкие приросты и изменение границы эмали и дентина. Межвидовые различия в характере “зоны спячки” у сурков и сусликов могут быть объяснены региональными различиями климата. У хомяков, которые могут питаться в период спячки, прирост резца за это время более существенный, нагрузка на резец меняется меньше, изменения границы эмали и дентина на поверхности резца нет и “зона спячки” отмечается только более узкими и четкими, по сравнению с суточными, приростами. Признак может быть включен в группу диагностических признаков при оценке влияния изменения климата на коренные виды, адаптированные к локальным условиям.

К ключевым ответам на пространственные и сезонные изменения температуры окружающей среды относятся изменения сроков фенологических явлений. Продолжающееся изменение климата может приводить к изменению фенологических циклов разных представителей растений и животных в зависимости от вида, среды обитания и изученных климатических факторов. Для выявления крупномасштабных закономерностей фенологических явлений, было проанализировано более 70 тысяч наблюдений за шесть десятилетий систематического мониторинга на территории бывшего СССР (рисунок 57) [213]. Среди 110 фенологических событий, связанных с растениями, животными, отмечается мозаичность изменений, опровергающая простые предсказания о

более ранней весне, более поздней осени и более сильных изменениях на более высоких широтах и возвышенностях. Было отмечено, что величина и направление фенологических изменений, помимо средней температуры, зависит от трофического уровня и относительного времени события. При этом отмечаются значительные различия между точками наблюдений и годами, причем для некоторых участков характерны непропорционально длинные сезоны, а для других - короткие. Полученные результаты подчеркивают важность продолжения проводимых наблюдений для мониторинга происходящих изменений в экосистемах вследствие климатической нестабильности.

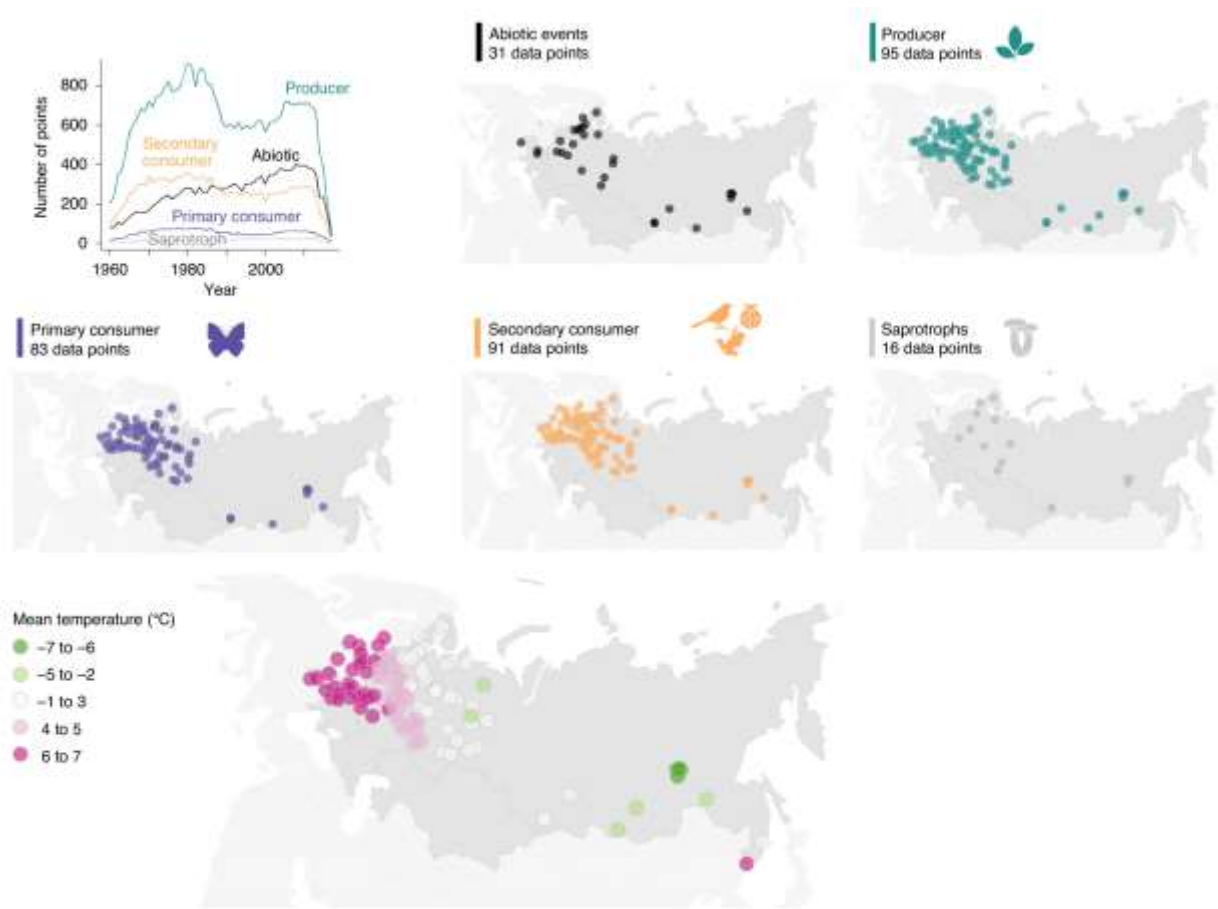


Рисунок 57 - Модель проводимого исследования и объем используемых данных. Отдельные вставки показывают: количество фенологических данных за год, включенных в исследование (вверху слева), пространственное распределение данных каждого типа (вверху и в середине) и среднегодовую температуру для каждого места отбора проб (внизу). Все события были классифицированы по четырем трофическим уровням: продуценты (растения), первичные консументы (травоядные насекомые), вторичные консументы (хищные насекомые, земноводные, птицы, млекопитающие) и редуценты (грибы).

Заключение

В отчетном году продолжалось исследование изменчивости морфологических, физиологических и популяционных показателей обыкновенной бурозубки под влиянием меняющихся климатических факторов. Показано, что наблюдаемые климатические

изменения отодвигают пороговые значения численности, превышение которых сопровождаются снижением стабильности развития. Признак «зона спячки на поверхности резцов» может быть использован для оценки независимого влияния зимних температур и условий спячки животных на стабильность развития в последующем сезоне размножения. Более 110 фенологических признаков и 70 тысяч наблюдений было проанализировано в ходе подведения итогов 60-летнего мониторинга состояния природных сообществ на территории бывшего СССР. Не получило подтверждения предположение о простой линейной зависимости состояния природных сообществ от локальных климатических изменений (времени наступления и завершения теплого сезона, средних температур и т.п.). Ведущую роль играют взаимодействия множества природных факторов. По результатам работ издано 2 статьи (Q1 и Q4), одна публикация на стадии подготовки.

Список использованных источников

180. Hansson L., Henttonen H. Rodent dynamics as community processes // Trends in Ecology & Evolution. – 1988. – Vol 3. – P. 195-200.
181. Kendall B.E., Briggs C.J., Murdoch W.W., Turchin P., Ellner S.P., McCauley E., Nisbet R.M., Wood Simon N. Why do populations cycle? A synthesis of statistical and mechanistic modeling approaches // Ecology – 1999. – Vol. 80. – P. 1789-1805.
182. Henttonen H., Wallgren H. Small rodent dynamics and communities in the birch forest zone of northern Fennoscandia. In Nordic Mountain Birch Ecosystem. Pages 261-278 in Wielgolaski, F. E., ed. UNESCO Man and Biosphere Series 27. 2001. Paris and Parthenon Publishing Group, New York and London.
183. Ims R.A., Fuglei E. Trophic Interaction Cycles in Tundra Ecosystems and the Impact of Climate Change // BioScience. – 2005. – Vol. 55. P. 311-322.
184. Pinot A., Gauffre B., Bretagnolle V. The interplay between seasonality and density: Consequences for female breeding decisions in a small cyclic herbivore // BMC Ecology – 2014. – Vol. 14. – N 1. – P. 17-33.
185. Zárybnická M., Riegert J., Bejček V., Sedláček F., Šťastný K., Šindelář J., Heroldová M., Vilímová J., Zima J. Long-term changes of small mammal communities in heterogeneous landscapes of Central Europe // European Journal of Wildlife Research. – 2017. – Vol. 63. – Art. N 89. DOI: 10.1007/s10344-017-1147-9.
186. Giraudoux P., Villette P., Quéré J.P., Damange J.P., Delattre P. Weather influences *M. arvalis* reproduction but not population dynamics in a 17-year time series // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – Art. N 13942. P. 1-11.

187. Soule M.E. Phenetics of Natural Populations. II. Asymmetry and Evolution in a Lizard // *American Naturalist*. – 1967. – Vol. 101. – P. 141-160.
188. Zakharov V.M. Future prospects for population phenogenetics // *Soviet scientific reviews. Physiology and general biology reviews. Section F*. – 1989. N 4. P. 1-80.
189. Moller A.P., Swaddle J.P. *Asymmetry, Developmental Stability, and Evolution*. Oxford University Press, 1997. Oxford, UK.
190. Pankakoski E. Epigenetic asymmetry as an ecological indicator in muskrats // *Journal of Mammalogy*. – 1985a. – Vol. 66. – P. 52-57.
191. Badyaev A.V., Foresman K.R., Young R.L. Evolution of Morphological Integration: Developmental Accommodation of Stress-Induced Variation // *American Naturalist*. – 2005. – Vol. 166. – P. 382-395.
192. Zakharov V.M., Shadrina E.G., Trofimov I.E. Fluctuating Asymmetry, Developmental Noise and Developmental Stability: Future Prospects for the Population Developmental Biology Approach // *Symmetry*. – 2020a. – Vol. 12. – Art. N 1376, DOI: 10.3390/sym12081376.
193. Zakharov V.M., Pankakoski E., Sheftel B.I., Peltonen A., Hanski I. Developmental stability and population dynamics in the common shrew *Sorex araneus* // *American Naturalist*. – 1991. – Vol. 138. P. 797-810.
194. Zakharov V.M., Yablokov A.V. (Eds.) Developmental homeostasis in natural populations of mammals: Phenetic approach // *Acta Theriologica*. – 1997. – Suppl. 4. – 90 pp.
195. Ims R.A., Henden J.-A., Killengreen S.T. Collapsing population cycles // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2008. – Vol. 23. P. 79-86.
196. Sheftel B.I. Long-term and seasonal dynamics of shrews in Central Siberia // *Annales Zoologici Fennici*. – 1989. – Vol. 26. P. 357-369.
197. Van Valen L. A study of fluctuating asymmetry // *Evolution*. – 1962. – Vol. 16. – P. 125-142.
198. Palmer A.R., Strobeck C. Fluctuating asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. – 1986. – Vol. 17. – P. 391-421.
199. Leary R.F., Allendorf F.W., Knudsen K.L. Developmental stability and enzyme heterozygosity in rainbow trout // *Nature*. – 1983. – Vol. 301. P. 71-72.
200. Zakharov V.M., Trofimov I.E., Sheftel B.I. Fluctuating Asymmetry and Population Dynamics of the Common Shrew, *Sorex araneus*, in Central Siberia under Climate Change Conditions // *Symmetry*. – 2020b. – Vol. 12. Art. N 1960. DOI:10.3390/sym12121960.

201. Pankakoski E. Relationship between some meteorological factors and population dynamics of *Sorex araneus* in southern Finland // *Acta Zoologica Fennica*. – 1985b. – Vol. 173. – P. 287-289.
202. Hansson L., Henttonen H. (1985) Gradients in density variations of small rodents: The importance of latitude and snow cover. *Oecologia* 67:394-402.
203. Aars J., Ims R.A. Intrinsic and climatic determinants of population demography: The winter dynamics of tundra voles // *Ecology*. – 2002. – Vol. 83. – P. 3449-3456.
204. Putkonen J., Roe G. Rain-on-snow events impact soil temperatures and affect ungulate survival // *Geophysical Research Letters*. – 2003. – Vol. 30, – N 4. – Art. N 1188. DOI:10.1029/2002GL016326.
205. Solonen T. Overwinter population change of small mammals in southern Finland // *Annales Zoologici Fennici*. – 2006. – Vol.43. – P. 295-302.
206. Hörnfeldt B. Long-term decline in numbers of cyclic voles in boreal Sweden: Analysis and presentation of hypotheses // *Oikos*. – 2004. – Vol. 107. – P. 376-392.
207. Berteaux D., Humphries M.M., Krebs C.J., Lima M., McAdam A.G., Pettorelli N., Reale D., Saitoh T., Tkadlec E., Weladji R.B. et al. Constraints to projecting the effects of climate change on mammals. *Climate Research*. – 2006. – Vol. 32. – P. 151-158.
208. Bierman S.M., Fairbairn J.P., Petty S.J., Elston D.A., Tidhar D., Lambin X. Changes over time in the spatiotemporal dynamics of cyclic populations of field voles (*Microtus agrestis* L.) // *American Naturalist*. – 2006. – Vol. 167. – P. 583-590.
209. Mertens S.K., Yearsley J.M., van den Bosch F., Gilligan C.A. Transient population dynamics in periodic matrix models: Methodology and effects of cyclic permutations // *Ecology*. – 2006. – Vol. 87. – P. 2338-2348.
210. Saitoh T., Cazelles B., Vik J.O., Viljugrein H., Stenseth N.C. Effects of regime shifts on the population dynamics of the grey-sided vole in Hokkaido, Japan // *Climate Research*. – 2006. – Vol. 32. P. 109-118.
211. Sheftel B.I. Role of different mechanisms in type determination of population dynamics for small mammals from boreal forestry zone. Pages 107-117. In: *Biological Diversity and Nature Conservation: Theory and Practice for Teaching*. 2010. KMK: Moscow, Russia.
212. **Клевезаль Г.А., Лобков В.А., Щепоткин Д.В.** Запись зимней спячки на поверхности резцов грызунов: внутривидовая изменчивость и межвидовые различия // *Зоологический журнал*. – 2021. – Т. 100. – No 5. – С. 524-539. DOI: 10.31857/S0044513421030065. – R – Klevezal G.A., Lobkov V.A., Shchepotkin D.V. Hibernation Record on The Incisor Surface: Intra- and Interspecies Variations//*Zoologicheskyy Zhurnal*. – 2021. – Vol. 100. – Is. 5. – P. 524-539. DOI: 10.31857/S0044513421030065. – Q4.

213. Roslin T., Antão L., Hällfors M., (...), **Minin A.2**, (...), Kurhinen J., Ovaskainen O. Phenological shifts of abiotic events, producers and consumers across a continent // Nature Climate Change. – 2021. – Vol.11. – Is. 3. – P. 241-248. DOI: 10.1038/s41558-020-00967-7. – Q1.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2021 г. направление эволюционных исследований Института представлено следующими темами: структура вида и межвидовая гибридизация, генетические основы адаптаций и межвидовых барьеров (в том числе связанные с брачным/коммуникативным поведением), эволюция половых хромосом и механизмов определения пола, роль хромосомных перестроек в видообразовании, изменчивость некодирующих областей генов и регуляторных последовательностей и сохраняющиеся в этой изменчивости геномные подписи быстрой эволюции, анализ палеонтологического материала и калибровка молекулярных часов, таксономические ревизии и применение молекулярных маркеров, видовое разнообразие и изменчивость природных сообществ под влиянием природных и антропогенных факторов, эволюционная изменчивость онтогенетических траекторий признаков в экспериментах и при анализе родственных видов, генетические и физиологические механизмы формирования эволюционных инноваций. Из 33 статей, индексируемых в WOS и представленных в составе отчетных публикаций (всего 37), 15 опубликованы в журналах Q1 и 3 – в журналах Q2, что подтверждает высокий уровень проводимых работ. Следует отметить несколько работ, имеющих серьезное фундаментальное значение. Это работы на моделях близкородственных видов рыб по анализу темпов и механизмов адаптивной радиации; проводимые на цитогенетическом и молекулярном уровнях исследования эволюции половых хромосом и полового размножения; анализ эволюционной роли консервативных генов (на примере *gas85D*) и их регуляторных последовательностей. Большое прикладное значение имеют исследования устойчивости/изменчивости природных сообществ и видового состава под влиянием природных и антропогенных факторов, в том числе в ходе климатических изменений, после пожаров, отлова или неконтролируемых охоты – рыболовства.

ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ

1. **Belkina E.G., Lazebny O.E., Gornostaev N.G., Mikhailov V.S.,** Danilenkova L.V., Besedina N.G., Bragina J.V., Kamyshev N.G., Sokolov V.V., **Kravchuk O.I.** Influence of the quick-to-court gene deletion on courtship behaviour of *Drosophila melanogaster* // Journal Genetics. – 2021. – Vol. 100. – Art. no 37. DOI: 10.1007/s12041-021-01284-4. – Q4.
2. **Belkina E.G., Lazebny O.E.,** Vedenina V.Yu. The Importance of acoustic signals in multimodal courtship behavior in *Drosophila virilis*, *D. lummei* and *D. littoralis* // Journal of Insect Behavior. – 2021. – P. 1-16. DOI: 10.1007/s10905-021-09788-8. – Q3.
3. **Belkina E.G.,** Shiglik A., Sopilko N.G., Lysenkov S.N., Markov A.V. Mate choice copying in *Drosophila* is probably less robust than previously suggested // Animal Behaviour. – 2021. – Vol. 176. – P. 175-183. DOI: 10.1016/j.anbehav.2021.04.007. – Q1.
4. **Bogdanov A.S.1,** Khlyap L.A., Kefelioglu H., Selcuk A.Y., Stakheev V.V., Baskevich M.I. High molecular variability in three pine vole species of the subgenus *Terricola* (*Microtus*, *Arvicolinae*) and plausible source of polymorphism//Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2021. – DOI: 10.1111/jzs.12539. – Q1
5. Boscari E., Marino I.A.M., Caruso C., Gessner J., Lari M., **Mugue N.2,** Barmintseva A., Suciu R., Onara D., Zane L., Congiu L. Defining criteria for the reintroduction of locally extinct populations based on contemporary and ancient genetic diversity: the case of the Adriatic beluga sturgeon (*Huso huso*)//Diversity and Distributions. – 2021. DOI: 10.1111/ddi.13230. – Q1
6. **Brandler O.V.1, Kapustina S.Yu.1,** Nikol'skii A.A., Kolesnikov V.V., Badmaev B.B., Adiya Ya. A study of hybridization between *Marmota baibacina* and *M. sibirica* in their secondary contact zone in Mongolian Altai//Frontiers in Ecology and Evolution. Special issue "Ecological, behavioral and genomic consequences in the rodent family Sciuridae: Why squirrels are so diverse?" – 2021. – Vol. 9. – Art. no 555341. DOI: 10.3389/fevo.2021.555341. – Q1
7. Ekimova I.A., Mikhлина A.L., Vorobyeva O.A., Antokhina T.I., **Tambovtseva V.G.1, Schepetov D.M.2** Young but distinct: description of *Eubranchius malakhovi* sp. n. a new, recently diverged Nudibranch species (Gastropoda: Heterobranchia) from the Sea of Japan. 2021//Invertebrate Zoology. – 2021. – Vol. 18. – Is. 3. – P. 197–222. DOI: 10.15298/invertzool.18.3.02. – S.
8. Esin E.V., Markevich G.N., Melnik N.O., Zlenko D.V., **Shkil F.N.** Ambient temperature as a factor contributing to the developmental divergence in sympatric salmonids // PLOS ONE. – 2021. – Vol. 16. – N. 10. – e0258536. DOI: 10.1371/journal.pone.0258536. – Q2
9. Esin E.V., Markevich G.N., Zlenko D.V. **Shkil F.N.** Thyroid-Mediated Metabolic Differences Underlie Ecological Specialization of Extremophile Salmonids in the Arctic Lake

El'gygytgyn // Front. Ecol. Evol. – 2021. – Vol. 9. – Art. N 715110. DOI: 10.3389/fevo.2021.715110. – Q1

10. Esin E.V., Markevich G.N., Melnik N.O., **Kapitanova D.V., Shkil F.N.** Natural toxic impact and thyroid signalling interplay orchestrates riverine adaptive divergence of salmonid fish // J. Anim. Ecol. – 2021. – Vol. 90. P. 1004-1019. DOI: 10.1111/1365-2656.13429. – Q1

11. **Galimov Y.R., Tukhbatullin A.R.,** Haag C.R, Tchabovsky A.V. Sex ratio effects on reproductive success of male and female *Daphnia* // Journal of Evolutionary Biology. – 2021. – Vol. 34. – Is 11. – P. 1817-1826. DOI: 10.1111/jeb.13942 – Q3.

12. Gil-Fernandez A., Matveevsky S., Martin-Ruiz M., Ribagorda M., Parra M.T., Viera A., Rufas J.S., Kolomiets O., **Bakloushinskaya I.I.,** Page J.. Sex differences in the meiotic behavior of an XX sex chromosome pair in males and females of the mole vole *Ellobius tancrei*: turning an X into a Y chromosome? // Chromosoma. – 2021. – Vol. 130. P. 113–131. DOI: 10.1007/s00412-021-00755-y. – Q2

13. Gilka W., Zakrzewska M., Lukashevich E., **Vorontsov D.,** Soszynska-Maj A., Skibińska K., Cranston P. Wanted, tracked down and identified: Mesozoic non-biting midges of the subfamily Chironominae (Chironomidae, Diptera) // Zoological Journal of the Linnean Society. – 2021. – P. 1–19. DOI: 10.1093/zoolinnean/zlab020 **Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.**

14. **Gornostaev N.G.I, Kulikov A.M.I** New data on distribution of *Mycodrosophila poecilogastra* (Loew, 1874) (Diptera: Drosophilidae) in Russia // Far Eastern Entomologist. – 2021. – N. 441. – P. 11-12. DOI: 10.25221/fee.441.2. – S.

15. Joharchi O., **Vorontsov D.D.,** Walter D.E. Oldest determined record of a mesostigmatic mite (Acari: Mesostigmata: Sejidae) in Cretaceous Burmese amber // Acarologia. – 2021. – Vol. 61, – P. 641–649. DOI: 10.24349/goj5-BZms. – Q3

16. Karamysheva T., Romanenko S., Makunin A., Rajičić M., **Bogdanov A.I,** Trifonov V., Blagojević J., Vujošević M., Orishchenko K., Rubtsov N. new data on organization and spatial localization of B-chromosomes in cell nuclei of the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* // Cells. – 2021. – Vol. 10. – Art. no. 1819. DOI: 10.3390/cells10071819. – Q2.

17. Khaustov A., **Vorontsov D.,** Perkovsky E., Klimov P. First fossil record of mite family Barbutiidae (Acari: Raphignathoidea) from late Eocene Rovno Amber, with a replacement name *Hoplocheylus neosimilis* nomen novum (Tarsocheylidae) // Systematic and Applied Acarology. – 2021. – Vol. 26. – P. 973–980. DOI: 10.11158/saa.26.5.12. **Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.**

18. Khaustov, A., **Vorontsov D.,** Perkovsky E., Lindquist E. Review of fossil heterostigmatic mites (cari: Heterostigmata) from late Eocene Rovno Amber. I. Families

Tarsocheylidae, Dolichocybidae and Acarophenacidae // Systematic and Applied Acarology. – 2021. – Vol. 26. N 1. – P. 33–61. DOI: 10.11158/saa.26.1.3. –**Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.**

19. Klimov P., **Vorontsov D.**, Azar D., Sidorchuk E., Braig H., Khaustov A., Tolstikov A. A transitional fossil mite (Astigmata: Levantoglyphidae fam. n.) from the early Cretaceous suggests gradual evolution of phoresy-related metamorphosis // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – Art. N 15113. DOI: 10.1038/s41598-021-94367-2.**Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.**

20. **Korshunova T.A.1**, Sanamyan N.P., Sanamyan K.E., Bakken T., Lundin K., Fletcher K., Martynov A.V. Biodiversity hotspot in cold waters: a review of the genus Cuthonella with descriptions of seven new species (Mollusca, Nudibranchia) // Contributions to Zoology. – 2021. – Vol. 90. – Is. 2. – P. 216-283. DOI: 10.1163/18759866-BJA10017. – Q1.

21. Levin B., Simonov E., Franchini P., **Mugue N.1**, Golubtsov A., Meyer A. Rapid adaptive radiation in a hillstream cyprinid fish in the East African White Nile River basin// Molecular Ecology. - 2021. - Vol. 30. DOI: 10.1111/mec.16130. – Q1

22. Matveevsky S., Chassovnikarova T., Grishaeva T., Atsaeva M., Malygin V., **Bakloushinskaya I.1**, Kolomiets O. Kinase CDK2 in mammalian meiotic prophase I: screening for hetero- and homomorphic sex chromosomes//International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. Is. 4. – Art. N 1969. DOI: 10.3390/ijms22041969. – Q1.

23. **Mugue N.2**, Barmintseva A., Etingova A., Didorenko S., Selifanova M., Mugue L., Popov A., Bulakhov A., Kupchinskiy A. Complete mitochondrial genomes of representatives of two endemic sculpin families (Perciformes: Cottoidei) from Baikal - the world's largest and deepest lake//Mitochondrial DNA Part B-resources. 2021. Vol. 6. Is. 11. P. 3190-3192. DOI: 10.1080/23802359.2021.1989330. – Q4

24. Roslin T., Antão L., Hällfors M., (...), **Minin A.2**, (...), Kurhinen J., Ovaskainen O. Phenological shifts of abiotic events, producers and consumers across a continent // Nature Climate Change. – 2021. – Vol. 11. – Is. 3. – P. 241-248. DOI: 10.1038/s41558-020-00967-7. – Q1.

25. Ruchin A.B., Egorov L.V., MacGowan I., Makarkin V.N., Antropov A.V., **Gornostaev N.G.**, Khapugin A.A., Dvorak L., Esin M.N. Post-fire insect fauna explored by crown fermental traps in forests of the European Russia//Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – Is. 1. – Art. no. 21334. DOI: 10.1038/s41598-021-00816-3. – Q1.

26. Ustinova E.N., **Schepetov D.M.1**, Lysenkov S.N., Tiunov A.V. Soil arthropod communities are not affected by invasive Solidago gigantea Aiton (Asteraceae), based on

morphology and metabarcoding analyses//Soil Biology and Biochemistry. – 2021. – Vol. 159. – Art. no 108288. DOI: 10.1016/j.soilbio.2021.108288. – Q1

27. Waterman J.M., Gossmann T.I., **Brandler O.¹**, Koprowski J.L. Editorial: Ecological, Behavioral and Genomic Consequences in the Rodent Family Sciuridae: Why Are Squirrels So Diverse?//Frontiers in Ecology and Evolution. 2021. Vol. 911. Art. no 765558. DOI 10.3389/fevo.2021.765558. – Q1.

28. **Алексеев С.С., Самусенок В.П., Матвеев А.Н.,** Андреев Р.С., Самусенок И.В., Вокин А.И., **Юрьев А.Л.** Обнаружение арктического гольца *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) и пестроногого подкаменщика *Cottus cf. poecilopus* (Cottidae) в бассейне Верхней Ангары на водоразделе с системой Лены: новые данные о путях вселения представителей ленской ихтиофауны в бассейн Байкала // Вопр. ихтиологии. – 2021. – Т. 61. – No 3. – С. 314-325. DOI: 10.31857/S0042875221030036. - **Alekseyev S.S., Samusenok V.P., Matveev A. N.,** Andreev, R.S., Samusenok I.V., Vokin A.I., **Yur'ev A.L.** Finding of Arctic charr *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) and sculpin *Cottus cf. poecilopus* (Cottidae) in the Verkhnyaya Angara basin near the divide with the Lena river system: new data about the invasion routes of the representatives of Lena ichthyofauna into Baikal basin // Journal of Ichthyology. – 2021. – Vol. 61. – N 3. – P. 396-406. DOI: 10.1134/S0032945221030024. – Q4

29. **Алексеев С.С., Самусенок В.П., Юрьев А.Л., Матвеев А.Н., Пичугин М.Ю.,** Хлыстов В.С., **Коростелев Н.Б.,** Мишарина Е.А. Морфологическая и экологическая дифференциация симпатрических форм арктического гольца *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) в озере Токко (Северное Забайкалье) // Вопросы ихтиологии. – 2021. – Т. 61. – Вып. 1. – С. 65-87. DOI: 10.31857/S0042875221010021. – R. - **Alekseyev S.S.,** Samusenok V.P., Yur'ev A.L., Matveev A.N., Pichugin M.Y., Khlystov V.S., **Korostelev N.B.,** Misharina E.A. Morphological and Ecological Differentiation of Sympatri Forms of Arctic Charr *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) in Lake Tokko (Northern Transbaikalia) // Journal of Ichthyology. – 2021. – Vol. 61. – Is. 1. – P. 109-129. DOI: 10.1134/S0032945221010021. – Q4

30. **Брандлер О.В.1, Тухбатуллин А.Р.1, Капустина С.Ю.1, Щепетов Д.М.2,** Титов С.В., Ермаков О.А. Изменчивость контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография большого суслика (*Spermophilus major*, Sciuridae, Rodentia) // Генетика. – 2021. – Т. 57. – № 7. – С. 820–831. DOI: 10.31857/S0016675821070055. – R. – **Brandler O.V.1,** Tukhbatullin A.R.1, Kapustina S.Y.1, Schepetov D.M.2, Titov S.V., Ermakov O.A. Variability of Mitochondrial DNA Control Region and Phylogeography of Russet Ground Squirrel (*Spermophilus major*, Sciuridae, Rodentia)//Russian Journal of Genetics. – 2021. – Vol. 57. – Is. 7. – P. 825-835. DOI: 10.1134/S102279542107005X. – Q4

31. Гордеева Н.В., **Алексеев С.С.**, Кириллов А.Ф., Романов В.И., **Пичугин М.Ю.** Новые данные о распространении трёх филогенетических линий арктического гольца *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) в областях их контакта на севере Восточной Сибири // Вопросы ихтиологии. – 2021. – Т. 61. – No 5. – С. 545-552. DOI: 10.31857/S0042875221050076. – Gordeeva N.V., **Alekseyev S.S.**, Kirillov A.F., Romanov V.I., **Pichugin M.Y.** New Data about the Distribution of Three Phylogenetic Lineages of Arctic Charr *Salvelinus alpinus* (Salmonidae) in their Contact Zones in the North of East Siberia // Journal of Ichthyology. – 2021. – Vol. 61. – Is. 5. – P. 701-708. DOI: 10.1134/S0032945221050064. – Q4
32. **Клевезаль Г.А.1**, Лобков В.А., **Щепоткин Д.В.1** Запись зимней спячки на поверхности резцов грызунов: внутривидовая изменчивость и межвидовые различия//Зоологический журнал. 2021. Т. 100. № 5. С. 524-539. DOI: 10.31857/S0044513421030065. – R. - **Klevezal G.A.1**, Lobkov V.A., **Shchepotkin D.V.1** Hibernation Record on The Incisor Surface: Intra- and Interspecies Variations//Zoologicheskyy Zhurnal. 2021. Vol. 100. Is. 5. P. 524-539. DOI: 10.31857/S0044513421030065. – Q4
33. **Рожкова Д.Н.**, **Зиневич Л.С.**, Карякин И.В., Сорокин А.Г., **Тамбовцева В.Г.**, **Куликов А.М.** Ненейтральная изменчивость цитохрома b у балобана *Falco cherrug* grey, 1834 и кречета *Falco rusticolus* L // Генетика. – 2021. – Т. 57. – No 4. – С. 454-463. DOI: 10.31857/S0016675821040123. – R – **Rozhkova D.N.2**, **Zinevich L.S.2**, Karyakin I.V., (...), **Tambovtseva V.G.1**, **Kulikov A.M.1** Non-Neutral Cytochrome b Variability in the Saker *Falco cherrug* Grey, 1834 and Gyrfalcon *Falco rusticolus* L. // Russian Journal of Genetics. – 2021. – Vol. 57. – Is. 4. – P. 468-476. DOI: 10.1134/S1022795421040128. – Q4.

Отчет утвержден Ученым советом 28 декабря 2021 года протокол № 14.