

ЗУЙКОВА ЕЛЕНА ИВАНОВНА

**ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, ФИЛОГЕНИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ
ВЕТВИСТОУСЫХ РАКООБРАЗНЫХ ГРУППЫ
DAPHNIA LONGISPINA SENSU LATO (CRUSTACEA: CLADOCERA)
СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ**

03.02.04

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт систематики и экологии животных Сибирского Отделения Российской Академии Наук (ИСиЭЖ СО РАН)

**Научный
консультант:**

Котов Алексей Алексеевич, доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории экологии водных сообществ и инвазий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва

**Официальные
оппоненты:**

Болотов Иван Николаевич, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Уральского отделения РАН, г. Архангельск

Алексеев Виктор Ростиславович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделением систематики лаборатории пресноводной и экспериментальной гидробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

Щербаков Дмитрий Юрьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры физико-химической биологии биолого-почвенного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Иркутский государственный университет, заведующий лабораторией геносистематики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт биологии внутренних вод** им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Некоузский район Ярославской области

Защита диссертации состоится _____ 2021 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 11. Факс: (383)217-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН и на сайте института www.eco.nsc.ru.

Автореферат разослан: «__» _____ 2021 года.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Петрожицкая Людмила Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Ветвистоусые ракообразные (Crustacea: Cladocera) являются широко распространенной группой микроскопических животных зоопланктона, бентоса, прибрежной зоны разнообразных континентальных водоемов – от временных луж до глубоких озер. На протяжении многих десятилетий представители рода *Daphnia* O.F. Müller, 1776 (Anomopoda: Daphniidae) активно используются в качестве модельных объектов в исследованиях, затрагивающих различные области биологии: экологию, физиологию, популяционную генетику, эволюционную биологию, филогеографию, и др. (Hebert, 1987; Гиляров, 1990; Colbourne et al., 1997; 2011; Benzie, 2005; The non-cosmopolitanism paradigm..., 2009; Lampert, 2011; Smirnov, 2013; Phylogeography of the *Chydorus*..., 2016; Phylogeography of *Daphnia*..., 2018 и т.д.). Этот род включает в себя наиболее известных представителей кладоцер, однако многими исследователями отмечалось, что он наиболее сложный среди ветвистоусых ракообразных в таксономическом отношении.

Виды группы *Daphnia longispina* sensu lato являются одними из самых обычных и массовых представителей рода, большая часть которых характеризуется высокой морфологической изменчивостью, в связи с чем до последнего времени не прекращаются дискуссии по поводу статуса некоторых обычных, в том числе, и для Северной Евразии, таксонов. Исследования, выполненные на различных представителях этой группы видов, позволили вскрыть ряд наиболее вероятных причин высокой фенотипической пластичности как реакции на изменение условий окружающей среды (защитные реакции на присутствие беспозвоночных и позвоночных хищников, цикломорфозы под действием абиотических факторов и пр.) при заметном вкладе в нее генетической составляющей.

Именно высокая фенотипическая пластичность особей в пределах группы *D. longispina* s.l. в течение всей истории ее изучения оставалась основным фактором, определяющим выделение в ее пределах большого числа видов и подвигов. Широкое использование молекулярно-генетического анализа позволило решить некоторые таксономические проблемы в пределах группы. Однако ранние усилия генетиков внесли некоторую путаницу в ее систематику (Kotov, 2015). В дальнейшем было показано, что сочетание рутинного морфологического анализа отдельных

партеногенетических и гамогенетических особей, изучение морфологической изменчивости на уровне популяций и видов в сочетании с оценкой генетической изменчивости способствует разрешению таксономических проблем в пределах многих видовых комплексов ветвистоусых ракообразных, в том числе и группы *D. longispina* s.l. Данные усилия лежат в рамках «интегративной систематики» – бурно развивающегося направления зоологических исследований. Благодаря такому подходу были проведены таксономические ревизии некоторых групп кладоцер, реконструкции филогенетических отношений на основе митохондриальных и ядерных маркеров, выявлены некоторые общие закономерности формирования современной фауны ветвистоусых ракообразных в различных географических масштабах.

Однако до настоящего времени многие аспекты, касающиеся систематики, видового разнообразия, генетической структуры, филогенетических отношений, филогеографии популяций и видов группы *D. longispina* s.l. остаются спорными и слабо изученными. Решению ключевых вопросов, связанных с механизмами формирования современного видового разнообразия этой группы видов и их распространения, препятствует крайне неравномерная изученность популяций, в частности, из водоемов российской части Евразии (по сравнению с другими регионами Голарктики – Западной и Центральной Европой, Северной Америкой). Эта же причина лежит в основе низкой эффективности и точности глобальных филогенетических и филогеографических реконструкций в пределах всего рода *Daphnia*. Между тем, результаты последних исследований показали, что Сибирь представляет собой источник скрытого видового разнообразия в группе *D. longispina* s.l., при этом популяции разных видов группы в этом регионе проявляют высокий уровень генетической дифференциации. Существующие пробелы можно устранить лишь посредством включения в морфологический и генетический анализ как можно большего числа популяций массовых, криптических и эндемичных видов группы *Daphnia longispina* s.l. из водоемов Северной Евразии.

Цель работы: выявить общие закономерности формирования и распределения современного биоразнообразия ветвистоусых ракообразных в водоемах азиатской части России на примере группы видов *Daphnia longispina* sensu lato.

Для достижения цели решались следующие **задачи:**

1. Выявить особенности современной фауны дафний азиатской части РФ и ее отдельных регионов.
2. Проверить диагностическую значимость традиционных и новых морфологических (морфометрических) и генетических признаков в пределах группы видов *Daphnia longispina* s.l.
3. Провести ревизию отдельных таксонов группы видов *Daphnia longispina* s.l., распространенных в азиатской России.
4. Реконструировать филогению группы видов *D. longispina* s.l. и ее отдельных таксонов на основании молекулярно-генетических данных по разным митохондриальным и ядерным генам.
5. Провести реконструкции процессов формирования фауны дафний в водоемах азиатской части РФ и Северной Евразии в целом при помощи филогеографического подхода, а именно выявить центры и пути расселения отдельных видов, локализацию возможных ледниковых рефугиумов.

Научная новизна. Впервые проведено масштабное изучение популяций ветвистоусых ракообразных группы *D. longispina* s.l. из водоемов Западной, Центральной и Восточной Сибири (бассейны рек Обь, Енисей, Лена, оз. Байкал). Особый интерес к данному региону обусловлен, во-первых, его слабой изученностью в филогеографическом отношении и, во-вторых, его статусом территории, на которой располагается переходная зона между восточным и западным фаунистическими надкомплексами кладоцер (Котов, 2016; Barcoding reveals..., 2016).

Предыдущие филогеографические работы были сосредоточены на популяциях из отдельных регионов Евразии (Европе, Японии, Дальнем Востоке РФ). В рамках проведенного нами исследования в филогенетический и филогеографический анализ массовых и редких видов группы *Daphnia longispina* s.l. были включены данные по обширнейшему региону – Восточной Евразии, что позволило впервые в истории изучения группы выполнить глобальные исследования исторических процессов на континенте в целом. Уточнены ареалы и определена зона контакта викарирующих видов *D. dentifera* и *D. longispina* s.str., переописаны криптические виды *D. umbra* и *D. turbinata*, а также выявлен новый (предположительно древний) вид *D. cf. longispina*.

По итогам исследования впервые сделаны обобщающие выводы по систематике, филогении и филогеографии группы *Daphnia longispina* s.l. в водоемах

Восточной Евразии. На основе исследования генетической изменчивости популяций одного вида из регионов с разной геологической историей в период плейстоцена (в частности, отличающихся по продолжительности и мощности оледенения) сделан вывод о том, что популяции с разной эволюционной историей вносят разный вклад в современное видовое разнообразие кладоцер.

Теоретическая значимость. Результаты комплексного подхода при изучении морфологии, филогении и филогеографии модельной группы *Daphnia longispina* s.l., примененного в диссертационном исследовании, вносят вклад в понимание путей и механизмов видообразования ветвистоусых ракообразных и пресноводных беспозвоночных в целом. Они представляют интерес для формирования стратегии сохранения биологического разнообразия пресноводной фауны, которое является основой стабильности экосистем. Предложенный подход дал возможность выявить различия в демографической истории массовых, и редких/эндемичных видов группы *Daphnia longispina* s.l. в водоемах азиатской части России, что способствует развитию биогеографических представлений о пресноводной фауне в целом. Данные о современной популяционно-генетической структуре видов группы *Daphnia longispina* s.l. свидетельствуют в пользу многократного чередования дисперсионных и викариантных событий в эпоху плейстоцена. Уникальность популяционно-генетической структуры у викарирующих видов *D. dentifera* и *D. longispina* s.str. объясняется неоднократными вторичными контактами между многочисленными генетически дивергентными филогруппами, выжившими в плейстоценовых рефугиумах. Образцы филогеографического разнообразия видов группы *Daphnia longispina* s.l. на территории Сибири, в частности, Алтае-Саянской горной страны, позволяют рассматривать данный регион как источник реликтовых таксонов и дивергентных митохондриальных линий, которые сохранились в местах существования гипотетических плейстоценовых рефугиумов. Данный вывод ставит вопрос о проверке популяций прочих таксонов ветвистоусых ракообразных, обитающих в регионе и рассматриваемых в качестве «широко распространенных в Евразии видов» на предмет их принадлежности к самостоятельным видам, представляющим собой эндемиков данного региона. То есть, наши работы открывают целый пласт новых систематико-фаунистических исследований.

Гипотеза о том, что обитание в водоемах Алтая и Саян реликтовой группы *D. longispina* s.str., которая выжила в плейстоценовых рефугиумах и быстро распространилась в постледниковый период, было основным препятствием для распространения других групп на запад и восток в период улучшения климатических условий, представляет общебиологический интерес. Таким образом объяснено, почему зона вторичного контакта *D. longispina* s.str. и *D. dentifera* находится именно в этой части Сибири. То есть, на примере дафний показано, что «старый» (пре-плейстоценовый) филогенетический паттерн играет важную роль при формировании современного паттерна у кладоцер.

Автором собрана уникальная коллекция проб зоопланктона из Западной и Восточной Сибири и ряда других регионов Северной Евразии, являющейся базой для последующих генетических исследований рода *Daphnia* и других ветвистоусых ракообразных.

Практическая значимость. Наши исследования в целом повысили точность идентификации видов в пределах группы *Daphnia longispina* s.l. и внесли заметный вклад в развитие систематики рода, в частности, позволили с высокой степенью надежности определять редкие таксоны. В результате изучения морфологических признаков особей и генетической структуры азиатских популяций были выявлены новые для России виды группы *Daphnia longispina* s.l. и предварительно очерчены их ареалы. Полученные сведения могут использоваться для разработки учебных программ при подготовке специалистов-гидробиологов. Полученные данные представляют интерес для фаунистов, гидробиологов-экологов и специалистов, работающих в области рыбного хозяйства, при оценке кормовой базы водоемов, проведения экологических экспертиз, природоохранного мониторинга, и т.п. В ходе выполнения работы подготовлен материал для определительных ключей рода *Daphnia longispina* s.l. Северной Евразии по морфологическим признакам, что является востребованным результатом, поскольку группа включает обыкновенные виды, являющиеся объектами исследований различной направленности, в том числе, в области охраны природы и эффективного менеджмента континентальных водоемов. Совершенствование морфологических методов определения дафний призвано обеспечить востребованность полученных результатов у местных специалистов-

гидробиологов, по большей части не имеющих доступа к современным молекулярно-генетическим методикам.

Методология и методы исследования. Впервые при изучении группы *D. longispina* s.l. применен комплексный «интегративный» подход, подразумевающий рутинный морфологический анализ особей в сочетании с геометрической морфометрией для изучения степени изменчивости формы тела у близкородственных видов и популяционно-генетическим анализом на основе митохондриальных и ядерных маркеров. Показано, что такой подход, во-первых, является наиболее эффективным инструментом для определения границ между морфологически сходными близкородственными и криптическими видами группы; во-вторых, позволяет получить единообразные временные и пространственные ряды морфологических и генетических данных для большого числа популяций и видов; в-третьих, сформировать стандартный подход к исследованию сложных в таксономическом отношении групп кладоцер. Целесообразность и новизна такого подхода заключается в возможности получать сопоставимые и разносторонние данные и быстро анализировать большой объем информации, а также существенно повышает достоверность полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Большая часть популяций группы *D. longispina* s.l. Восточной Евразии представлена криптическими и эндемичными видами, идентификация которых возможна только с помощью комплексного подхода, включающего морфологические, морфометрические и молекулярно-генетические методы анализа. Эти виды представляют собой остатки плейстоценовой фауны.

2. Максимальное число уникальных гаплотипов обнаружено в географически удаленных, предгорных и горных, регионах юга Сибири – бассейне р. Енисей, оз. Байкал и в озерах Забайкалья, т.е. в местах существования предполагаемых плейстоценовых рефугиумов.

3. Виды группы *D. longispina* s.l. характеризуются различной эволюционной историей, которая представляет собой последовательность дисперсионных и викариантных событий, происходивших неоднократно в разные периоды плейстоцена. Чрезвычайно высокое и уникальное гаплотипическое разнообразие сибирских популяций и видов группы *D. longispina* s.l. позволяет

рассматривать Сибирь как модельный регион для дальнейших филогеографических исследований.

Соответствие паспорту научной специальности. Работа соответствует Паспорту специальности 03.02.04 «Зоология», поскольку она посвящена изучению «многообразия и систематики животного мира», а также «закономерностям распространения ... и эволюции» животных. Работа лежит в областях исследования (1) Систематика животных и фаунистика и (2) Распространение и численность животных из Паспорта Специальности «Зоология» ВАК РФ.

Личный вклад соискателя. Автором лично собраны пробы зоопланктона из водоемов, расположенных в Новосибирской области, Алтайском и Красноярском крае, Республиках Алтай и Тыва в течение вегетационных сезонов 2004-2018 гг. Автор лично выполнил весь комплекс работ по проведению морфометрического и молекулярно-генетического анализа, а также первичной и статистической обработки полученных количественных данных. Большая часть рисунков выполнена лично автором. Гипотезы исследования сформулированы автором, постановка цели и задач исследования, анализ и интерпретация полученных результатов выполнены автором. Основные результаты диссертации представлены в публикациях, где диссертант является первым или единственным автором.

Степень достоверности результатов. Использование большого объема морфологических и генетических данных и применение разнообразных методов и подходов для их анализа обуславливает высокую надежность полученных результатов. Новые морфологические и генетические результаты достоверны, что подтверждается логическим обоснованием выводов и согласованностью результатов данного исследования с результатами, полученными ранее другими научными группами на схожих объектах исследования. При проведении генетических исследований применялись разнообразные статистические методы проверки достоверности результатов в соответствии с протоколами и алгоритмами из самых последних публикаций по филогенетике и филогеографии. Также достоверность полученных данных подтверждается их обнародованием в виде публикаций в международных изданиях, где они прошли рецензирование ведущими специалистами по тематике.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на: 9-м (Вербания, Италия, 2011 г.) и 10-м (Леднице, Чехия, 2014 г.) Международных Симпозиумах по ветвистоусым ракообразным (International Symposium on Cladocera); Международном Симпозиуме «Экология и эволюция: новые горизонты» (Екатеринбург, 2019); ряде других международных и российских конференциях – Сибирской Зоологической конференции (Новосибирск, 2004); Международной конференции «Природные условия, история и культура западной Монголии и сопредельных регионов» (Кызыл, 2005); Всероссийской конференции «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии» (Улан-Удэ, 2006); Всероссийской конференции «Биологические аспекты рационального использования и охраны водоемов Сибири» (Томск, 2006); Всероссийской школе-конференции «Ветвистоусые ракообразные: систематика и биология» (Борок, 2007); Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию Енисейской ихтиологической лаборатории «Проблемы и перспективы использования водных биоресурсов Сибири в XXI веке» (Красноярск, 2008); Всероссийской конференции «Проблемы биологии и экологии Байкальского региона» (Иркутск, 2009); Международной конференции «Экология водных беспозвоночных» (Борок, 2010); 2-й Международной конференции «Современное состояние водных биоресурсов» (Новосибирск, 2010); Всероссийской конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Б.Г. Иоганзена, (Томск, 2011); а также на отчетных сессиях Института систематики и экологии животных СО РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 31 научная работа, в том числе 16 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ и одна коллективная монография.

Структура и объем диссертации. Рукопись состоит из введения, семи глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Общий объем диссертации составляет 268 страниц машинописного текста, включая 16 таблиц, 34 рисунка и приложения А-Д. Список цитируемой литературы содержит 311 работ, в том числе 264 на иностранных языках.

Благодарности. Выражаю огромную, искреннюю благодарность своему научному консультанту – члену-корреспонденту РАН, Профессору РАН Алексею Алексеевичу Котову (ИПЭЭ РАН, г. Москва) за многочисленные консультации,

ценные советы и помощь, оказанную при подготовке диссертации. Особую признательность выражаю к.б.н. Н.А. Бочкареву за концепции, которые послужили отправной точкой данного научного исследования, а также многолетнюю помощь при проведении полевых работ; к.б.н. А.В. Катохину (ИЦиГ СО РАН) – за организацию и обучение молекулярно-генетическим методам; к.б.н. Е.П. Симонову и к.б.н. С.А. Абрамову – за помощь в освоении и использовании методов генетического и морфологического анализа полученных данных.

Хочу выразить огромную признательность коллегам из ИПЭЭ РАН и МГУ им. М.В. Ломоносова – д.б.н. Н.Н. Смирнову, д.б.н. Н.М. Коровчинскому, д.б.н. А.Ю. Синеву за многочисленные консультации, ценные советы и обсуждение проблем изучения ветвистоусых ракообразных. Отдельную благодарность хочу выразить к.б.н. Н.Г. Шевелевой (Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск) за предоставленные многочисленные, в том числе и уникальные, пробы дафний и многолетнюю дружескую поддержку.

Выражаю огромную признательность своим учителям – преподавателям из Красноярского государственного университета, благодаря которым у меня появилась возможность заниматься научными исследованиями, – профессору З.Г. Гольд, д.б.н. О.П. Дубовской и всем остальным преподавателям, тем, кто течение периода моего обучения (1982-1987 гг.) в той или иной мере оказал влияние на мой выбор.

Особую благодарность выражаю всем коллегам, которые в разное время оказывали помощь в сборе материала.

Благодарю всех своих соавторов за участие в подготовке совместных публикаций. Благодарю своих коллег, сотрудников ИСиЭЖ СО РАН – С.А. Корниенко, В.Ю. Ковалеву, Н.Б. Миронову за конструктивные дискуссии и дружескую поддержку. Выражаю свою глубокую признательность члену-корреспонденту РАН В.И. Евсикову и члену-корреспонденту РАН В.В. Глупову за поддержку на разных этапах исследований и внимание к моей работе.

Я глубоко благодарна своим родным за поддержку и всевозможную помощь на протяжении всей моей научной карьеры.

Исследования были выполнены при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проекты №№ 14-04-00926 и 20-04-00610).

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе содержится информация о современном состоянии систематики рода *Daphnia*, истории изучения рода в целом и группы *D. longispina* s.l. в частности. Показано, что, несмотря на продолжительный период исследований (с середины XVII в.), в морфологической систематике рода *Daphnia* до сих пор остается много проблем, а группа *D. longispina* s.l. считается одной из самых сложных групп (Korovchinsky, 1996; Kotov, 2015; Котов, 2016). Как было отмечено Котовым (2015), из всей массы предложенных к 2014 г. таксонов в пределах рода *Daphnia* только ~24% можно считать валидными видами. В недавно опубликованном ключе для определения кладоцер Палеарктики (Keys to Palearctic fauna..., 2019) определение особей подрода *Daphnia* s.str. предполагается только до уровня групп видов, что свидетельствует о невозможности идентифицировать особей до более глубокого таксономического уровня. В соответствии с последней сводкой по ветвистоусым ракообразным Северной Евразии (Ветвистоусые ракообразные..., 2021) в группе *D. longispina* s.l. выделяют пять относительно легко идентифицируемых видов. Здесь же отмечено, что таксон *D. (D.) longispina* O.F. Müller, 1776 s.l. сформирован криптическими видами, определение которых по морфологическим признакам практически невозможно.

Отмечен значительный вклад использования методов молекулярной генетики в исследования систематики ветвистоусых ракообразных. Генетический анализ позволяет с одной стороны установить или пересмотреть таксономический статус некоторых видов группы *D. longispina* s.l., а другой стороны происходит постоянное выявление криптических видов в ее пределах. Также в главе обсуждается развитие филогеографии ветвистоусых ракообразных. Один из важных результатов этих исследований заключается в признании факта континентального или регионального эндемизма кладоцер. Благодаря этому подходу были выявлены эволюционные механизмы, объясняющие высокое генетическое разнообразие и структурированность популяций кладоцер. Для объяснения этих явлений была предложена «гипотеза монополизации» (The monopolization hypothesis..., 2002).

В главе затронута проблема изучения криптического видового разнообразия, освещены основные моменты современного понимания и использования этого термина, а также проанализированы основные методы изучения криптических видов. Показано, что многие представители рода *Daphnia* в целом и группы *D. longispina* s.l.

в частности являются удобными объектами для изучения скрытого видового разнообразия.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В первом разделе главы приводятся формулировки общебиологических терминов и понятий, которых придерживались в исследовании. Далее представлено описание используемого первичного материала и методов, примененных для обработки морфологических и генетических данных.

Материал. Сбор проб зоопланктона проводили в водоемах из разных географических регионов России в период с 2004 по 2018 годы. Исследованиями были охвачены бассейны крупных сибирских рек – Обь, Иртыш, Енисей, Лена, Амур; также бассейн оз. Байкал и некоторые водоемы европейской части России (Рис. 1). Несколько точек сбора располагалось на территории Монголии и Австрии. Около половины проб было собрано автором в ходе различных экспедиций. Кроме того, для морфологических и генетических исследований был использован материал из коллекции лаборатории экологии пресноводных сообществ и инвазий Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН и типовых материалов Г.О. Сарпа (Zoological Museum of the Oslo University, Норвегия). В целом морфологическими и генетическими исследованиями охватили около 100 популяций разных видов группы *D. longispina* s.l., было проанализировано генетическими методами более 3000 особей. Основное внимание было уделено массовым видам *D. galeata*, *D. longispina* s.str., *D. dentifera* и *D. cucullata*, а также криптическим видам *D. umbra*, *D. turbinata*, *D. cf. longispina*.

Методы сбора и первичной обработки. При сборе проб зоопланктона использовали сети Апштейна и Джеди (размер ячеек 125 и 250 мкм). Сразу после сбора пробы фиксировали 5% раствором формалина с сахарозой (Haney, Hall, 1973) для морфологического анализа или 96% этанолом – для генетических исследований. Спиртовые пробы хранили при температуре -20 °С. Всех исследуемых особей по возможности идентифицировали до вида (или группы видов) согласно ключам, представленным в работах С.М. Глаголева (Glagolev, 1986), Д. Флосснера и К. Крауса (Flößner, Kraus, 1986), М. Алонсо (Alonso, 1996), Д. Бензи (Benzie, 2005), Определителе пресноводных беспозвоночных России (1995) и Определителе зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России (2010).

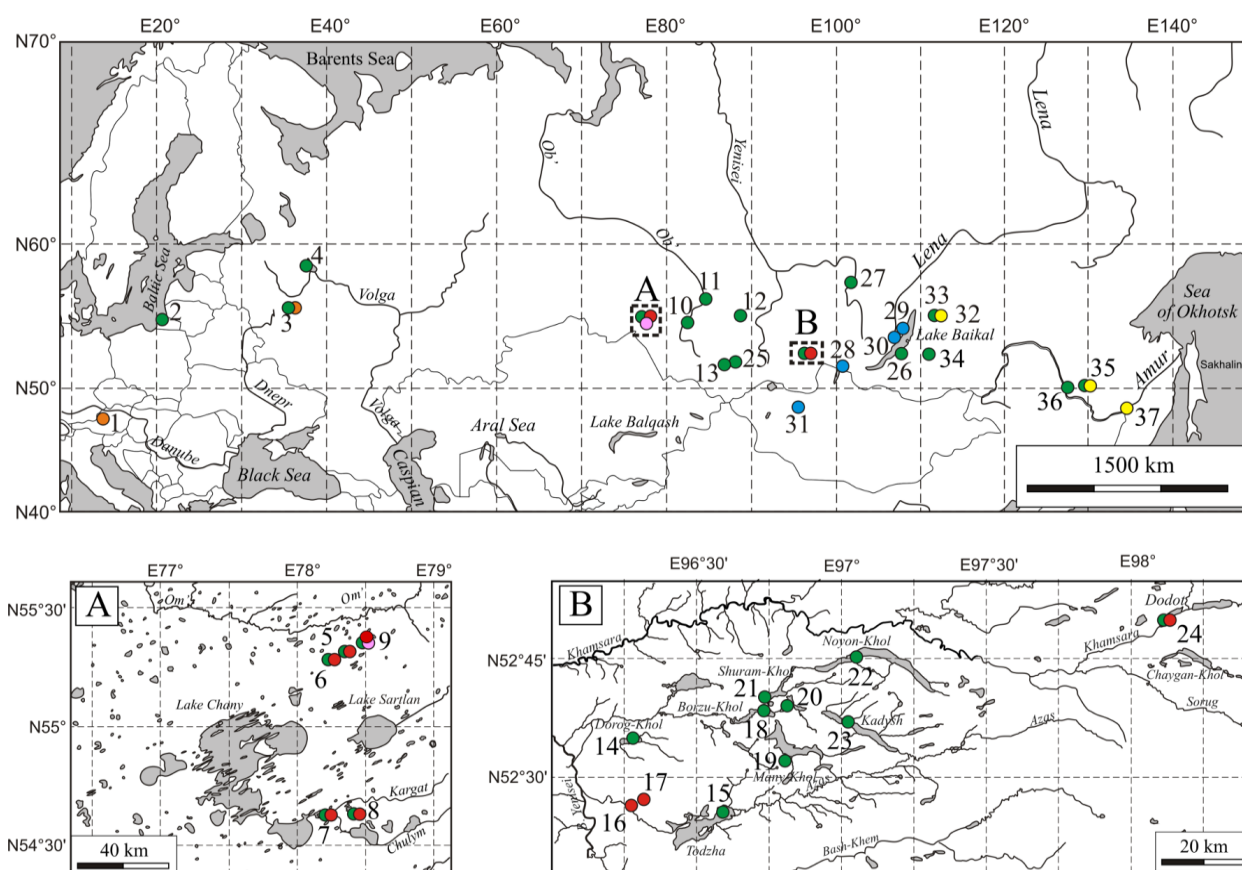


Рисунок 1 – Карта сбора проб дафний. Верхняя часть – общая карта; **A** – бассейн оз. Чаны (Западная Сибирь, Новосибирская область); **B** – водоемы Тоджинской котловины (Республика Тыва). Зеленые кружки – *D. galeata*; красные – *D. longispina* s.str.; оранжевые – *D. hyalina*; голубые – *D. dentifera*; розовые – *D. cf. longispina*; желтые – *D. cristata*

Морфологический и морфометрический анализ. Для выявления диагностических признаков проводили препарирование партеногенетических, эфиппидальных самок и половозрелых самцов при помощи заточенных вольфрамовых игл (Dumont, Negrea, 2002); отдельные структуры изучали при разном увеличении (объективы от $\times 4$ до $\times 100$). Рисунки выполняли при помощи рисовального аппарата, установленного на оптическом микроскопе Olympus CX 41 в лаборатории экологии пресноводных сообществ и инвазий ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН и на основе цифровых фотографий, полученных с помощью микроскопа с фото-видеокамерой AltamiBio 2T (Altami, Россия) в ИСиЭЖ СО РАН.

Изменчивость формы тела у партеногенетических самок пятой размерно-возрастной группы (Зуйкова, Бочкарев, 2010а) изучали с помощью метода геометрической морфометрии (Rohlf, 1998; Павлинов, Микешина, 2002; Geometric morphometrics..., 2004). Каждую особь для дальнейшего морфометрического анализа фотографировали с помощью камер, установленных на микроскопы различных

марок. Перед морфометрическим анализом цифровые изображения дафний масштабировали в программах AxioVision v.1.0 и ImageJ v.1.48 (<http://imagej.nih.gov/ij>).

Для получения данных о форме тела цифровые изображения дафний обрабатывали с помощью пакета программ tps (Rohlf, 2004; 2005a). Изменчивость между морфами/видами изучали по морфологическим данным, полученным на основе 16 ландмарок (с учетом хвостовой иглы); между популяциями и видами – на основе 14 ландмарок. Ландмарки характеризовали форму следующих структур: относительное положение и угол рострума (L1-L3); самая высокая точка головы/шлема (L4); наибольший изгиб дорсального края головы и раковины (L5-L8); нижний край раковины (L9; L9-L11); изгиб вентрального края раковины (L10-L13; L11-L15) и положение глаза относительно вентрального края головы (L14; L16) (Рис. 2 А, Б).

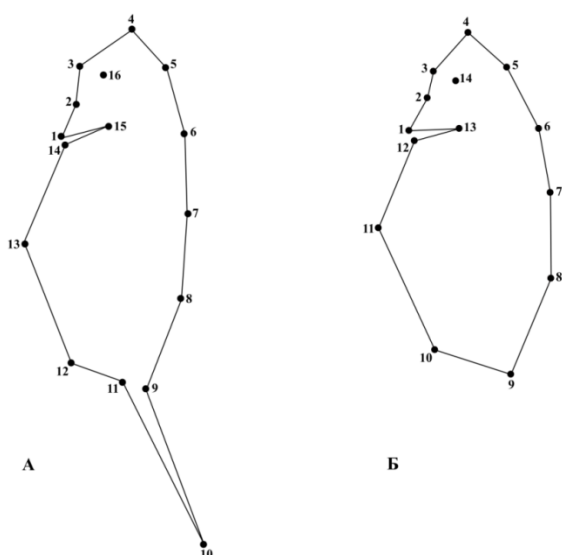


Рисунок 2 – Конфигурация меток (ландмарок), описывающих общую форму тела дафний и используемых в анализе изменчивости с помощью метода геометрической морфометрии. **А** – конфигурация ландмарок при изучении изменчивости между морфами/видами; **Б** – при изучении популяционной и межвидовой изменчивости (в том числе, между криптическими видами)

Полученные конфигурации меток трансформировали и стандартизировали относительно центроидного размера и выравнивали согласно алгоритму общего прокрустова анализа (General Procrustes Analysis, GPA) в программе TpsRelw v.1.46 (Rohlf, Slice, 1990; Rohlf, Marcus, 1993). Оценку популяционной и межвидовой изменчивости формы тела дафний проводили на основе анализа относительных деформаций (RW) с помощью канонического дискриминантного анализа ковариационной матрицы частных деформаций (Rohlf, 1993). Для визуализации изменений формы тела дафний вдоль дискриминантных осей (DFA scores) использовали деформационные решетки для крайних вариантов ($\alpha = 0$), основанные на методе тонких пластин (TPS) (Bookstein, 1989). Частные деформации (PW) вместе с линейной составляющей получали в программе tpsRelw v.1.46 (Rohlf, 2005b) и

использовали в статистических анализах. Все статистические анализы выполняли в программе PAST v.3.06 (Hammer et al., 2001).

Для оценки различий в форме тела между морфами и формами/видами дафний использовали однофакторный непараметрический анализ PERMANOVA и однофакторный дисперсионный анализ MANOVA. Для оценки влияния размерных различий на форму тела дафний вычисляли регрессии переменных CS (центроидный размер, используемый как независимая размерная переменная формы) на канонические переменные (Павлинов, Микешина, 2002; Bornholdt et al., 2008). Для оценки влияния условий внешней среды (глубина водоема, температура, прозрачность и pH) на распределение видов дафний применяли многофакторный анализ MANOVA. Распределение видов по отношению к факторам внешней среды и его визуализацию оценивали с помощью анализа неметрического многомерного шкалирования (NMDS) (Taguchi, Oono, 2005). Морфологические отношения между криптическими видами группы *D. longispina* s.l. дополнительно анализировали с помощью кластерного анализа по средним значениям относительных деформаций с помощью метода UPGMA (unweighted pair-group) в программе PAST v.3.06.

Генетический анализ. Общую геномную ДНК экстрагировали из отдельно взятых, фиксированных 96% этанолом, особей с помощью протеиназы K (Genetic markers..., 1998) или 5% раствора Chelex 100 resin (BioRad, США).

Анализ генетической изменчивости в природных популяциях видов группы *D. longispina* s.l. выполняли по данным, полученным при амплификации фрагментов двух некодирующих генов 16S и 12S рРНК и одного белок кодирующего гена ND2 (НАДН-дегидрогеназа субъединица 2) митохондриальной ДНК. Дизайн праймеров для амплификации указанных фрагментов мтДНК был как оригинальный, так и заимствованный из литературных источников (Morphological differentiation..., 2010; Colbourne, Hebert, 1996; Ishida et al., 2006; Taylor et al., 2005). ПЦР продукты очищали и секвенировали по прямому и обратному праймерам в «Центре секвенирования ДНК» СО РАН (г. Новосибирск, Россия, <http://sequest.niboch.nsc.ru>) и в компании СИНТОЛ (г. Москва, Россия, www.syntol.ru). Полученные нуклеотидные последовательности редактировали вручную в программе BioEdit v.7 (Hall, 1999). Оригинальные последовательности депонировали в международную базу данных GenBank.

Для реконструкции филогенетических отношений между видами группы *D. longispina* s.l. нуклеотидные последовательности генов митохондриальной ДНК были сгруппированы в три набора данных. Первый, «полный 12S блок» состоял из 477 оригинальных и полученных из базы данных GenBank последовательностей фрагмента гена 12S рРНК. «Оригинальный 12S блок» включал 150 исключительно оригинальных последовательностей фрагмента гена 12S; и третий, «объединенный блок», состоял из 49 оригинальных последовательностей фрагментов генов 12S+16S+ND2. Выбор моделей нуклеотидных замен, описывающих эволюцию изучаемых последовательностей, выполняли с помощью программы jModelTest v.2.1.7 на основе показателей правдоподобия и информационных критериев Акаике (AIC) и Байеса (BIC) (Guindon, Gascuel, 2003; jModelTest 2..., 2012). Для 12S фрагментов мтДНК лучшими моделями были General Time Reversible модель с инвариантными сайтами и гамма распределением (GTR+I+G, $\alpha = 0.38$; Tavaré, 1986) и модель Тамуры-Нея с гамма распределением (TrN+G, $\alpha = 0.25$; Tamura, 1992). Филогенетические деревья были реконструированы в программе MEGA v.7.0 на основе алгоритма максимального правдоподобия (ML) (Kumar et al., 2016). Для оценки статистической достоверности в узлах ветвления филогенетических деревьев применяли бутстрэп тест при числе репликаций равном 1000 (Saitou, Nei, 1987). Байесовский анализ выполняли в программе MrBayes v.3.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001; Ronquist, Huelsenbeck, 2003) согласно GTR+I+G (полный 12S блок) и GTR+G (оригинальный 12S блок) моделям.

Лучшую эволюционную модель для объединенного (12S+16S+ND2) блока данных определяли с помощью программ PartitionFinder v.2 (PartitionFinder 2..., 2016) и IQ-TREE v.1.5.4 (Minh et al., 2013; IQ-TREE v.1.5.4..., 2014; ModelFinder..., 2017) на основе информационных критериев AIC и BIC. Байесовский анализ для объединенного блока мтДНК выполняли в программе MrBayes v.3.2. Две синхронных серии каждая с четырьмя Марковскими цепями вычислялись для 1×10^6 при частоте записи параметров равной 500. Стационарность была подтверждена как указывалось выше с помощью оценки параметров эффективного размера выборки ($ESS > 500$) и трассировочных графиков в программе Tracer v.1.7.

В качестве альтернативного подхода для визуализации филогенетических отношений между видами группы *D. longispina* s.l. использовали неукорененную

простирающуюся сеть (split network), реализованную в программе SplitsTree4 v.4.10 (Huson, Bryant, 2006).

Полиморфизм нуклеотидных последовательностей оценивали по следующим параметрам: число полиморфных (сегрегирующих) сайтов (S), число гаплотипов (h), гаплотипическое (H_d) и нуклеотидное разнообразие (π) в программе DnaSP v.5.10 (Librado, Rozas, 2009). Молекулярную дисперсию (AMOVA) в популяциях массовых видов группы *D. longispina* s.l. – *D. longispina* s.str., *D. dentifera* и *D. galeata* – рассчитывали на основе иерархического анализа в программе Arlequin v.3.5 (Excoffier, Lischer, 2010). Значимость параметров Φ -статистик оценивали с помощью критерия перестановок при числе репликаций равном 10 000 в программе Arlequin v.3.5. Эволюционную дивергенцию оценивали на основе оригинальных 12S последовательностей и нескорректированных p -дистанций в программе MEGA v.7.0. Для оценки генетической дифференциации популяций высчитывали парные значения индекса фиксации F_{ST} по нуклеотидным последовательностям полного 12S блока в Arlequin v.3.5. Для установления генеалогических связей между гаплотипами использовали метод медианного связывания (median-joining, MJ; Bandelt et al., 1999), реализованный в программе Network v.4.5-5.0 (http://www.fluxus-engineering.com/network_terms.htm).

Демографическую историю сибирских популяций видов группы *D. longispina* s.l. реконструировали по: 1) показателям полиморфизма нуклеотидных последовательностей митохондриальных маркеров; 2) тестам на нейтральность эволюции Таджимы (Tajima's D ; Tajima, 1989) и F_u (F_s ; Fu, 1997); 3) структуре медианных сетей гаплотипов и 4) распределению частот гаплотипов (mismatch distribution, MMD; Rogers, Harpending, 1992; Excoffier, 2004). Темпы дивергенции мтДНК для артропод были заданы как 2% на миллион лет (Brower, 1994; Knowlton, Weigt, 1998; Belyaeva, Taylor, 2009) и три генерации в год (Local and regional..., 2014).

Для анализа изменчивости ядерной ДНК дафний использовали последовательности второго промежуточного транскрибируемого спейсера ITS2. Модели вторичной структуры ITS2 получали с помощью RNAfold Web Server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Визуализация вторичных структур ITS2 выполнена с помощью PseudoViewer v.3 Web Application (<http://pseudoviewer.inha.ac.kr/>). Филогенетический анализ выполняли в программе

ProfDistS v.0.9.8 с использованием алгоритма «RNA/DNAstructureProfileNeighbor-Joining» при числе репликаций 1000 для модели General Time Reversible (ProfDist: a tool..., 2005; ProfDistS: profile..., 2008). Матрицу компенсаторных замен (CBC, нескорректированные *p*-дистанции) анализировали в программе CBCAnalyzer v. 1.0.3 (CBCAnalyzer..., 2005; 4SALE – a tool..., 2006; Synchronous visual..., 2008).

ГЛАВА 3 МОРФОЛОГИЯ, ПОПУЛЯЦИОННАЯ И МЕЖВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

3.1 Диагностическая значимость морфологических признаков у близкородственных и криптических видов группы *D. longispina* s.l.

Традиционный морфологический анализ партеногенетических самок видов группы *D. longispina* s.l. не выявил для большинства признаков высокой таксономической значимости. На основании этого анализа практически невозможно дифференцировать виды *D. longispina* s.str., *D. hyalina* и *D. dentifera* и бесшлемную морфу *D. galeata*. В бóльшей степени морфологические различия выявляются при сравнении массовых видов *D. longispina* s.str. – *D. hyalina* – *D. dentifera* с видами *D. umbra* и *D. turbinata*, партеногенетические самки которых имеют более развитую антенну I и расположенную на ней чувствительную щетинку. Информативными оказались и морфологические признаки половозрелых самцов *D. umbra* и *D. turbinata*: длина флагеллума, относительные размеры сенсорной щетинки и эстетасков антенны I. Однако для разграничения видов *D. longispina* s.str. – *D. hyalina* – *D. dentifera* эти признаки малопригодны.

3.2 Изменчивость формы тела между морфами *D. galeata* из географически удаленных популяций

В географически удаленных популяциях *D. galeata* из озер Глубокое и Чаны были обнаружены по две морфы, одна из которых характеризовалась высоким заостренным шлемом, другая – низким шлемом округлой формы. Основной вклад в изменчивость морф дафний внесли форма роострума, переднего края головы и передне-верхнего края раковины.

Согласно результатам однофакторного непараметрического анализа PERMANOVA статистически достоверные различия ($p < 0.0001$) выявлены между

первой и второй морфами дафний – $F = 35.44$ и 41.08 , соответственно. Однофакторный анализ MANOVA на основе значений RW, не выявил достоверных различий между морфами *D. galeata* из оз. Глубокого. Однако сравнение морф из оз. Глубокого с таковыми из оз. Чаны выявило значимые различия (коэффициент лямбда Уилкса $\lambda = 0.00001$, $F = 18.04$, $p < 0.001$).

3.3 Популяционная и межвидовая изменчивость формы тела близкородственных видов группы *D. longispina* s.l.

Анализ популяционной и межвидовой изменчивости у видов группы *D. longispina* s.l. показал, что для большинства из них основной вклад в изменчивость формы тела внесла форма рострума и передне-верхнего края раковины. Для видов *D. hyalina* и *D. longispina* s.str. существенный вклад приходится на положение глаза.

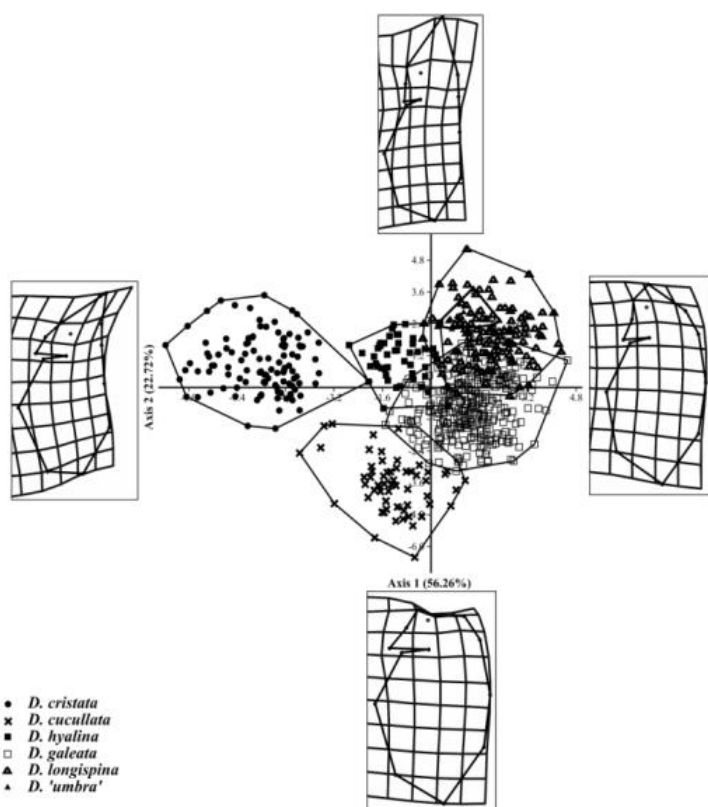


Рисунок 3 – Межвидовая изменчивость формы тела видов группы *D. longispina* s.l. в пространстве двух дискриминантных функций. Каждая деформационная решетка соответствует крайнему значению первой и второй РС.

Согласно результатам однофакторного анализа MANOVA достоверные различия в форме тела наблюдаются между всеми исследованными видами дафний ($p < 0.001$). Дискриминантный анализ на основе значений

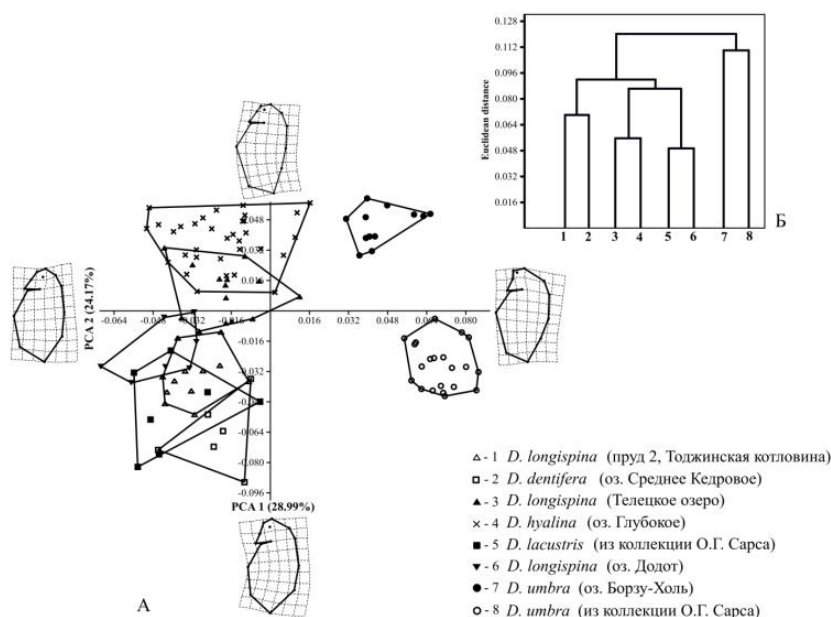
относительных деформаций (RW) выявил достоверные различия между близкородственными видами группы *D. longispina* s.str. (Рис. 3), которые характеризуют форму головы и раковины каждого вида. Первая дискриминантная ось объясняет изменчивость видов *D. cristata* и *D. galeata* (56.36%); вторая – *D. longispina* s.str. – *D. hyalina* – *D. cucullata* (22.41%).

3.4 Зависимость формы тела дафний группы *D. longispina* s.l. от размеров и факторов внешней среды

Положительная корреляция зарегистрирована между независимой переменной CS (centroid size) и значениями первой дискриминантной функции (DA1 score) ($R^2 = 0.082$, коэффициент лямбда Уилкса $\lambda = 0.0543$; $F = 22.89$; $P < 0.001$). Значимых зависимостей между формой тела разных видов дафний и факторами внешней среды не обнаружено. Диаграмма Шепарда указывает на тенденцию к предпочтению видами *D. galeata*, *D. cristata* и *D. hyalina* глубоких постоянных водоемов с высокой прозрачностью воды, тогда как *D. longispina* s.str. и *D. cucullata* тяготеют к мелководным и теплым водоемам.

3.5 Изменчивость формы тела у криптических видов группы *D. longispina* s.l.

Анализ главных компонент на основе значений RW для криптических видов группы *D. longispina* s.l. показал, что первая ГК объясняет 28.99% общей дисперсии,



большей частью связанной со степенью изгиба вентрального края головы дафний (Рис. 4). Вторая ГК (24.17%) объясняет изменчивость форм вентрального края головы и раковины. Все популяции/виды сформировали четко выраженные или частично перекрывающиеся облака в пространстве осей первых двух компонент.

Анализы на основе частных деформаций и главных компонент подтверждают, что близкородственные и криптические виды группы *D. longispina* s.l. различаются по форме головы. Однофакторный анализ MANOVA выявил статистически значимые

различия между исследуемыми популяциями и видами: коэффициент лямбда Уилкса $\lambda = 0.0001$, $F = 69.7$, $p < 0.001$.

Анализ UPGMA (евклидово расстояние) позволил выявить три основных кластера (Рис. 4 Б). Первый кластер объединил все выборки *D. umbra*. Вторым кластер сформирован выборками из двух популяций *D. longispina* s.str. (озера Додот и Телецкое), а также выборками *D. lacustris* и *D. hyalina*. В этом кластере особи *D. longispina* s.str. из Телецкого озера объединились с особями *D. hyalina* из оз. Глубокого, а особи *D. longispina* s.str. из оз. Додот – с особями *D. lacustris* из музейной коллекции О.Г. Сарса. И, наконец, третий кластер сформирован выборками *D. dentifera* (оз. Среднее Кедровое) и *D. longispina* s.str. (пруд 2, Тоджинская котловина).

ГЛАВА 4 МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ФИЛОГЕНИЯ И ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЕ СВЯЗИ ГАПЛОТИПОВ

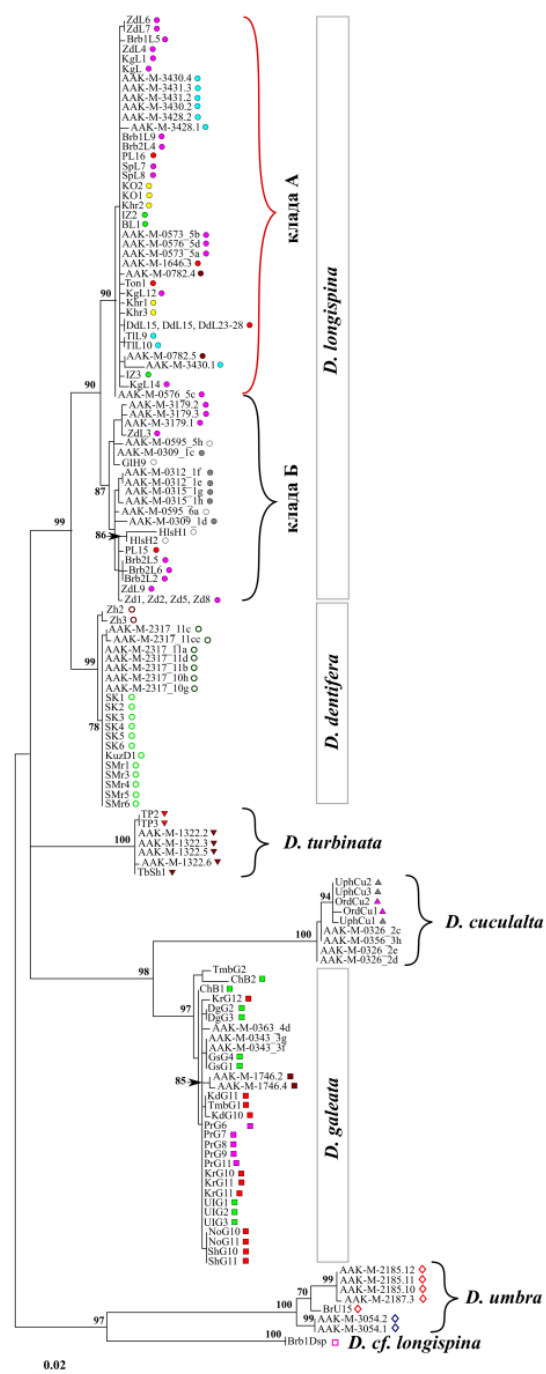
4.1 Филогения группы *Daphnia longispina* s.l. на основе полного 12S блока

Все имеющиеся на момент проводимого исследования нуклеотидные последовательности фрагмента гена 12S мтДНК разделились на девять кластеров, соответствующих видам группы *D. longispina* s.l. Десятый кластер сформирован гаплотипами вида *D. cristata* и рассматривался как внешняя группа. В каждом видовом кластере отмечались множественные дивергентные митохондриальные линии (субклады) с поддержками ветвей до 100%. Нуклеотидные последовательности вида *D. longispina* s.str. четко разделились на две крупные клады, условно названными как «сибирская» (А) и «европейская» (Б) соответственно географическому распространению гаплотипов. Образцы *D. turbinata* заняли базальное положение по отношению к кластеру, объединяющему близкородственные виды *D. longispina* – *D. dentifera* – *D. galeata* – *D. cucullata*. Гаплотипы видов *D. umbra* и *D. lacustris* сформировали общую кладу.

4.2 Филогения на основе оригинального 12S блока

Реконструкция филогенетических отношений в пределах группы *D. longispina* s.l. на основе блока из оригинальных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 12S мтДНК выявила семь хорошо поддерживаемых кластеров, соответствующих

номинальным видам (Рис. 5). Этот анализ, в противоположность анализу на основе полного 12S блока, не подтвердил монофилию между *D. turbinata* и другими видами группы *D. longispina* s.l. Близкородственные виды *D. longispina* s.str. – *D. dentifera*, *D.*



galeata – *D. cucullata*, так же, как и *D. umbra* – *D. cf. longispina* сформировали отдельные кластеры со значимой поддержкой ветвей в узлах ветвления. Кластер, объединяющий два последних вида, следует рассматривать как внешнюю группу по отношению к другим видам комплекса.

Рисунок 5 – ML-филогенетическое дерево для видов группы *D. longispina* s.l. на основе оригинального 12S блока данных. Показаны бутстрэп значения поддержки ветвей выше 70%. Масштаб – число ожидаемых замен на сайт

Согласно В1 анализу, гаплотипы *D. umbra* и *D. cf. longispina* сформировали базальную кладу вместе с гаплотипами *D. turbinata*. Все 12S-последовательности вида *D. longispina* s.str., как и в случае полной 12S-филогении, четко разделились на две дистантные клады. В пределах клады Б гаплотипы сформировали несколько субклад с высокими поддержками ветвей (Рис. 5). В пределах кластера *D. galeata* гаплотипы из водоемов Монголии выделились в дивергентную субкладу. Гаплотипы *D. umbra*

из географически удаленных регионов также сформировали дистантные субклады в пределах общего видового кластера. Структура расщепленной сети для группы видов *D. longispina* s.l. полностью согласовывается с топологией ML-дерева, и поддержки ветвей имеют высокие бутстрэп значения – от 92 до 100% (Рис. 6).

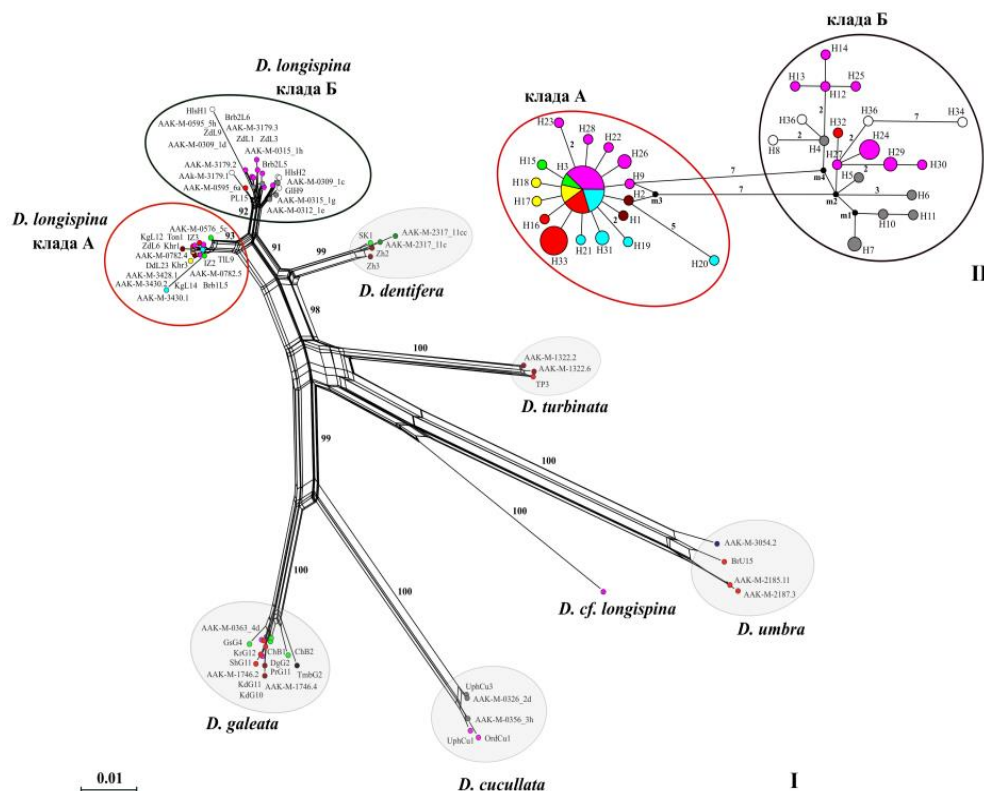


Рисунок 6 – Сетчатые филогении между видами группы *D. longispina* s.l. на основе оригинального 12S блока данных: **I** – простирающееся дерево, *p*-дистанции. Бутстрэп поддержки указаны для каждого разветвления; масштаб – число ожидаемых замен на сайт. **II** – медианная сеть 12S гаплотипов для двух клад *D. longispina* s.str. m1-m4 – медианные векторы. Размер кружков пропорционален относительной частоте гаплотипов. Для каждой ветви указано число мутаций, если оно не равно 1

4.3 Филогения на основе объединенного 12S+16S+ND2 блока

Объединенные 12S+16S+ND2 нуклеотидные последовательности для группы видов *D. longispina* s.l. разделились на пять кластеров, соответствующих номинативным видам, и филогенетические ML и BI деревья имели сходную топологию (Рис. 7). В целом все кластеры аналогичны тем, которые были получены при реконструкции обеих 12S филогений, за исключением кластеров для *D. cucullata* и *D. umbra*, поскольку эти виды не были представлены в данном анализе. Важное преимущество филогенетического дерева на основе объединенного блока трех фрагментов мтДНК заключается в подтверждении монофилии клады *D. longispina* s.str. – *D. dentifera* – *D. turbinata*. Этот результат полностью соответствует тому, который был получен при филогенетическом анализе полного блока 12S нуклеотидных последовательностей.

Филогенетический анализ на основе объединенного блока нуклеотидных последовательностей подтверждает существование двух крупных клад в пределах

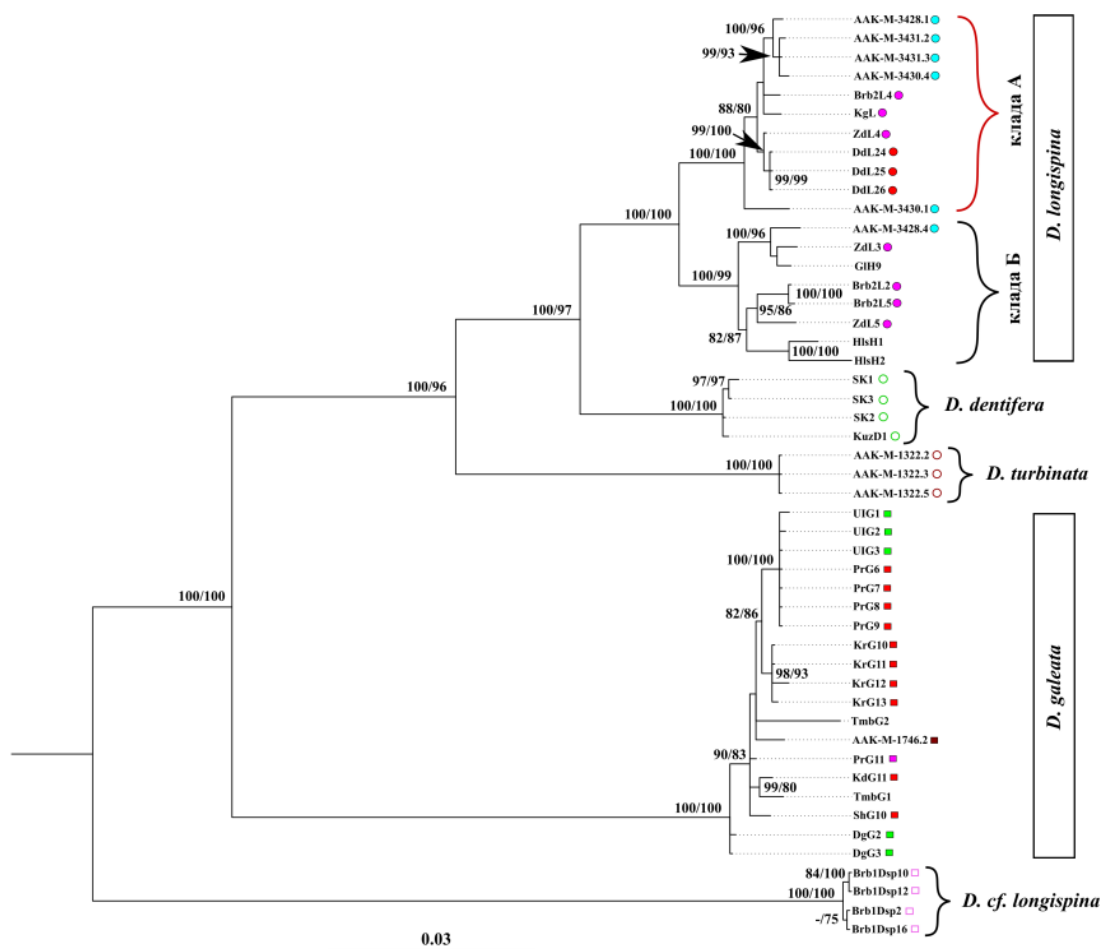


Рисунок 7 – Байесовское филогенетическое дерево для видов группы *D. longispina* s.l. на основе объединенного блока 12S+16S+ND2 п.н. Значения апостериорной вероятности (BI) и бутстрэп теста (ML) выше 75% указаны для всех значимых узлов ветвления

вида *D. longispina* s.str., и уровень генетической дивергенции между ними значительно выше, чем в случае обеих 12S филогений.

4.4 Генеалогические связи между митохондриальными гаплотипами массовых видов группы

***Daphnia galeata*.** Медианная сеть 12S гаплотипов для *D. galeata* характеризовалась звездообразной структурой с центральным гаплотипом H5 (Рис. 8 I), который встречается практически во всех регионах Палеарктики.

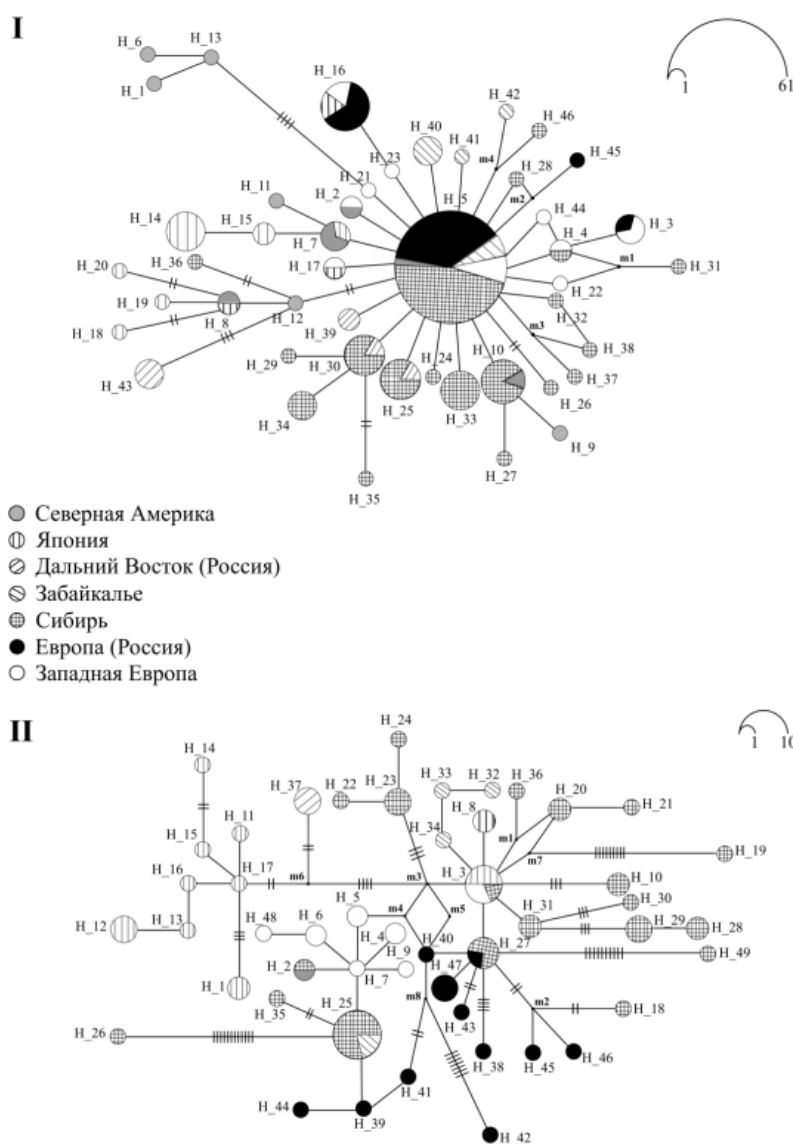


Рисунок 8 – Медианные сети 12S (I) и ND2 (II) гаплотипов для *Daphnia galeata*. Размер кружков соответствует относительной частоте гаплотипов (масштаб указан в правом верхнем углу); m1-m4 – медианные векторы. Для каждой ветви указано число мутаций, если оно не равно 1

В общей структуре сети ND2 гаплотипы *D. galeata* сформировали несколько звездообразных паттернов (Рис. 8 II). Два центральных гаплотипа имеют региональное распространение: Западная Европа и Северная Америка. Несколько гаплотипов из Северной Америки формируют

отдельный кластер, с которым тесно связан гаплотип H37 из популяции *D. galeata* в российской части Дальнего Востока. Дистантные ND2 гаплотипы *D. galeata* отмечались в популяциях из Сибири и европейской части России. Максимальной частотой характеризовался гаплотип H25, обнаруженный в популяциях *D. galeata* из Сибири и Забайкалья и тесно связанный с гаплотипами из Японии, европейской части России и Западной Европы (Рис. 8 II).

***Daphnia longispina* s.str.** В медианной сети 12S гаплотипов для *D. longispina* s.str. отмечается несколько звездообразных структур с центральными гаплотипами из Западной Европы (H7 и H16), из Сибири (H30 и H36), и одним гипотетическим гаплотипом m2 (Рис. 9 I). За исключением одного общего 12S гаплотипа из удаленных регионов (Израиль и Эфиопия), все остальные гаплотипы *D. longispina* s.str. имели узко региональное распространение.

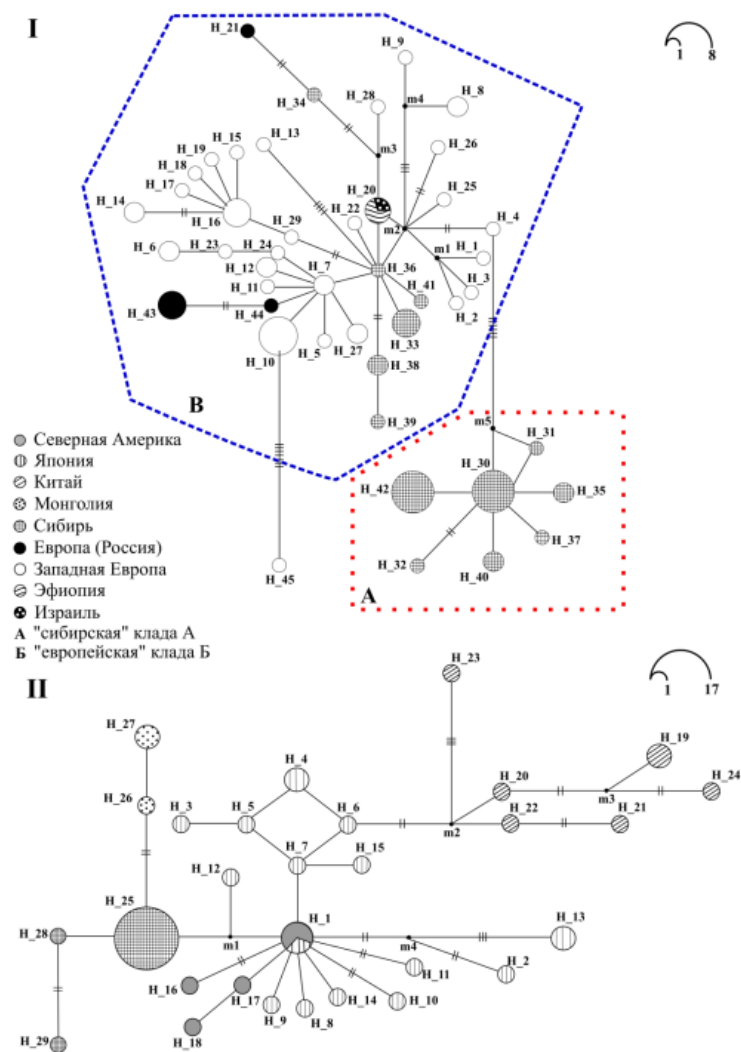


Рисунок 9 – Медианные сети 12S гаплотипов для *Daphnia longispina* s.str. (I) и *Daphnia dentifera* (II). Обозначения соответствуют Рисунку 8

Все гаплотипы *D. longispina* s.str. разделились на две хорошо выраженные клады, соответствующие тем, которые были выявлены по результатам филогенетических анализов.

Клада А сформирована гаплотипами из популяций оз. Чаны и р. Енисей. Гаплотипы из сибирских популяций, относящиеся к кладе Б, связаны с гаплотипами из Западной Европы через гаплотип H36 из временного водоема бассейна оз.

Чаны. Гаплотипы обеих клад *D. longispina* s.str. связаны друг с другом через гаплотип H4 из Западной Европы (оз. Бесерро, Испания) и семь мутаций.

***Daphnia dentifera*.** В структуре медианной сети *D. dentifera* выделяется три основных группы (Рис. 9 II). Первая группа с явно выраженной звездообразной структурой образована гаплотипами из Северной Америки и Японии с общим гаплотипом H1. С этой группой через гипотетический гаплотип m1 связана другая группа гаплотипов из сибирских и монгольских популяций *D. dentifera*. Структурообразующий гаплотип этой группы H25 зарегистрирован в бассейне оз. Байкал и Якутии. Третья группа сформирована гаплотипами из водоемов Китая.

4.5 Генеалогические связи между митохондриальными гаплотипами криптических и редких видов группы

***Daphnia umbra*.** В медианной сети 12S гаплотипов для *D. umbra* обнаружена одна явно выраженная звездообразная структура, сформированная гаплотипами из

водоемов Норвегии, Финляндии и одним гаплотипом из Канады (Рис. 10). С ней связаны гаплотипы Н5 и Н6 из Канады через два гипотетических гаплотипа и три мутации. Гаплотипы *D. umbra* из двух сибирских популяций формируют две дистантные ветви, связанные между собой и с остальными гаплотипами через гипотетический гаплотип m3. Эти популяции сильно дифференцированы как друг от друга, так и от американских и европейских популяций.

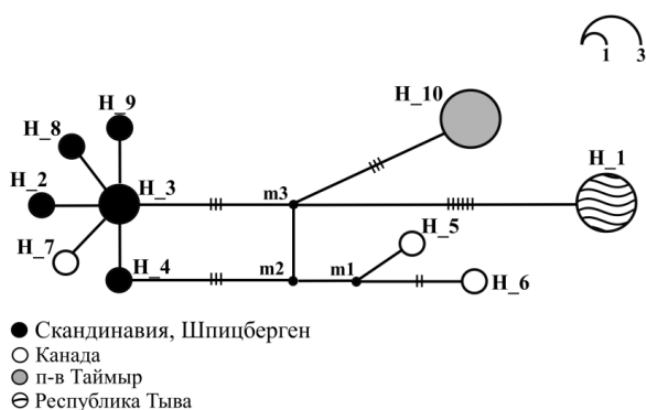


Рисунок 10 – Медианная сеть 12S гаплотипов для *Daphnia umbra*. Обозначения соответствуют Рисунку 8

***Daphnia turbinata* и *Daphnia* cf. *longispina*.** Незначительное число образцов этих видов не позволяет в полном объеме оценить степень дифференциации популяций и

установить генеалогические связи между гаплотипами. Популяции *D. turbinata* зарегистрированы в двух озерах Монголии (Жаахан и Харгал-Нуур) и в безымянном пруду Тоджинской котловины (бассейн р. Енисей, Республика Тыва). Для *D. turbinata* выявлено три 12S гаплотипа – два в Монголии и один в Республике Тыва. В популяциях из Монголии определено по два 16S и ND2 гаплотипа. Единственная популяция *D. cf. longispina* обнаружена во временном водоеме Новосибирской области недалеко от г. Барабинск (бассейн оз. Чаны). В ней зарегистрировано по одному 12S и 16S гаплотипу и два ND2 гаплотипа.

ГЛАВА 5 ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ, СТРУКТУРА И ДЕМОГРАФИЧЕСКАЯ ИСТОРИЯ

5.1 Полиморфизм митохондриальной ДНК и эволюционная дивергенция

Уровень генетического полиморфизма для объединенного фрагмента 12S+16S+ND2 в целом был выше, чем для фрагмента гена 12S мтДНК для всех исследованных видов группы *D. longispina* s.l. Наиболее заметные различия между двумя блоками данных выявлены при анализе уровня гаплотипического разнообразия (H_d) у *D. dentifera*. Высокие значения нуклеотидного разнообразия (π) отмечены для «сибирской» клады *D. longispina* s.str., для *D. dentifera* и *D. galeata*. Виды *D. longispina*

s.str., *D. galeata* и *D. umbra* характеризовались высоким числом гаплотипов (h) и полиморфных сайтов (S). Высокие значения H_d и π обнаружены для *D. umbra*.

Эволюционная дивергенция (нескорректированные p -дистанции) для всех пар оригинальных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 12S мтДНК в пределах и между изучаемыми видами и кладами группы *D. longispina* s.l. были высокими – 7.3-12.5%. Наиболее высокие значения p -дистанций зарегистрированы для *D. umbra* – 1.4%. Явная генетическая дивергенция обнаружена между кладами *D. longispina* s.str. Генетические дистанции указывают на высокий уровень дивергенции между популяциями *D. dentifera* из бассейна оз. Байкал и Монголии, Китая (Непала), Канады и США при их попарном сравнении. Высокая дивергенция отмечена практически между всеми географическими популяциями *D. galeata*.

Как и ожидалось, самые высокие значения индекса фиксации F_{ST} (до 1.0), указывающие на практически полное отсутствие потока генов, выявлены между географически удаленной популяцией *D. longispina* s.str. из оз. Додот (Республика Тыва) и всеми остальными (Рис. 11 I). Поток генов ограничен между популяциями *D. dentifera* из бассейна оз. Байкал и популяциями из Монголии, Канады и США (Рис. 11 II).

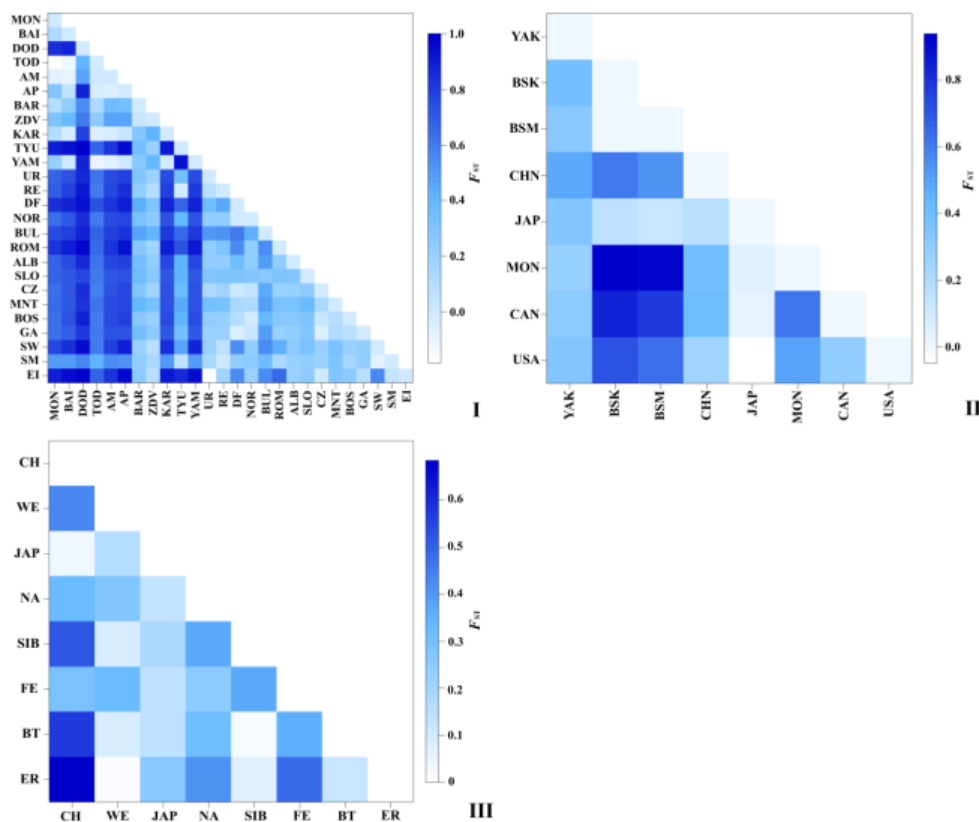


Рисунок 11 – Графики матриц парных F_{ST} дистанций между популяциями *D. longispina* s.str. (I), *D. dentifera* (II) и *D. galeata* (III).

Существенная дифференциация обнаружена между популяциями *D. galeata* из Сибири, Забайкалья и Восточной Европы и популяциями из Китая (Рис.11 III).

5.2 Молекулярная дисперсия

Иерархический анализ AMOVA подтвердил генетическую дифференциацию между популяциями массовых видов *D. longispina* s.str., *D. dentifera* и *D. galeata*. При анализе иерархических уровней «географические области» и неструктурированного блока данных результаты AMOVA показали значимо более высокую молекулярную изменчивость «внутрипопуляционной» компоненты – 53.97-55.22% для *D. longispina* s.str., 75.75-77.93% для *D. dentifera* и 65.51-66.20% для *D. galeata*. На иерархическом уровне «клады *D. longispina* s.str.» основная часть молекулярной изменчивости сконцентрирована в компоненте «между кладами» (71.77-73.39%), тогда как значение молекулярной дисперсии в пределах этих двух клад существенно снизилось (5.68%). Все параметры Ф-статистик для каждого уровня были достоверными ($P < 0.001$, $P < 0.05$), за исключением внутрипопуляционной компоненты на уровне двух клад *D. longispina* s.str. и неструктурированном наборе данных для *D. dentifera*.

5.3 Демографическая история видов *D. galeata* и *D. longispina* s.str.

Большая часть популяций исследованных видов группы *D. longispina* s.l. характеризовалась отрицательными значениями тестов на нейтральность эволюции – Фу F_S и Таджимы D . Тесты на нейтральность эволюции, определенные на основе полного 12S блока данных характеризовались отрицательными значениями и были статистически значимыми для двух клад *D. longispina* s.str. и видов *D. dentifera*, *D. galeata* и *D. cristata*. Положительные, хотя и не значимые, значения теста Таджимы для *D. umbra* зарегистрированы при анализе данных из оригинального 12S блока данных, и для *D. cf. longispina* – из объединенного 12S+16S+ND2 блока.

Анализ распределения частот гаплотипов (MMD) выполняли только для массовых видов группы *D. longispina* s.l. из сибирских популяций – *D. galeata* и *D. longispina* s.str. – на основе оригинальных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 12S и ND2 мтДНК. Для *D. galeata* выявлены различия в значениях основных показателей и характере кривой MMD по этим генам. Одномодальная кривая MMD на основе фрагмента гена 12S хорошо коррелировала с моделью

демографической экспансии ($SSD_{obs} = 0.000036$, Рис.12 а, b). Напротив, распределение частот гаплотипов на основе фрагмента гена ND2 в большей степени соответствовало модели пространственной экспансии ($SSD_{obs} = 0.00667$, Рис.12 с, d) и носило бимодальный характер.

Распределение частот гаплотипов на основе фрагмента 12S гена для сибирских популяций *D. longispina* s.str. (Рис. 13 а, b) носило бимодальный характер и хорошо соответствовало модели пространственной экспансии ($SSD_{obs} = 0.05036$). Для клад *D. longispina* s.str. характер этого распределения был различным – одномодальный для «сибирской» (Рис. 13 е) и мультимодальный для «европейской» (Рис. 13 с, d).

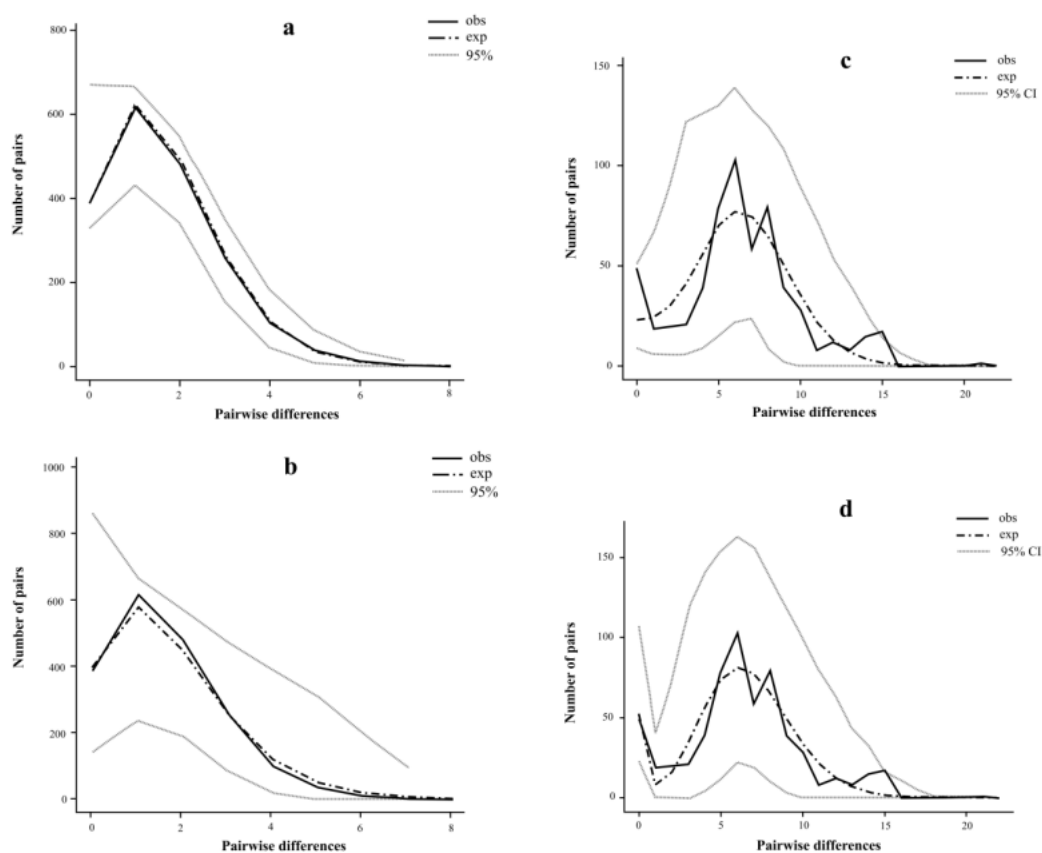


Рисунок 12 – Графики распределения частот гаплотипов для сибирских популяций *Daphnia galeata* на основе фрагментов 12S (а, b) и ND2 (с, d) генов мтДНК. Черные линии – наблюдаемое распределение; а и с – модели демографической экспансии, b и d – модели пространственной экспансии. Пунктирная линия – ожидаемое распределение; серая линия – 95% доверительный интервал

Для «сибирской» клады параметры демографической и пространственной экспансии были практически идентичными. Демографическая история «европейской» клады в большей степени соответствует модели пространственной экспансии (SSD_{obs}

= 0.01687).

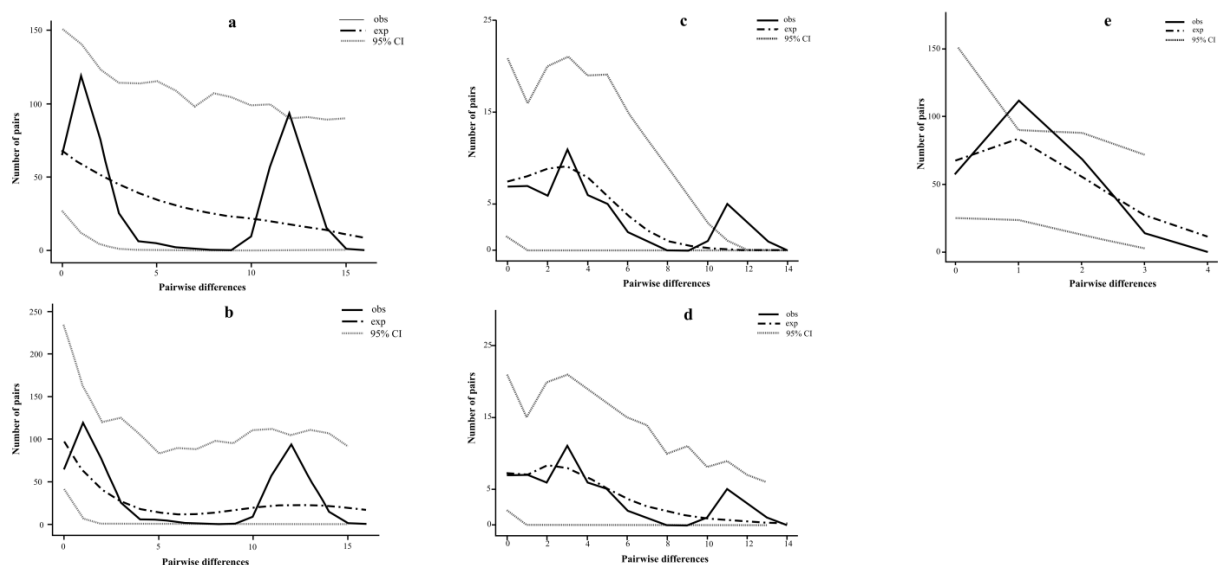


Рисунок 13 – Графики распределения частот гаплотипов для сибирских популяций *Daphnia longispina* s.str. на основе фрагментов 12S гена мтДНК; а и б – все сибирские популяции; с и d – «европейская» клада; е – «сибирская» клада; а, с – модели демографической экспансии; б, d и е – модели пространственной экспансии. Обозначения аналогичны Рисунку 12

Расчетное время (с 95% доверительным интервалом), прошедшее с момента экспансии для вида *D. galeata* оказалось около 101 325 (50 189-315 341) лет назад на основе фрагмента 12S гена и 493 524 (263 231-697 075) лет назад на основе фрагмента ND2 гена мтДНК. Время с момента экспансии для «сибирской» клады *D. longispina* s.str. составило 125 947 (31 250-238 636), а для «европейской» – 169 508 (47 348-952 652) лет назад.

ГЛАВА 6 ФИЛОГЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ КРИПТИЧЕСКИХ ВИДОВ НА ОСНОВЕ РЕГИОНА ITS2 ЯДЕРНОЙ ДНК

6.1 Полиморфизм ITS2 последовательностей

Общая длина аннотированного фрагмента ITS2 составила 624-693 п.н. Длина последовательностей ITS2 зависела от числа tandemных повторов в мотивах.

6.2 Предполагаемые модели вторичной структуры ITS2

Анализ вторичных структур ITS2 выявил несколько типов предполагаемых моделей, соответствующих разным видам группы *D. longispina* s.l. Для образцов вида *D. longispina* s.str. выявлено три типа моделей вторичной структуры ITS2. Модели вторичной структуры ITS2 для *D. umbra* соответствовали двум слабо различающимся

типам. Для образцов дивергентной митохондриальной линии *D. cf. longispina* выявлено три типа таких моделей, при этом первая модель наиболее сильно отличалась от остальных.

6.3 Анализ компенсаторных замен

Компенсаторные замены были обнаружены при попарном сравнении моделей вторичных структур ITS2 *D. longispina* s.str. с моделями *D. umbra* и *D. cf. longispina* (Табл. 1). Число CBC замен при сравнении *D. umbra* с другими видами варьировало от одной (*D. umbra* – *D. hyalina*) до пяти (*D. umbra* – *D. cf. longispina*).

Таблица 1 – Общее число компенсаторных замен (CBC) между предполагаемыми вторичными структурами ITS2 для анализируемых форм/видов группы *D. longispina* s.l.

	DL	Brb2-L2	PL17	DH	DU	Brb1-Dsp2	Brb1-Dsp10
DL							
Brb2-L2	0						
PL17	0	0					
DH	0	1	0				
DU	2	2	1	1			
Brb1-Dsp2	4	4	3	3	4		
Brb1-Dsp10	5	5	4	3	5	0	
Brb1-Dsp12	3	3	3	3	4	0	0

Примечание: DL – *D. longispina* s.str.; BrbL2-2 – *D. longispina* s.str.; PL17 – *D. longispina* s.str.; DH – *D. hyalina*; DU – *D. umbra*; Brb1-Dsp2 – *D. cf. longispina*; Brb1-Dsp10 – *D. cf. longispina*; Brb1-Dsp12 – *D. cf. longispina*. Наибольшее число CBC замен зарегистрировано при попарном сравнении моделей вторичных структур ITS2 *D. longispina* s.str. и *D. hyalina* с *D. cf. longispina*.

6.4 Филогения группы *D. longispina* s.l. на основе фрагмента ITS2 яДНК

Филогения, реконструированная для видов группы *D. longispina* s.l. на основе последовательностей ITS2 яДНК без учета вторичной структуры, не выявила четкого разграничения между близкородственными видами *D. galeata* – *D. cucullata* – *D. longispina* s.str., демонстрируя неразрешенную полиномию. Реконструкция филогенетических взаимоотношений на основе вторичной структуры ITS2 яДНК для криптических видов *D. hyalina*, *D. umbra* и *D. cf. longispina* показала, что их образцы

сформировали отдельные кластеры со значимой поддержкой ветвей (Рис. 14 А).

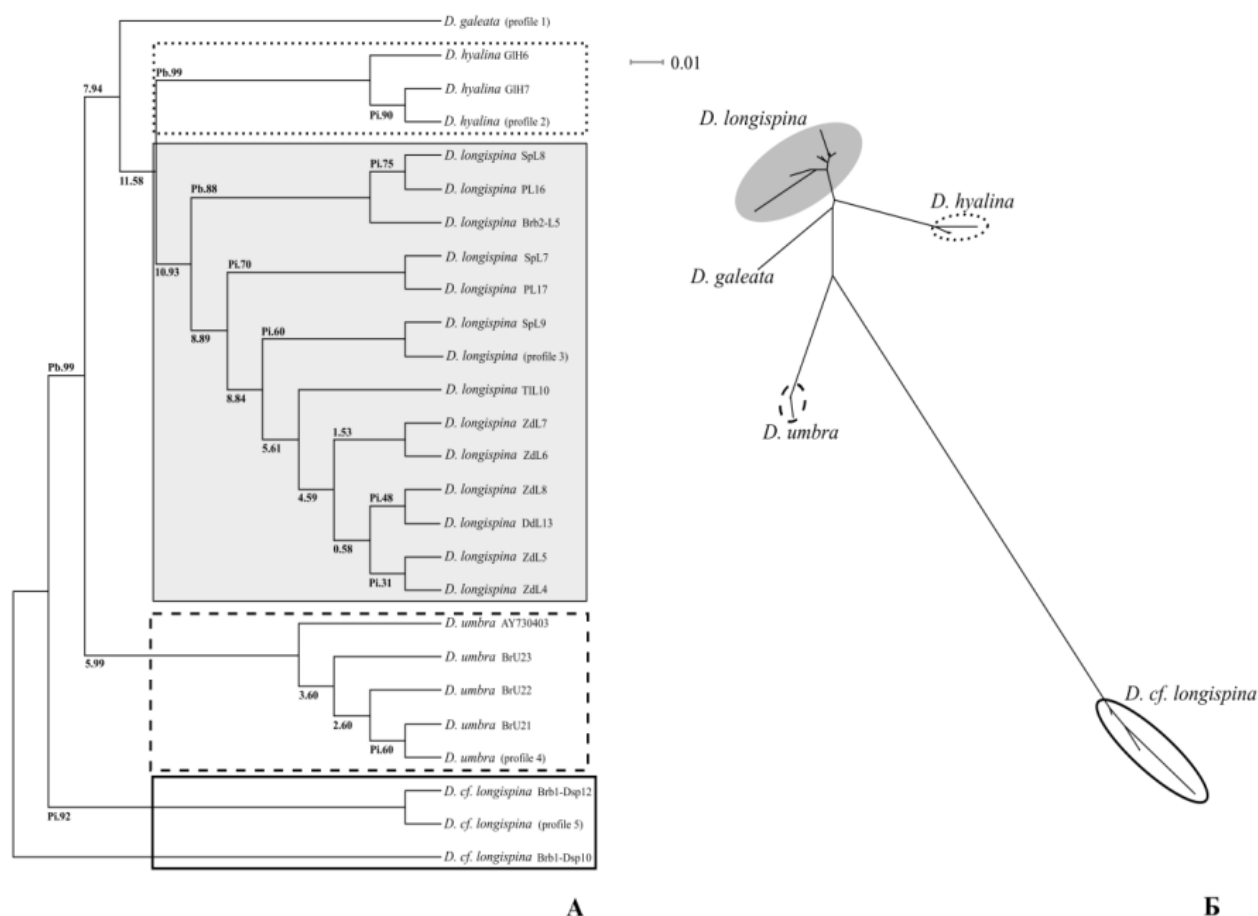


Рисунок 14 – **А** – филогения видов группы *D. longispina* s.l., реконструированная с учетом вторичной структуры ITS2с помощью профиля PNJ на основе модели GTR в программе ProfDistS v.0.9.8. Дерево визуализировано в программе NJplot v.2.4, показаны бутстрэп значения при 1000 репликаций. «Pb» – пороговое бутстрэп значение (bootstrap threshold). Профили: profile 1 – *D. galeata* (KgG28, ShG11); profile 2 – *D. hyalina* (G1H1-G1H3); profile 3 – *D. longispina* s.str. (DdL14, DdL15, T1L9, T1L11, KgL, ZdL1, ZdL2, Brb1-L9, Brb2-L2, Brb2-L4, PL15); profile 4 – *D. umbra* (BrU15, BrU18-BrU20); profile 5 – *D. cf. longispina* (Brb1-Dsp2, Brb1-Dsp16). **Б** – простирающееся филогенетическое дерево, визуализированное в программе SplitsTree4 с помощью алгоритма «equal angle» на основе значений длин ветвей и с учетом вторичной структуры ITS2. Масштаб – число ожидаемых замен на сайт.

Простирающаяся сеть на основе длин ветвей между ITS2 гаплотипами (с учетом вторичной структуры ITS2) подчеркнула удаленность особей *D. cf. longispina* от остальных видов группы *D. longispina* s.l. (Рис. 14 Б).

ГЛАВА 7 ФИЛОГЕОГРАФИЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИСТОРИЯ СИБИРСКИХ ТАКСОНОВ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ КЛАД

7.1 Географическое распространение видов

Daphnia galeata. Широко распространенный 12S гаплотип *D. galeata* занимал

центральное место в медианной сети и встречался в популяциях от Западной Европы и Европейской части России через Западную и Восточную Сибирь, Забайкалье до российского Дальнего Востока (Рис.15 А).

***Daphnia longispina* s.str. и *D. dentifera*.** Относительно *D. longispina* s.str. в первую очередь необходимо подчеркнуть разницу в географическом распространении гаплотипов, образующих две крупные клады – «сибирскую» и «европейскую». Основу «сибирской» клады составляют гаплотипы из водоемов Алтае-Саянской горной страны (Рис.15 Б). Гаплотипы «европейской» клады имеют более широкое географическое распространение – от Западной Европы до бассейна р. Енисей.

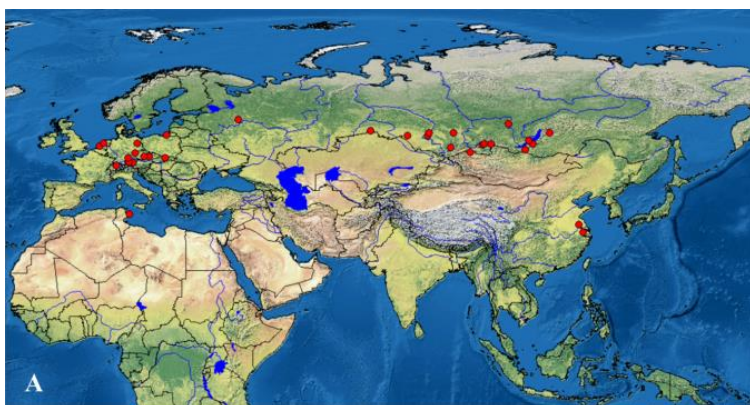
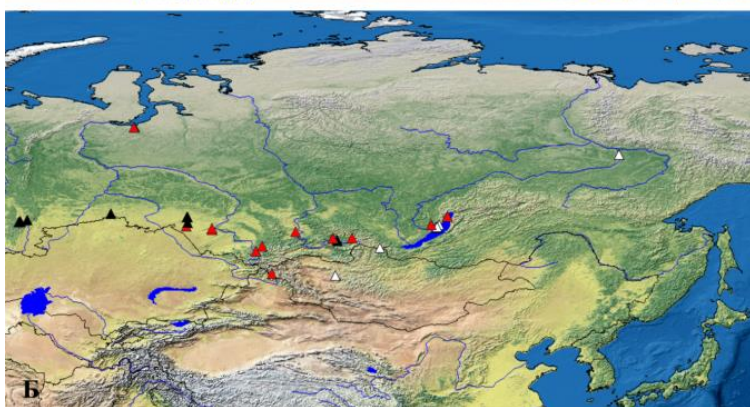


Рисунок 15 – Географическое распространение 12S гаплотипов на территории Евразии. А – массовый 12S гаплотип *D. galeata*; Б – *D. dentifera* и две клады *D. longispina* s.str.: красные треугольники – «сибирская» клада; черные треугольники – «европейская» клада; белые треугольники – *D. dentifera*.



Ни одной популяции *D. longispina* s.str. не обнаружено в водоемах Забайкалья и российской части Дальнего Востока (Рисунок 15 Б). Популяции из водоемов,

расположенных восточнее бассейна р. Енисей, были представлены сестринским таксоном *D. dentifera*. Следовательно, бассейн р. Енисей, включая оз. Байкал и р. Ангара, представляет собой переходную зону между видами *D. longispina* s. str. (проникает на восток до 104 °Е) и *D. dentifera* (проникает на запад до 96 °Е). Согласно этим результатам, мы полагаем, что виды *D. longispina* s.str. и *D. dentifera* являются викарирующими.

***Daphnia umbra*, *D. turbinata* и *D. cf. longispina*.** Ограниченный объем материала для криптических и редких видов группы *D. longispina* s.l. на данном этапе исследований позволяет только констатировать их приуроченность к горным районам

юга Сибири, за исключением предположительно нового вида *D. cf. longispina* из временного водоема Западной Сибири (бассейн оз. Чаны) (Рис.16).

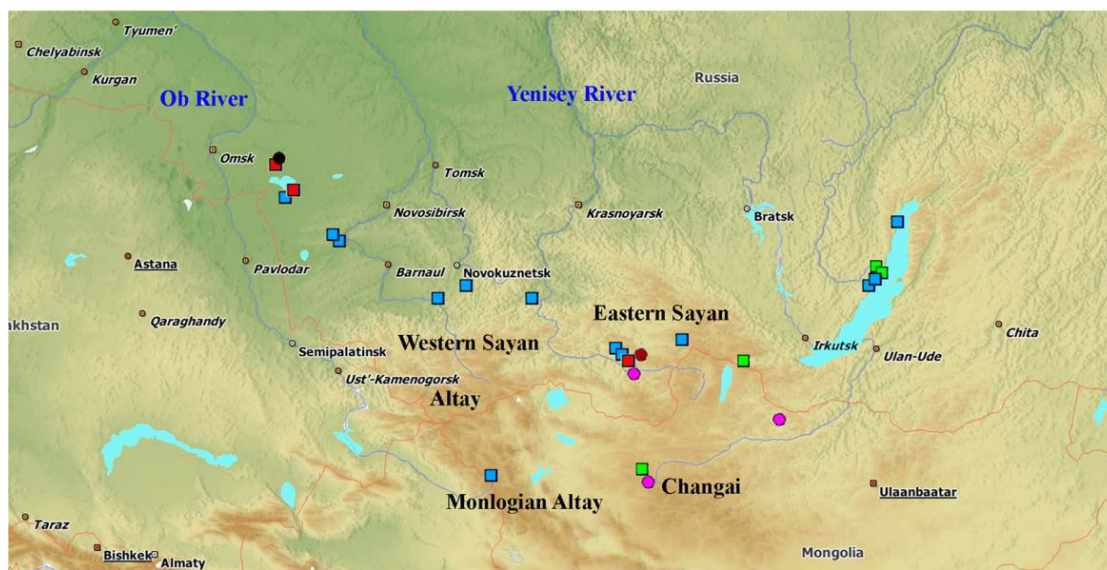


Рисунок 16 – Географическое распределение 12S гаплотипов криптических и эндемичных видов группы *Daphnia longispina* s.l. на территории Евразии: коричневый кружок – *D. umbra*, розовые кружки – *D. turbinata*, черный кружок – *D. cf. longispina*.

7.2 Эволюционная история массовых и редких видов группы *D. longispina* s.l. в Сибири

***Daphnia galeata*.** Результаты нескольких анализов, а именно: (1) звездообразная структура сети 12S гаплотипов, (2) одномодальный характер кривой распределения частот гаплотипов и (3) значения тестов на нейтральность эволюции Фу F_S и Таджимы D подтверждают постледниковую пространственную экспансию вида *D. galeata*. Пространственная экспансия *D. galeata* сопровождалась демографической экспансией, то есть происходил быстрый рост численности из предковой популяции с низким эффективным размером.

***Daphnia longispina* s.str. и *D. dentifera*.** Сибирские популяции викарирующих видов *D. longispina* s.str. и *D. dentifera* в целом характеризуются сходной эволюционной историей. При этом гаплотипы «европейской» и «сибирской» клад *D. longispina* s.str. явно находились под воздействием различных исторических событий.

Высокие значения показателей H_d и π для «европейской» клады *D. longispina* s.str. являются следствием смешения исторически гетерогенных и географически дифференцированных популяций (Avise, 2000). Низкое число гаплотипов, высокое значение H_d при низких значениях π и p -дистанций «сибирской» клады с большей

вероятностью отражают результат колонизации водоемов Сибири одной или несколькими генетически однообразными линиями.

По нашему мнению, пространственной экспансии «европейской» клады *D. longispina* s.str. препятствует, как минимум, три фактора. Во-первых, заселение водоемов Алтае-Саянской горной страны популяциями «сибирской» клады. Во-вторых, в восточном направлении от бассейна р. Енисей подходящие для ее обитания водоемы заняты видом *D. dentifera*. И, в-третьих, барьером могут служить популяции широко распространенного в Голарктике вида *D. galeata*, обладающего высоким адаптивным потенциалом (The long-term consequences..., 2011; Diversity of the *Daphnia*..., 2014; Invasion of a Holarctic..., 2018).

***Daphnia umbra*, *D. turbinata* и *D. cf. longispina*.** Основываясь на значениях тестов на нейтральность эволюции, в случае с *D. umbra* и *D. cf. longispina* следует предположить недавнее прохождение их популяций через бутылочное горлышко, или о влиянии сверхдоминирующего отбора. В случае с *D. turbinata* – недавнюю экспансию, отрицательный (очищающий) отбор или хитчхайкинг.

7.3 Влияние плейстоценового оледенения на формирование современного разнообразия группы *D. longispina* s.l. в Сибири

Для оценки эволюционной истории митохондриальных линий и видов исключительную роль играет знание о климатических особенностях и основных геологических событиях в разные периоды плейстоцена (Time dependency..., 2005; Origin of a divergent..., 2016; Phylogeography of the *Chydorus*..., 2016). В связи с этим эволюционная история и механизмы формирования филогеографических паттернов для видов группы *D. longispina* s.l. из водоемов азиатской части России были скорректированы с учетом известных геологических событий, произошедших в регионе в плейстоцене.

Во время самых холодных фаз плейстоцена северный сток крупных сибирских рек прерывался континентальным ледником, что приводило к значительному повышению уровня воды в их среднем течении и к возникновению огромных приледниковых озер (Гросвальд, 1999; Ice-dammed lakes..., 2004; Волков, Казьмин, 2007). В позднем плейстоцене крупные сибирские реки были подпружены ледниковыми щитами, в результате чего в северной части Евразии сформировались

огромные приледниковые озера, объединяющие гидрологические системы от Альп до современной Якутии (Гросвальд, Котляков, 1989; Гросвальд, 1999). В Западной Сибири в это время существовало крупное Мансийское озеро, которое охватывало территорию современного бассейна оз. Чаны. Оледенение на территории Горного Алтая, Саян и Восточносибирской низменности было частичным (Гросвальд, 1999; Природная обстановка..., 2010). В это же время в Алтайских горах рефугиумами для пресноводной фауны служили крупные озера – Телецкое и подпрудные Чуйское и Уймонское (Гросвальд, Котляков, 1989; Высоцкий, 2001). В бассейне р. Енисей основные рефугиумы располагались в Тоджинской и Дархатской котловинах (Природная обстановка..., 2010).

Колонизация южных сибирских озер дафниями могла произойти уже после исчезновения ледника, т.е. около 10-15 тыс. л. назад, но такой сценарий кажется нам маловероятным, если принять во внимание вышеупомянутые оценки времени дивергенции для сибирских популяций *D. galeata* и *D. longispina* s.str. Скорее всего, дафнии (или их покоящиеся стадии) выживали в рефугиумах. В дальнейшем эти эволюционные линии имели значительное преимущество перед линиями «вселенцев», если следовать логике «гипотезы монополизации» (The monopolization hypothesis..., 2002).

Геологическую и климатическую ситуацию в Сибири в период позднего плейстоцена следует рассматривать как наиболее вероятную причину низких генетических дистанций между популяциями *D. longispina* s.str. из водоемов Урала, бассейна оз. Чаны и Западной Европы, относящихся к «европейской» кладе. Скорее всего, в этот период и происходило смешение разных митохондриальных линий на современном этапе формирующих «европейскую» кладу. В противоположность этому, популяции «сибирской» клады были изолированы в рефугиумах Алтае-Саянской горной страны. Очевидно, что гаплотипы *D. longispina* s.str., составляющие ядро этой клады, представляют остатки древней фауны. Если принять во внимание, что самые древние остатки кладоцер датируются раннеюрским периодом (Kotov, 2009; Van Damme, Kotov, 2016), вполне вероятно, что некоторые виды группы *D. longispina* s.l. были широко распространены по всей территории Северной Евразии в позднем плиоцене – раннем плейстоцене. Очевидно, что в течение плейстоценовых ледниковых циклов границы распространения большинства групп кладоцер

периодически сокращались в размерах и часто ограничивались пределами небольших рефугиумов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Комплексное исследование популяций и видов группы *D. longispina* s.l. из пресноводных водоемов Северной Евразии убедительно доказывает факт существования в ее пределах криптических таксонов, характеризующихся высоким морфологическим сходством. Из всех известных в настоящее время видов этой группы кладоцер только два – *D. galeata* и *D. cucullata* – относительно легко идентифицируются по морфологическим признакам. Высокое морфологическое сходство наблюдается между видами *D. longispina* s.str., *D. hyalina*, *D. dentifera* и западносибирским эндемиком *D. cf. longispina*. Идентификация редких видов *D. turbinata* и *D. umbra* также в большинстве случаев вызывает трудности. Следует также признать, что самцов видов группы *D. longispina* s.l. нельзя рассматривать в качестве перспективных объектов для выявления дискриминирующих признаков, как это было показано для других групп кладоцер

Дополнительные возможности для идентификации видов группы *D. longispina* s.l. предоставил анализ изменчивости формы тела особей с помощью метода геометрической морфометрии. Согласно результатам морфометрического анализа, при идентификации криптических таксонов в пределах группы следует обращать внимание на форму переднего края головы, рострума, верхней и нижней частей дорсо-вентрального края раковины.

Исследование генетической изменчивости популяций и видов группы *D. longispina* s.l. из водоемов азиатской части России внесло значительный вклад в понимание глобальной филогении и филогеографии этих ветвистоусых ракообразных. Филогения, реконструированная на различных блоках нуклеотидных последовательностей мтДНК, подтверждает существование нескольких видовых кластеров в пределах группы. Массовые виды группы – *D. galeata*, *D. cucullata*, *D. longispina* s.str./*D. hyalina* и *D. dentifera* – связаны между собой монофилетическими отношениями. Положение в общей филогенетической схеме группы редких видов – *D. umbra*, *D. turbinata* и *D. cf. longispina* – кажется менее определенным. Впрочем, не вызывает сомнения тот факт, что *D. turbinata* группируется с массовыми видами,

тогда как *D. cf. longispina* и *D. umbra* не связаны с ними близкородственными отношениями и в общей филогении группы *D. longispina* s.l. занимают базальное положение.

Учитывая особенности филогенетических отношений между видами группы *D. longispina* s.l. и принимая во внимание современные представления о типах криптических видов (О криптических видах..., 2004; Fišer et al., 2017; Finding evolutionary..., 2017), мы полагаем, что криптическое разнообразие в пределах этой группы возникло в результате воздействия различных эволюционных процессов. Виды *D. longispina* s.str., *D. hyalina* и *D. dentifera* представляют собой сестринские таксоны, которые произошли от общего предка. Криптические виды *D. turbinata*, *D. umbra* и *D. cf. longispina*, очевидно, произошли в результате воздействия совершенно других эволюционных процессов, поскольку монофилия между ними и массовыми видами не очевидна, или полностью отсутствует. И если для *D. turbinata*, *D. longispina* s.str. и *D. dentifera* мы можем предположить существование общего предка, то *D. umbra* и *D. cf. longispina* не состоят с ними в близкородственных отношениях. В данном случае, морфологическое сходство между этими видами объясняется морфологической конвергенцией между эволюционно далекими видами, которая возникла вследствие воздействия сходных режимов отбора, или параллельной эволюцией морфологически сходных предков (Fišer et al., 2017; Finding evolutionary..., 2017).

Филогения группы *D. longispina* s.l. на основе второго промежуточного транскрибируемого спейсера ITS2 ядерной ДНК демонстрирует неразрешенную политимию, свидетельствующую о гибридной природе некоторых особей *D. galeata*, *D. cucullata* и *D. longispina* s.str. Однако использование информации о предполагаемой вторичной структуре спейсера ITS2 и анализ компенсаторных замен СВС подтверждает видовую самостоятельность *D. longispina* s.str., *D. hyalina*, *D. umbra* и *D. cf. longispina*. При этом СВС анализ указывает на недавнюю эволюционную радиацию между видами *D. longispina* s.str. и *D. hyalina* и на отсутствие близкородственных отношений между *D. cf. longispina* и другими видами группы. Эти результаты подтверждают выводы о разных режимах отбора, лежащих в основе происхождения криптических видов группы *D. longispina* s.l., сделанные на основе митохондриальной филогении.

Анализ генетической структуры популяций позволяет говорить о том, что наблюдаемые филогеографические паттерны для массовых видов группы *D. longispina* s.l. (*D. galeata*, *D. longispina* s.str. и *D. dentifera*) в водоемах Сибири представляют собой результат комбинированного воздействия на популяции как минимум двух процессов – дисперсии и викариантных событий, происходивших неоднократно в разные периоды плейстоцена.

Молекулярно-генетические исследования азиатских популяций *D. longispina* s.str. способствовали выявлению двух крупных клад. Предположительно, эти клады имеют разную эволюционную историю, на что указывают показатели генетического полиморфизма популяций и характер распределения частот гаплотипов. Особенности генетической структуры (показатели полиморфизма генов мтДНК, тесты на нейтральность эволюции) в популяциях *D. dentifera* и «сибирской» клады *D. longispina* s.str. указывают на продолжительную временную изоляцию отдельных митохондриальных линий, которые сохранялись в плейстоценовых рефугиумах. Область распространения гаплотипов «сибирской» клады *D. longispina* s.str. ограничена водоемами Алтае-Саянского региона. Популяции южно-сибирских эндемичных таксонов *D. turbinata* и *D. umbra*, западносибирский эндемик *D. cf. longispina* прошли через жесткое или продолжительное бутылочное горлышко (Avice, 2000). Разорванный ареал и низкая численность их популяций служат доказательством того, что эти виды представляют собой остатки реликтовой пресноводной фауны.

Уникальный видовой и гаплотипический состав группы *D. longispina* s.l. на территории Алтае-Саянской горной системы сформировался благодаря особому сочетанию геологических и климатических событий в период плейстоцена. В периоды похолодания и аридизации Алтае-Саянская горная страна представляла собой систему рефугиумов, пригодных для выживания ветвистоусых ракообразных, которые во влажные периоды расселялись по доступным водоемам.

Изучение популяций массовых и редких видов группы позволило убедительно доказать уникальность гаплотипического и видowego разнообразия на территории азиатской части России. Особенно четко эта особенность проявляется в географически удаленных, предгорных и горных областях – Алтае-Саянской горной страны, Республики Тыва, бассейне оз. Байкал и в Забайкалье. Важно отметить, что

выявленные на территории российской части Евразии эндемичные виды и дивергентные митохондриальные линии могут представлять собой как результат микроэволюционных процессов, так и остатки древней фауны. Различная эволюционная история представителей группы *D. longispina* s.l. оказала существенное влияние на современный облик фауны пресноводных ветвистоусых ракообразных.

ВЫВОДЫ

1. Партеногенетические самки близкородственных видов группы *Daphnia longispina* s.l. характеризуются высокой степенью морфологического сходства. Диагностические морфологические признаки половозрелых самцов этих видов в целом малоинформативны, однако, они более выражены у эндемичных видов *D. umbra* и *D. turbinata*.

2. Использование метода геометрической морфометрии для изучения изменчивости формы тела на популяционном и видовом уровнях позволяет выявить основные дискриминирующие признаки для партеногенетических самок близкородственных и криптических видов группы *Daphnia longispina* s.l.

3. Реконструкция филогенетических взаимоотношений в пределах группы *D. longispina* s.l., выполненная на основе фрагментов генов 16S, 12S и ND2 митохондриальной ДНК, выявляет несколько крупных клад, соответствующих биологическим видам. Митохондриальная филогения подтверждает устойчивые монофилетические отношения между видами *D. galeata* – *D. cucullata* и *D. longispina* s.str. – *D. dentifera*.

4. При изучении популяций массовых и редких видов группы *Daphnia longispina* s.l. с помощью методов молекулярно-генетического анализа на территории азиатской части РФ впервые обнаружены популяции видов *D. dentifera* и *D. umbra*, а также *D. cf. longispina*, новый для науки биологический вид, формально не описанный к настоящему времени.

5. Положение редких видов *D. turbinata*, *D. umbra* и *D. cf. longispina* в общей митохондриальной филогении группы *D. longispina* s.l. неустойчиво. Однако реконструкция филогенетических отношений на основе объединенного блока фрагментов генов 12S, 16S и ND2 мтДНК свидетельствует о более тесной связи между *D. turbinata* и массовыми видами группы. Гипотетически новый вид *D. cf.*

longispina не относится к группе *D. longispina* s.l., формируя дистантную кладу.

6. Филогения группы *D. longispina* s.l. на основе второго промежуточного транскрибируемого спейсера ITS2 ядерной ДНК демонстрирует плохо разрешимую политомию и представляет собой результат гибридного происхождения некоторых особей близкородственных видов *D. galeata* – *D. cucullata* – *D. longispina* s.str., формирующих смешанные клады.

7. Использование информации о предполагаемой вторичной структуре спейсера ITS2 ядерной ДНК и анализ полукомпенсаторных замен подтверждают видовую самостоятельность форм/видов группы *D. longispina* s.l., которые практически не отличаются от *D. longispina* s.str. по морфологическим признакам.

8. Плейстоценовые циклы похолодания и аридизации климата в южной части азиатского региона РФ способствовали формообразованию кладоцер, в частности, путем разобщения отдельных популяций в приледниковых рефугиумах. Впоследствии сохранившиеся с доплейстоценовых времен немногочисленные формы и их непосредственные потомки вторично колонизировали водоемы Сибири, в результате чего на этой территории сформировался уникальный комплекс реликтовых видов группы *D. longispina* s.l.

9. Обитание в водоемах Алтая и Саян реликтовой группы *D. longispina* s.str., которая выжила в плейстоценовых рефугиумах и быстро распространилась в постледниковый период, было основным препятствием для колонизации этих водоемов родственными видами с запада и востока в период улучшения климатических условий. «Старый» филогеографический паттерн играл важную роль при формировании современного паттерна, в частности, определил положение современной переходной зоны между «западной» и «восточной» фаунами.

Статьи по теме диссертации, опубликованные в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации:

Статьи в отечественных журналах:

1. Зуйкова Е.И., Бочкарев Н.А., 2009. Характеристика пелагического зоопланктона крупных озер Тоджинской котловины (Республика Тыва) // Журн. биол. внутр. вод. № 1. С. 53–61.

2. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2010а. Постэмбриональная морфологическая изменчивость *Daphnia galeata* в водоемах различного типа // Сибирск. экол. журн. № 1. С. 41–55.
3. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2010b. Морфологическая изменчивость *Daphnia galeata* (Cladocera: Anomopoda) в озерах Тоджинской котловины (бассейн р. Большой Енисей) // Известия ИркГУ. Серия Биология. Экология. Т. 3. № 1. С. 23–26.
4. **Zuykova E.I.**, Bochkarev N.A., Semenova A.S., Katokhin A.V., 2010. Morphological differentiation, mitochondrial and nuclear DNA variability between geographically distant populations of *Daphnia galeata* and *Daphnia cucullata* (Anomopoda, Daphniidae) // J. Siberian Federal University. Biology. V. 4(3). P. 434–453.
5. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2011. Популяционная морфологическая изменчивость *Daphnia galeata* (Cladocera: Anomopoda) в озерах Тоджинской котловины (бассейн р. Большой Енисей) // Экология. № 4. С. 280–288.
6. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., Катохин А.В. 2013. Молекулярно-генетическая диагностика и филогения видов рода *Daphnia* (Crustacea: Cladocera) из водоемов бассейна озера Чаны // Генетика. Т. 49(2). С. 235–243.
7. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., Шевелева Н.Г., 2016а. Генетический полиморфизм, распространение гаплотипов и филогения видов рода *Daphnia* (Cladocera: Anomopoda) из некоторых водоемов России по результатам секвенирования гена 16S митохондриальной ДНК // Генетика. Т. 52. № 4. С. 1–13.
8. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2016b. Популяционная и межвидовая морфологическая изменчивость видов рода *Daphnia* O.F. Muller 1785 (Cladocera, Daphniidae) // Зоол. журн. Т. 95. № 5. С. 1–10.
9. **Зуйкова Е.И.**, Симонов Е.П., Бочкарев Н.А., 2017. Сравнительный морфологический и генетический анализ популяций и видов рода *Daphnia* O.F. Müller, 1785 (Crustacea, Daphniidae) из озер Глубокого и Чаны // Известия РАН. Серия Биологическая. № 3. С. 262–275.
10. **Зуйкова Е.И.**, 2019. Идентификация и филогения криптических видов комплекса *Daphnia longispina* (Cladocera, Daphniidae) на основе вторичной структуры промежуточного транскрибируемого спейсера 2 (ITS2) ядерной ДНК // Генетика. Т. 55. С. 557–573.

11. Зуйкова Е.И., Бочкарев Н.А., Котов А.А., 2020. Видовая и генетическая структура группы *Daphnia longispina* s.l. (Cladocera: Daphniidae) в водоемах Южной Сибири // Зоол. журн. Т. 99. № 10. С. 1110–1123.

Статьи в зарубежных рецензируемых журналах, индексирующихся в системе WOS Core Collection:

12. Zuykova E.I., Bochkarev N.A., Katokhin A.V., 2013. Identification of the *Daphnia* species (Crustacea: Cladocera) in the lakes of the Ob and Yenisei River basins: morphological and molecular phylogenetic approaches // Hydrobiologia. V. 715. P. 135–150.

13. Zuykova E.I., Simonov E.P., Bochkarev N.A., Taylor D.J., Kotov A.A., 2018b. Resolution of the *Daphnia umbra* problem (Crustacea: Cladocera) using an integrated taxonomic approach // Zool. J. Linn. Soc. V. 184. P. 969–998. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zly015>.

14. Zuykova E.I., Simonov E.P., Bochkarev N.A., Abramov S.A., Sheveleva N.G., Kotov A.A., 2018a. Contrasting phylogeographic patterns in closely related species of *Daphnia longispina* group (Crustacea: Cladocera) with focus on north-eastern Eurasia // PLoS ONE. V. 13. № 11. e0207347.

15. Zuykova E.I., Sheveleva N.G., Kotov A.A., 2019a. Redescription of *Daphnia turbinata* Sars, 1903 (Crustacea: Cladocera: Daphniidae) // Zootaxa. V. 4658. P. 317–330.

16. Zuykova E.I., Bochkarev N.A., Taylor D.J., Kotov A.A., 2019b. Unexpected endemism in the *Daphnia longispina* complex (Crustacea: Cladocera) in Southern Siberia // PLoS ONE. V. 14. № 9. e0221527.

Статья в коллективной монографии:

1. Зуйкова Е.И., Бочкарев Н.А., 2010. Размерно-возрастная морфологическая изменчивость некоторых видов рода *Daphnia* // Сообщества и популяции животных: экологический и морфологический анализ. Труды ИСиЭЖ СО РАН. Вып. 46. Новосибирск-Москва: Изд-во КМК. С. 212–244.

Материалы и тезисы конференций:

1. Зуйкова Е.И., 2004. Распределение и экология зоопланктона в зависимости от морфометрии, гидрологических и гидрохимических характеристик озер Тоджинской котловины // Сибирск. Зоологич. конф. Тезисы докл. Новосибирск. 2004. С. 259.

2. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., Железнова И.В., 2005. Характеристика зоопланктона озера Тоджинской котловины в зависимости от параметров среды // Мат. VII Межд. конф. «Природные условия, история и культура западной Монголии и сопредельных регионов». Кызыл: ТуВИКОПР СО РАН. 2005. С. 159–161.

3. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н. А., Железнова И.В., 2005. Морфологическая изменчивость *Daphnia galeata* в зависимости от факторов внешней среды // Материалы Всероссийской конференции «Биологические аспекты рационального использования и охраны водоёмов Сибири». Томск, ТГУ. 2006. С. 26.

4. Железнова И.В. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2006. Структура зоопланктонных сообществ озёр Тоджинской котловины // Материалы Всероссийской конференции «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии». Улан-Удэ, ИОЭБ СО РАН. 5-10 сентября 2006. С. 43.

5. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2007. Сезонная морфологическая изменчивость *Daphnia galeata* в водоемах различного типа // Материалы Всероссийской школы-конференции «Ветвистоусые ракообразные: систематика и биология». Борок, ИБВВ РАН. 8-12 октября 2007 г. С. 255–260.

6. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2009а. Популяционная морфологическая изменчивость *Daphnia curvirostris* Eylmann в водоемах различного типа // Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию Енисейской ихтиологической лаборатории «Проблемы и перспективы использования водных биоресурсов Сибири в XXI веке». Красноярск, ФГНУ НИИРВЭ. 8-12 декабря 2008 г. С. 310–316.

7. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2009b. Морфологическая изменчивость *Daphnia galeata* (Cladocera: Anomopoda) в озерах Тоджинской котловины (бассейн р. Большой Енисей) // Матер. конф. «Проблемы биологии и экологии Байкальского региона». Иркутск: Изд-во Ирк. ун-та. 2009. С. 75.

8. **Зуйкова Е. И.**, Бочкарёв Н. А., Катохин А.В., 2010. Морфологическая и генетическая дифференциация некоторых видов рода *Daphnia* O.F. Müller, 1785 (Crustacea: Cladocera) из Глубокого озера и бассейна озера Чаны // Экология водных беспозвоночных. Мат-лы Междунар. конф. Борок, ИБВВ РАН. 30 октября-2 ноября 2010 г. С. 112–114.

9. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2010. Морфологическая и генетическая дифференциация сестринских видов *Daphnia galeata* и *Daphnia cucullata* (Anomopoda: Daphniidae) из Новосибирского водохранилища // Мат-лы 2-ой Международной конференции «Современное состояние водных биоресурсов». Новосибирск, НГАУ, ФГУП «Госрыбцентр». 7-9 декабря 2010 г. С. 54.

10. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., 2011a. Виды рода *Daphnia* O.F. Müller, 1785 (Crustacea: Cladocera) в озере Чаны: морфология и молекулярно-генетический анализ популяций // Всероссийская конференция посвященной 100-летию со дня рождения Б.Г. Иоганзена. Томск, ТГУ. 19-21 апреля 2011 г. С. 63.

11. **Zuykova E.I.**, Bochkarev N.A., Katokhin A.V., 2011b. Identification of the *Daphnia* species (Crustacea: Cladocera) in the lakes of the Ob and Yenisei rivers basins: morphological and molecular phylogenetic approaches // 9th International Symposium on Cladocera. Verbania, Italy. 2011. P. 44.

12. **Zuykova E.**, Simonov E., Abramov S., Bochkarev N., Sheveleva N., 2014. Mitochondrial DNA diversity of the *Daphnia longispina* complex in South Siberia // 10th international Symposium on Cladocera, Lednice, Czech Republic. 2014. P. 132.

13. **Зуйкова Е.И.**, 2019. Криптические виды комплекса *Daphnia longispina* (Cladocera): способы их идентификации, филогения и распространение в водоемах азиатской части России // Экология и эволюция: новые горизонты. Международный симпозиум, посвященный 100-летию академика С.С. Шварца. Екатеринбург, ИЭРиЖ УрО РАН. 1-5 апреля 2019 г. С. 313–315.

14. **Зуйкова Е.И.**, Бочкарев Н.А., Симонов Е.П., Шевелева Н.Г., Котов А.А., 2020. Эндемичные и криптические виды группы *Daphnia longispina* s.l. (Cladocera): филогения и распространение в водоемах азиатской части России // Экология водных беспозвоночных. Тезисы всероссийской конференции, посвященной 110-летию со дня рождения Ф.Д. Мордухай-Болтовского. Борок, ИБВВ РАН. 9-13 ноября 2020 г. С. 39.