

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 575.8 574.5

№ ИНГЗ 0108-2016-0008

№ НИОКТР АААА-А16-116120810093-6

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев



27 декабря 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 7. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
ВИДООБРАЗОВАНИЯ И РАННИХ ЭТАПОВ ЭВОЛЮЦИИ. РАЗРАБОТКА КОНЦЕПЦИИ
ГОМЕОСТАЗА РАЗВИТИЯ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТАБИЛЬНОСТИ
РАЗВИТИЯ И БИОРАЗНООБРАЗИЯ ПРИРОДНЫХ СИСТЕМ

(заключительный отчет)

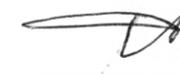
Руководитель темы: д.б.н., зав. лаб.

 27.12.17.

А.М. Куликов

подпись, дата

Руководитель темы: чл.-корр. РАН,
д.б.н., зав. лаб.

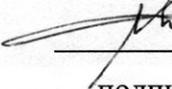
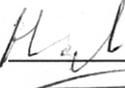
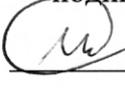
 27.12.2017

В.М. Захаров

подпись, дата

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

- Руководитель темы:  27.12.17 А.М. Куликов (введение,
Доктор биологических наук, зав. лаб. подпись, дата заключение, раздел 5)
- Руководитель темы:  27.12.2017 В.М. Захаров (введение,
Член-корреспондент РАН, доктор подпись, дата заключение, раздел 9)
биологических наук, зав. лаб.
- Ведущие исполнители темы:
- Кандидат биологических наук, в.н.с.  27.12.2017 О.В. Брандлер (раздел 1, 2)
подпись, дата
- Кандидат биологических наук, с.н.с.  27.12.17 А.С. Богданов (раздел 1)
подпись, дата
- Кандидат биологических наук, с.н.с.  27.12.17 Н.С. Мюге (раздел 2)
подпись, дата
- Доктор биологических наук, в.н.с.  27.12.17 И.Ю. Баклушинская (раздел 3)
подпись, дата
- Кандидат биологических наук, зав. лаб.  27.12.17 Я.Р. Галимов (раздел 3)
подпись, дата
- Младший научный сотрудник  27.12.17 Д.М. Щепетов (раздел 3)
подпись, дата
- Кандидат биологических наук, с.н.с.  27.12.17 С.Ю. Сорокина (раздел 4)
подпись, дата
- Кандидат биологических наук, с.н.с.  27.12.17 О.Е. Лазебный (раздел 6)
подпись, дата
- Кандидат биологических наук, с.н.с.  27.12.17 Ф.Н. Шкиль (раздел 7)
подпись, дата
- Доктор биологических наук, с.н.с.  27.12.17 С.С. Алексеев (раздел 8)
подпись, дата
- Кандидат биологических наук, н.с.  27.12.17 И.Е. Трофимов (раздел 9)
подпись, дата

Оглавление

Реферат	4
Введение	6
Раздел 1. Генетический анализ внутри- и межвидовой гибридизации. Зоны контакта.	7
Раздел 2. Филогеография, популяционно-генетический анализ и таксономические ревизии модельных групп животных.	12
Раздел 3. Изучение эволюции систем детерминации пола в различных группах животных	23
Раздел 4. Изучение популяционно-генетических механизмов поддержания полиморфизма мтДНК и ядерных псевдогенов митохондриального происхождения в природных популяциях у дрозофил группы <i>virilis</i> .	27
Раздел 5. Генетические основы формирования презиготических изолирующих барьеров, на примере дрозофил группы <i>virilis</i> .	29
Раздел 6. Генетика агрессивности	33
Раздел 7. Исследование онтогенетических механизмов морфологической диверсификации пучка видов: сравнительный анализ онтогенетических каналов (крупные африканские усачи)	34
Раздел 8. Анализ значимости онтогенетических изменений в возникновении фенотипического разнообразия в процессах видообразования. Разработка подходов для практической оценки механизмов формообразования, как основы для обеспечения сохранения биоразнообразия и рационального природопользования.	43
Раздел 9. Исследование стабильности развития биологических систем. Оценка состояния биоразнообразия и здоровья среды.	49
Заключение	60
Список публикаций	61

Реферат

Отчет 64 с., 9 ч., 16 рис., 23 источника.

Ключевые слова: отчет, научно-исследовательская работа, гибридизация, межвидовая гибридизация, ядерный геном. зоны вторичного контакта, изолирующие механизмы, детерминация пола, осетровые, бокоплавов, моллюски, божьи коровки, желтогорлая мышь, домовая мышь, клещи *Dermacentor*, слепушонки *Ellobius*, даурский суслик *Spermophilus dauricus*, ядерные маркеры, митохондриальные маркеры, филогенетические реконструкции, гомеостаз развития, природные популяции, здоровье среды.

Сравнительное изучение транскриптомов 64 видов бокоплавов, эндемичных для озера Байкал, и двух неэндемичных аутгрупп позволило проверить гипотезу, согласно которой появление «букетов видов» в изолированных местообитаниях связно с адаптивной радиацией. Полученные результаты свидетельствуют о двух инвазиях амфипод в озеро Байкал. Показано, что эволюция защитного вооружения и потеря конечностей и сенсорных органов проходили параллельно в различных филогенетических линиях. Признаки отбора обнаружены в генах митохондриальных мембранных белков, связанных с переносом электронов и синтезом АТФ, и Са-связывающих мышечных белков. Предполагается связь с адаптацией к планктонному образу жизни, низким температурам и высокому давлению, а также низкой минерализации байкальских вод.

Разработан быстрый метод идентификации различных продуктов (включая икру) ценных промысловых видов осетровых, в частности, белуги, калуги и межвидовых гибридов. Впервые предложено использовать как маркер ядерной ДНК, второй интрон S6 Ribosomal Protein (RP2S6). Использование этого маркера оказывается быстрым, надежным и недорогим способом генетической идентификации ценного промыслового объекта.

Показано, что митохондриальный геном, размещенный в Genbank NCBI KR534854 ошибочно приписан даурскому суслику, на самом деле, это геном обыкновенной белки *Sciurus vulgaris*.

Отмечено, что, за исключением *Dermacentor niveus*, кластеризация митотипов в группе *marginatus* не обнаруживает отчетливого соответствия видовой принадлежности клещей, предварительно установленной по морфологическим признакам.

По пяти тетраплоидным микросателлитным локусам и контрольному региону митохондриальной ДНК показано, что сибирский осетр представлен генетически хорошо различающимися группировками, соответствующим гидрографическим бассейнам: Обь-Иртышская, Байкало-Енисейская, Ленская и Колымская.

Эндосимбионты *Rickettsia* обнаружена как в нативных, так и в инвазийных популяциях *Harmonia axyridis*, тогда как *Spiroplasma* обнаружена только в природных популяциях.

Половые хромосомы слепушонок *Ellobius* уникальны для млекопитающих: 5 видов имеют три типа половых хромосом. Анализ полученных нами впервые молекулярно-генетических данных показал, что у видов подрода *Ellobius* ($XX\♂/XX\♀$) и подрода *Bramus* *E. lutescens* ($X0\♂/X0\♀$), отсутствует Y хромосома как отдельный элемент, но некоторые её гены, в частности, ген сперматогенеза *Eif2s3y*, сохранены в геноме, хотя и значительно изменены. Для *E. fuscocapillus* ($XY\♂/XX\♀$), сохранивших Y хромосому, впервые показано наличие в геноме самок фрагментов генов *Eif2s3y* и *Sry*, первичного гена каскада детерминации пола по мужскому типу. Эти результаты свидетельствуют о дупликации и транслокации фрагмента Y хромосомы на другую хромосому. Подтверждена гипотеза о независимой эволюции половых хромосом в подродах *Ellobius* и *Bramus*.

Использование ядерных псевдогенов митохондриального происхождения в качестве молекулярных маркеров эволюционно-значимых событий позволяет осуществлять оценки мт-полиморфизма предковых популяций, уточнять возрастные рамки дивергенции родственных видов, но имеет ограничения по скорости вырождения NUMT-последовательностей и требует учитывать структурные особенности NUMT-маркеров.

В исследованиях на близкородственных видах дрозофил и арктических гольцов находят подтверждение предположение о ведущем значении видоспецифических признаков брачного поведения и способностей подбора оптимальных брачных партнеров в формировании презиготических изолирующих барьеров при симпатрических сценариях видообразования.

Анализ особенностей развития на ранних стадиях онтогенеза у близкородственных видов усачей озера Тана (костистые рыбы, род *Barbus*) показал, что многие видоспецифические морфологические признаки формируются на ранних этапах онтогенеза. Анализ онтогенетических каналов выявил различия в сроках формирования взрослой морфологии у разных видов усачей, что предполагает возможность быстрой эволюции адаптивно-значимых морфологических признаков посредством регуляции эмбриональных индукций на ранних стадиях онтогенеза.

Все возрастающее антропогенное воздействие на окружающую природную среду определяет актуальность и значимость обеспечения разносторонней оценки и мониторинга его последствий. Новые возможности для решения задачи открывает методология оценки здоровья среды, основанная на характеристике состояния разных видов живых существ по гомеостазу развития. Анализ и обобщение оригинальных данных, полученных в ходе оценки качества среды при разных видах антропогенного воздействия, позволяет охарактеризовать возможности используемых при этом подходов для оценки благоприятности среды для живых существ и человека. Это также открывает возможность для оценки диапазона возможных изменений гомеостаза развития в реальных природных условиях.

ВВЕДЕНИЕ

«Ничто в биологии не имеет смысла кроме
как в свете эволюции» *Ф. Г. Добжанский.*

До настоящего времени остается нерешенным ряд проблем эволюционной генетики, связанных с оценкой темпов и механизмов накопления эволюционной изменчивости, особенностями формирования изолирующих барьеров при аллопатрическом и симпатрическом сценариях видообразования, ведущих механизмах формирования изолирующих барьеров и их генетических основах.

В рамках данной темы выполняются работы, посвященные всестороннему анализу проблем видообразования, статуса вида, устойчивости вида и эволюции различных морфологических, физиологических и молекулярных признаков. Работы ведутся на разнообразных модельных организмах, включая различные группы беспозвоночных животных: клещи, ракообразные, моллюски, виды дрозофил различной степени родства, осетровые и костистые рыбы, различные виды хищных птиц, грызунов, наземных беличьих, и на выборках из различных популяций человека. В приведенном материале показаны результаты работ за 2017 г. по анализу зон гибридизации родственных видов, анализу межвидовых гибридов и видоспецифических признаков, связанных с презиготическими изолирующими барьерами, филогеографические исследования и таксономические ревизии модельных групп животных. Часть исследований посвящены исследованию применимости молекулярных маркеров митохондриального происхождения для оценки эволюционных событий прошлого, и применению высокопродуктивных молекулярно-генетических методов исследования сложных количественных признаков. Наконец, ряд исследований посвящен разработке подходов для биомониторинга на экосистемном уровне, заключающихся в разработке алгоритмов анализа различных признаков ключевых видов различных экосистем, усредненные оценки по которым могут свидетельствовать о состоянии экосистемы.

Раздел 1. Генетический анализ внутри- и межвидовой гибридизации. Зоны контакта.

Введение.

Изучение зон гибридизации необходимо для анализа процесса видообразования. Если ранее гибридизация рассматривалась как случайное нарушение изолирующих барьеров, то в современных публикациях все чаще обсуждается роль гибридизации как одного из возможных механизмов видообразования. Вместе с тем, изучение процесса становления разного рода барьеров, обеспечивающих целостность генофонда вида, невозможно без оценки роли гибридизации. Одной из причин недооценки масштабов гибридизации ранее было недостаточное использование молекулярно-генетических методов. Разработка подходов и поиск новых маркеров является актуальной задачей наряду с расширением выборки объектов исследования.

Методы.

Использованы современные цитогенетические методы, такие как диссекция хромосом, метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, дифференциальные окраски хромосом. Применены молекулярно-генетические методы, в том числе рестриктный анализ, микросателлитный анализ, секвенирование фрагментов ядерной и митохондриальной ДНК. Использованы различные методики для выделения ДНК. Для обработки полученных данных применены различные пакеты программ: LaserGene, MEGA 6.0, Exonerate, GeneMarker (version 1.2), Polysat, SPAGeDi (Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity), GenAlex, и др.).

Результаты и обсуждение.

Подраздел 1. Проведённое нами исследование изменчивости фрагмента митохондриального гена первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*) у желтогорлой мыши *S. flavicollis* показало, что этот вид дифференцирован на две близкие парapatричные формы (северную и южную), контактирующие на севере и западе Украины, на юге Московской области и на правобережье Волги в Ульяновской, Самарской областях с образованием смешанных популяций (Богданов и др., 2013, 2014). На юге Московской области зона контакта северной и южной форм располагается к северу от реки Ока, поэтому предполагалось, что последняя является барьером к распространению северной формы и таким образом лимитирует расширение гибридной зоны в южном направлении. Проведённое в 2017 году дополнительное исследование гена *COI* в выборке *S. flavicollis* из Арзамасского района Нижегородской области, с правобережья Оки, показало, тем не менее, что все экземпляры из этого пункта относятся к северной форме. Таким образом, предположение о том, что Ока на всё своём протяжении оказывает сдерживающее влияние на распространение северной формы *S. flavicollis* и ограничивает гибридную зону, не подтвердилось; возможно, что Ока может быть препятствием к расселению желтогорлых мышей той или другой формы лишь на локальных участках.

Подраздел 2. У желтогорлой мыши известен внутри- и межпопуляционный полиморфизм по числу и размерам добавочных (В-) хромосом: у разных экземпляров *S. flavicollis* В-хромосомы представляют собой акроцентрики среднего или мелкого размера, а их число может варьировать от 0 до 8. В целом, распределение популяций, в которых были выявлены мыши с В-хромосомами, а также изменчивость их количества и морфологии, имеют неотчётливый характер. Однако до настоящего времени не было никаких данных о популяционном полиморфизме структуры хроматина и генного состава В-хромосом у *S. flavicollis*, за исключением сведений о различиях в экспрессии генов либо числе их копий у желтогорлых мышей с разным количеством В-хромосом или у животных с В-хромосомами и без них (Tanić et al., 2000, 2005; Rajčić et al., 2015). Таким образом, не исключено, что В-хромосомы в разных популяциях или популяционных группировках *S. flavicollis* могут отличаться по составу повторяющихся последовательностей ДНК и происходить от разных А-хромосом. При использовании микродиссекции и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) нами исследовано происхождение и особенности добавочных (В-) хромосом у желтогорлых мышей северной и южной внутривидовых форм.

Специфичные В-хромосомные зонды были получены из четырёх отдельно диссектированных В-хромосом трёх желтогорлых мышей из Сербии и Ростовской области России; далее была произведена FISH этих зондов с метафазными хромосомами, выделенными прямым методом из клеток костного мозга или культивированных фибробластов 8 желтогорлых мышей из Сербии, Белоруссии и России. Помимо специфичных В-хромосомных зондов, в качестве контроля при проведении FISH использовались стандартные флуоресцентные зонды, специфичные для X-хромосомы *Mus musculus*.

При использовании всех специфичных В-хромосомных зондов отчётливый FISH-сигнал всегда выявлялся по всей длине В-хромосом, независимо от их числа и размера, а также в прицентромерном (псевдоаутосомном, PAR) районе X-хромосом, прителомерных гетерохроматических районах двух пар мелких аутосом, а у самцов – также в прицентромерном (псевдоаутосомном, PAR) районе Y-хромосомы. Кроме того, в остальной части Y-хромосомы FISH-сигнал детектировался, но имел значительно более слабую интенсивность (рис. 1). Этот паттерн FISH-сигналов неизменен для кариотипов желтогорлых мышей из разных частей ареала вида, что свидетельствует об одинаковом происхождении и сходных путях эволюционных преобразований В-хромосом, несмотря на принадлежность исследованных животных к северной или южной внутривидовым формам. Наиболее вероятно возникновение добавочных хромосом *S. flavicollis* от гомологичных PAR-районов половых хромосом, отличающихся высокой частотой рекомбинаций (Rajčić et al., 2017).

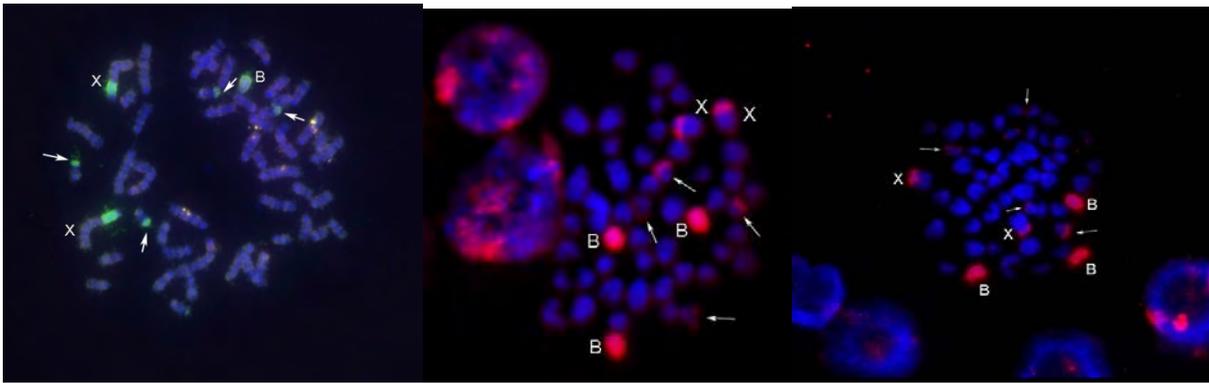


Рис. 1. FISH-сигналы (зелёный или красный цвет) двух специфических В-хромосомных проб с метафазными хромосомами желтогорлых мышей из Сербии и Ростовской области России. Стрелками указаны мелкие акроцентрические аутосомы с прителомерными FISH-сигналами. Тотальная окраска хромосом – DAPI (голубой цвет).

Rajcic M., Romanenko S., Karamysheva T., Blagojevic J., Adnadjevic T., Budinski I., **Bogdanov A.**, Trifonov V., Rubtsov N., Vujosevic M. The origin of B chromosomes in yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*) break rules but keep playing the game // PLOS ONE. 2017. PONE-D-16-32621R2 IF (WoS) **2.806** IF(Scopus)=**3.11**

Подраздел 3.

На европейской территории России группу обыкновенных полевков представляют виды-двойники с разным диплоидным числом хромосом, *Microtus arvalis* ($2n = 46$) и *M. rossiaemeridionalis* ($2n = 54$), при этом 46-хромосомный вид представлен двумя кариоформами, замещающими друг друга с запада на восток, *arvalis* и *obscurus*. В зоне контакта, обнаруженной на Русской равнине, две формы сходятся с образованием парапатрической гибридной зоны. Судя по разнообразию гибридных кариотипических сочетаний и данным экспериментальных скрещиваний, гибриды *arvalis* × *obscurus* плодовиты. В парапатрической зоне контакта встречаются обе исходные 46-хромосомные формы и гибриды, распознаваемые по числу плеч хромосом за счет внутривидовых различий в шести парах хромосом. Цитогенетический анализ природного гибрида из Владимирской области выявил гетерозиготность по локализации района ядрышкового организатора для двух крупных пар хромосом, общих для обыкновенных полевков форм *arvalis* и *obscurus*. Различия по локализации могут рассматриваться как специфические ядерные маркеры для этих видов полевков (Булатова и др., 2017).

Булатова Н.Ш., Павлова С.В., Потапов С.Г., **Громов А.Р.** Ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом обыкновенных полевков как ядерные маркеры геномной дифференциации по данным из гибридной зоны двух кариоформ, *arvalis* и *obscurus* // Генетика. 2017. Т. 53. № 6. С. 761-

764. DOI: 10.7868/S0016675817060030 (Bulatova N. Sh., Pavlova S.V., Potapova S.G., Gromov A.R. Nucleolar organizing regions (NORs) of common vole chromosomes as nuclear markers of genome differentiation in data from a hybrid zone of two karyoforms, arvalis and obscurus // Russian Journal of Genetics. 2017. V. 53. No. 6. P. 736–739. DOI: 10.1134/S1022795417060035 IF (WoS)= 0.55 IF(Scopus)=0.49 Импакт-фактор РИНЦ 2016 =1,005

Подраздел 4.

Икра осетровых рыб - хорошо известный деликатес, это один из самых ценных продуктов на продовольственном рынке. Высокие цены на икру в прошлом привели к сильному перелову диких видов осетровых и росту торговли контрафактной продукцией. Одним из приоритетов в усилиях по сокращению незаконной торговли является разработка методов определения видов продукции, реализуемых с использованием стандартизированного, дешевого и быстрого подхода. В 2017 г. опубликованы данные исследований по трем видам осетровых.

Нами впервые разработан быстрый метод идентификации различных продуктов (включая икру) белуги *Huso huso* и ее межвидовых гибридов. Впервые предложено использовать маркер ядерной ДНК, второй интрон S6 Ribosomal Protein (RP2S6). Этот участок был выбран из 1867 возможных интронов, предсказанных выравниванием транскриптома трех видов осетровых, для которых известны полные геномы. Специфичные для белуги SNP определяли путем клонирования и секвенирования фрагмента гена RP2S6 65 особей 11 видов, оценивали на выборке из еще 341 особей и тестировали на 18 образцах икры. Амплификация с использованием диагностических праймеров на SNP прошла успешно, что подтверждается получением специфичной для белуги полосы на электрофорезе, тогда как для других видов PCR продукта получено не было. Этот маркер также оказался пригоден для идентификации межвидовых гибридов, в которых белуга является одним из основных видов как, например, в случае с бестером. Разработка такого маркера представляет собой значительный прогресс в создании стандартизированной группы ядерных маркеров, его использование оказывается быстрым, надежным и недорогим способом генетической идентификации ценного промыслового объекта.

Для амурского осетра *Acipenser schrenckii* и калуги *Huso dauricus* была проведена оценка двух условно диагностических маркеров, фрагментов двух предсказанных интронов ядерных генов, кодирующих рибосомальные белки RPL8. Маркеры были протестированы на образцах тканей или икры 508 особей двух видов и 31 гибрида. Для того, чтобы сравнить результаты по локусам, большинство особей также были диагностированы по двум ранее опубликованным микросателлитным маркерам, хорошо идентифицирующим оба вида. Ни один из маркеров не показал фиксацию аллельных вариантов для амурского осетра и калуги, что подтверждает сложность различения этих двух симпатрических видов по генетическим маркерам, несмотря на

выраженные морфологические различия, которые позволили отнести данные виды к двум разным родам. Таким образом, лишь использование мульти-локусной панели, приведенной в нашем исследовании, может рассматриваться эффективным инструментом для генетической идентификации как чистых амурского осетра и калуги, так и их гибридов (Boscari et al., 2017 a,b).

Boscari E., Vitulo N., Ludwig A., Caruso C., **Mugue N.S.**, Suciu R., Onara D.F., Papetti C., Marino I.A., Zane L., Congiu L. Fast genetic identification of the Beluga sturgeon and its sought-after caviar to stem illegal trade // Food Control. 2017. V. 75. P. 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.039> IF (WoS)= **3.496** IF(Scopus)=**3.86**

Boscari E., Barmintseva A., Zhang S., Yue H., Li C., Shedko S.V., Lieckfeldt D., Ludwig A., Wei Q.W., **Mugue N.S.**, Congiu L. Genetic identification of the caviar-producing Amur and Kaluga sturgeons revealed a high level of concealed hybridization // Food Control. 2017. V. 82. P. 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.001> IF (WoS) **3.496** IF(Scopus)= **3.86**

Заключение.

Исследования, проведенные в 2017 году по изучению особенностей гибридизации в различных группах животных, носят приоритетный характер. Основные результаты были опубликованы в ведущих научных журналах, входящих в Q1. Для ряда объектов (осетровые), имеющих высокое народно-хозяйственное значение, разработаны тест-системы, которые необходимы для борьбы с незаконным отловом, контрабандой и ненадлежащей маркировкой осетровых и их продукции.

Раздел 2. Филогеография, популяционно-генетический анализ и таксономические ревизии модельных групп животных.

Введение

Современные методы и подходы позволяют на качественно новом уровне описать распространение видов и внутривидовых форм, провести популяционно-генетический анализ, что нередко оказывается основой для таксономических ревизий групп различного ранга. В качестве групп, интересных для такого рода исследований нами были выбраны млекопитающие (Rodentia, Sciuridae et Muridae), осетровые рыбы, а также различные группы беспозвоночных животных: клещи, ракообразные, моллюски. Использование различных объектов позволяет более адекватно оценивать используемые маркеры, сравнительный анализ полученных результатов расширяет представления о закономерностях эволюции генетических признаков.

Методы.

Использован широкий спектр современных молекулярно-генетических методов, таких как микросателлитный анализ, секвенирование полных геномов (RNA next-generation sequencing), фрагментов ядерной и митохондриальной ДНК, а также различные цитогенетические методики. Использованы различные методики для выделения ДНК, дающие наилучший выход материала для каждого объекта, подобраны праймеры и условия полимеразной цепной реакции. Применены различные программы для обработки и анализа полученного генетического материала, включая анализ полных геномов, и различные статистические программы для конкретных задач, SNP-анализа, подбора праймеров, построения филогенетических реконструкций и т.д. (Lasergene, GARLI 2.0, MrBayes 3.2, MEGA 6.0, GeneMarker (version 1.2), OrthoMCL pipeline v.2.0, Polysat, Network и др.).

Результаты и обсуждение.

Подраздел 1.

Феномен букета видов, населяющих древние озера, океанические острова или другие изоляты в течение длительного времени, обычно интерпретируется как следствие адаптивной радиации, хотя прямых молекулярно-генетических доказательств данной гипотезы практически нет. Сравнительное изучение транскриптомов 64 видов бокоплавов, эндемичных для озера Байкал, и двух неэндемичных аутгрупп позволило провести ревизию букетов видов бокоплавов и показать действие отбора для эндемичных групп. Полученные результаты подтверждают предположение о двух одновременных инвазиях амфипод в озеро Байкал (рис. 2). Показано, что эволюция защитного вооружения и потеря конечностей и сенсорных органов проходили параллельно в различных филогенетических линиях. Наиболее интенсивная диверсификация происходила после второй инвазии бокоплавов. В генах, кодирующих митохондриальные мембранные белки с

цепочкой переноса электронов и функциональностью синтеза АТФ, отмечаются признаки отбора, что может свидетельствовать об адаптации к активному образу жизни планктонных форм и к выживанию в условиях низких температур и высоких гидростатических давлений, которые, как известно, влияют на функционирование мембран. Также показана изменчивость для С-связывающих мышечных белков, что, возможно, указывает на адаптацию к низкой минерализации байкальских вод.

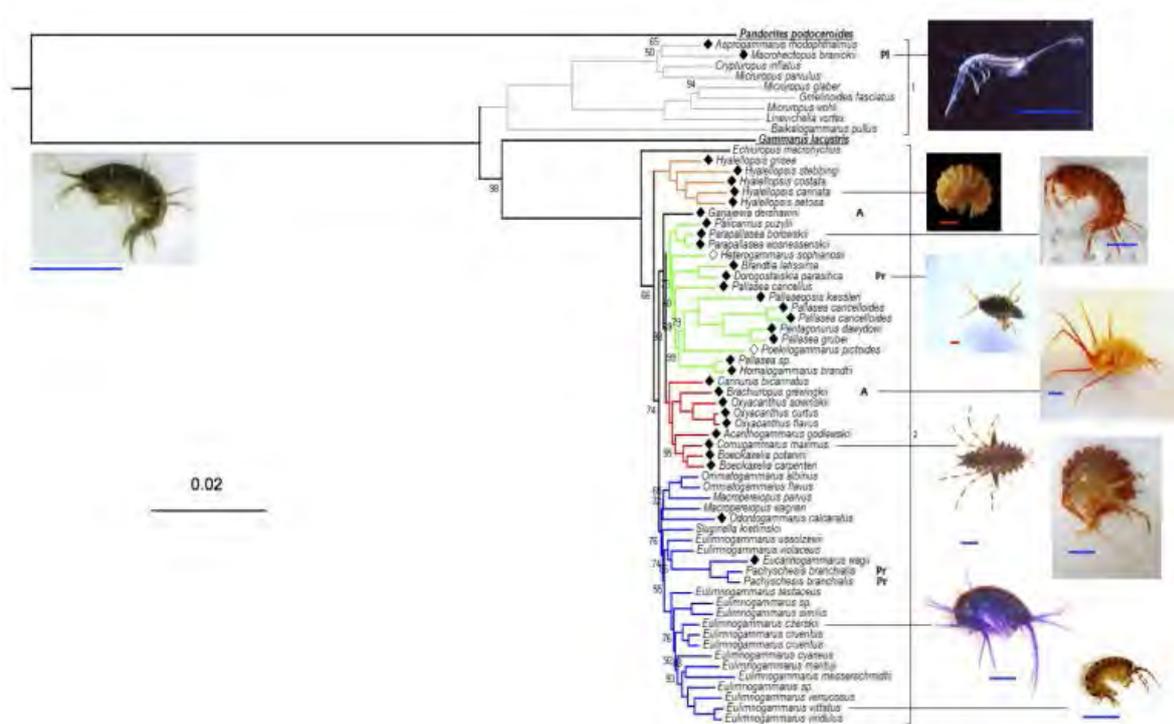


Рис. 2. Филогенетическая реконструкция радиации эндемичных амфипод озера Байкал, построенная по данным анализа транскриптома (175 COGs; ~50K sites), Micrurpoda (скобка 1) и Acanthogammaridae (скобка 2).

Naumenko S.A., Logacheva M.D., Popova N.V., Klepikova A.V., Penin A.A., Bazykin G.A., Etingova A.E., **Mugue N.S.**, Kondrashov A.S., Yampolsky L.Y. Transcriptome-based phylogeny of endemic Lake Baikal amphipod species flock: fast speciation accompanied by frequent episodes of positive selection // *Molecular Ecology*. 2017. V. 26. P. 536–553. doi: 10.1111/mec.13927. IF (WoS)= **6.086** IF(Scopus)=**5.90**

Подраздел 2.

Описан новый вид голожаберных моллюсков *Tenellia chaetoptera* sp. nov. Это первый пример симбиотической связи между моллюском (группы морских слизней) и кольчатым червем-хозяином *Chaetopterus* sp. (рис. 3). Ряд признаков внешней морфологии *Tenellia chaetoptera* sp. nov. предполагает, что он приспособлен для жизни внутри трубки червя: уплощенное тело,

латерально ориентированные цераты и ринофоры, а также широкая нога (рис. 4). Полученные нами молекулярные данные, в том числе анализ частичной последовательности митохондриального *coi* и *16s*, и НЗ ядерных генов (общая длина 1464 п.н.), свидетельствует о том, что этот вид отличается от других представителей рода *Tenellia*, а также от других фионид. Вид близок к коралловым фионидам рода *Tenellia* (ранее относился к роду *Phestilla*) по нескольким морфологическим признакам, таким как общая морфология радулы, уплощенная форма тела, а также по молекулярным данным. Вид *Tenellia chaetoptera* sp. nov. обладает уникальной биологией, его обнаружение предполагает возможность существования сходных симбиотических форм, и необходимость дополнительных исследований для выявления неизвестных видов.



Рис. 3. Два живых *Tenellia chaetoptera* sp. nov. в трубке *Chaetopterus* sp.

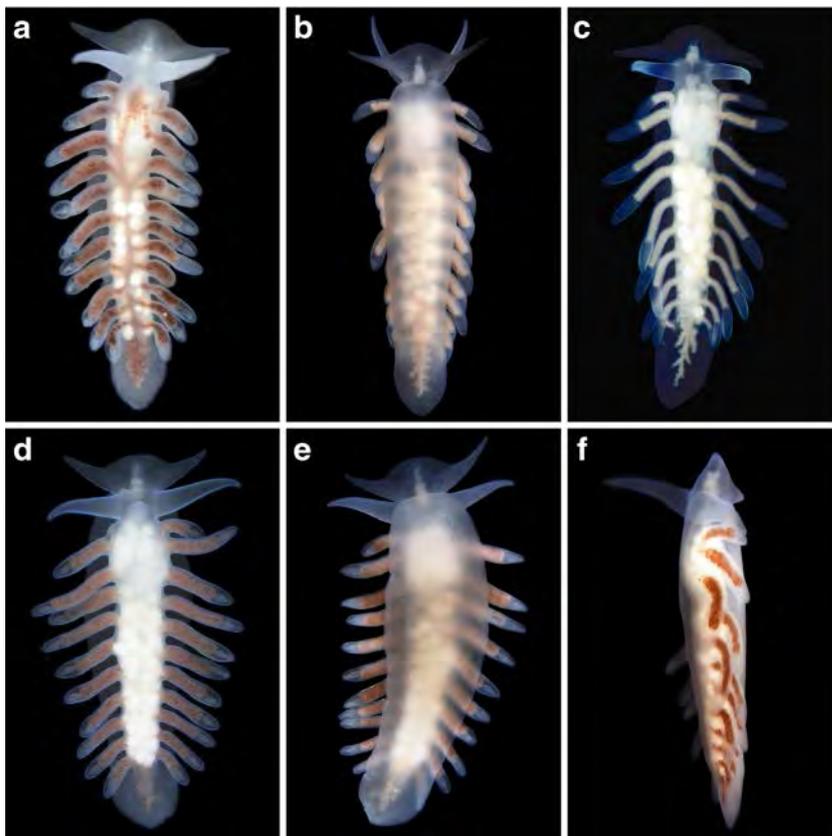


Рис. 4. *Tenellia chaetoptera* sp. nov. . а, б Голотип, Зоомузей МГУ ZMMU Лс-40,376 и другие экземпляры с-d WS8075, е-f WS8070.

Ekimova I., Deart Y., Schepetov D. Living with a giant parchment tube worm: a description of a new nudibranch species (Gastropoda: Heterobranchia) associated with the annelid Chaetopterus // Marine Biodiversity. 2017. 1-12. DOI 10.1007/s12526-017-0795-z. IF (WoS)= 1.646

Подраздел 3.

Изучена изменчивость полной последовательности контрольного региона митохондриальной ДНК (D-loop) 64 даурских сусликов *Spermophilus dauricus* из 20 локалитетов с территории России и Монголии, включая район *terra typica* (окрестности озера Торей-Нуур, Забайкалье). Образцы хранятся в Объединенной коллекции тканей диких животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных исследований ИБР РАН. Показано, что митохондриальный геном, размещенный в Genbank NCBI KR534854 ошибочно приписан даурскому суслику, на самом деле, это геном обыкновенной белки *Sciurus vulgaris*. Тем самым опровергнута гипотеза о необычном статусе даурского суслика и полифилии трибы Xerinae, базирующаяся на филогенетическом анализе Sciuridae с использованием митохондрия KR534854 (Zhang et al. 2016). (рис. 5).

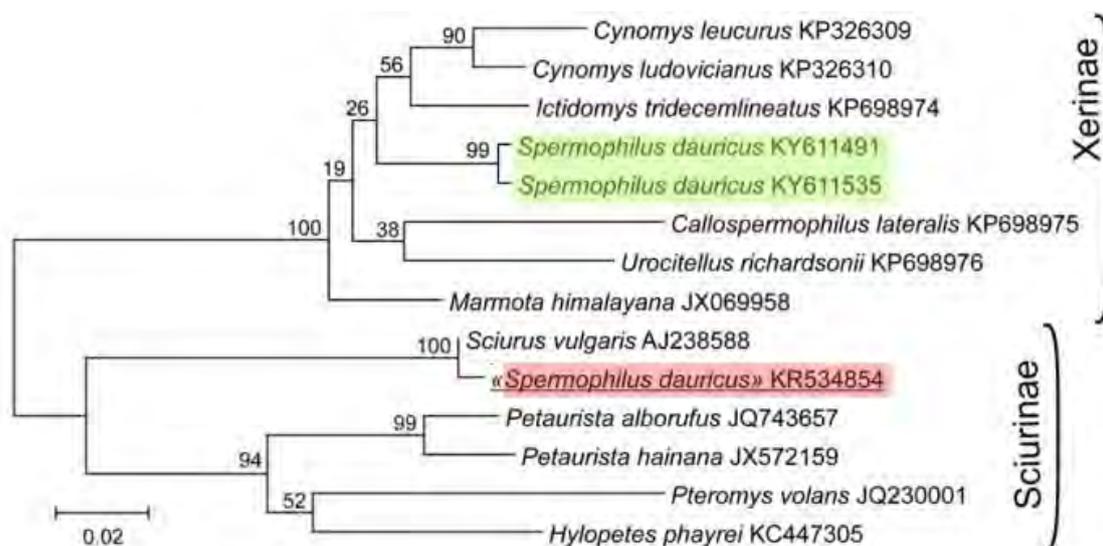


Рис. 5. Реконструкция филогенетического дерева для 12 видов беличьих методом Maximum-likelihood. Зеленым цветом выделены данные по даурскому суслику, красным - ошибочно определенного митохондрия KR534854.

Kapustina S., Brandler O. Species affiliation of the complete mitochondrial genome of Daurian ground squirrel *Spermophilus dauricus* Brandt, 1843 (Rodentia, Sciuridae) // Mitochondrial DNA Part B. 2017. V. 2(1). P. 296-297. IF (WoS) нет IF(Scopus) нет

Подраздел 4.

Несмотря на относительно небольшое видовое разнообразие, искодовые клещи рода *Dermacentor* представляют сложность для систематики и таксономии вследствие неравномерной дифференциации подродов. В нашей работе произведена предварительная оценка уровня генетической дифференциации *D. marginatus*, *D. silvarum*, *D. niveus*, *D. nuttalli* посредством анализа изменчивости нуклеотидной последовательности фрагментов митохондриального гена первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*, “Barcode region”, 643 и 562 п.н.). На NJ-дендрограмме митотипы клещей группы *marginatus*, выявленные по фрагменту 643 п. н. гена *COI*, распределились в три отчетливых кластера, из них первый и третий разделились на две линии (рис. 6). Линия I-A представлена идентичными митотипами большинства экземпляров *D. marginatus* из Зауралья и Западной Сибири. Линию I-B составили одинаковые митотипы одной особи *D. marginatus* из Алтайского края и одного экземпляра *D. silvarum* из Новосибирской обл. Второй кластер (II) представлен митотипами особей *D. niveus* из Казахстана. Его отчетливая обособленность не подтверждает мнение некоторых авторов (Estrada-Peña, Estrada-Peña, 1991; Moshaverinia *et al.*, 2009) о конспецифичности *D. marginatus* и *D. niveus*. Третий кластер (III) включает в себя две близкие линии, одну из которых составляют идентичные митотипы экземпляров *D. nuttalli* (III-A), а другую – одинаковые митотипы лесостепных клещей из Республики Алтай (III-B). Не исключено, что *D. silvarum* является политипическим, “сборным” таксоном, объединяющим несколько морфологически сходных, но существенно отличающихся генетически форм или даже видов, часть которых близка к *D. marginatus*, а другая часть – к *D. nuttalli*. Вероятна межвидовая гибридизация лесостепного клеща с *D. nuttalli* на территории горного Алтая и с *D. marginatus* в Алтайском крае. Самая сложная ситуация складывается в случае с лесостепными клещами, митотипы которых вошли в разные кластеры и линии.

Таким образом, нами показаны генетическое своеобразие и высокий полиморфизм *D. niveus*, а также наличие нескольких линий митохондриальной ДНК у прочих изученных видов клещей группы *marginatus* при неполном соответствии морфологической и молекулярно-генетической изменчивости, возможно, вследствие гибридизации.

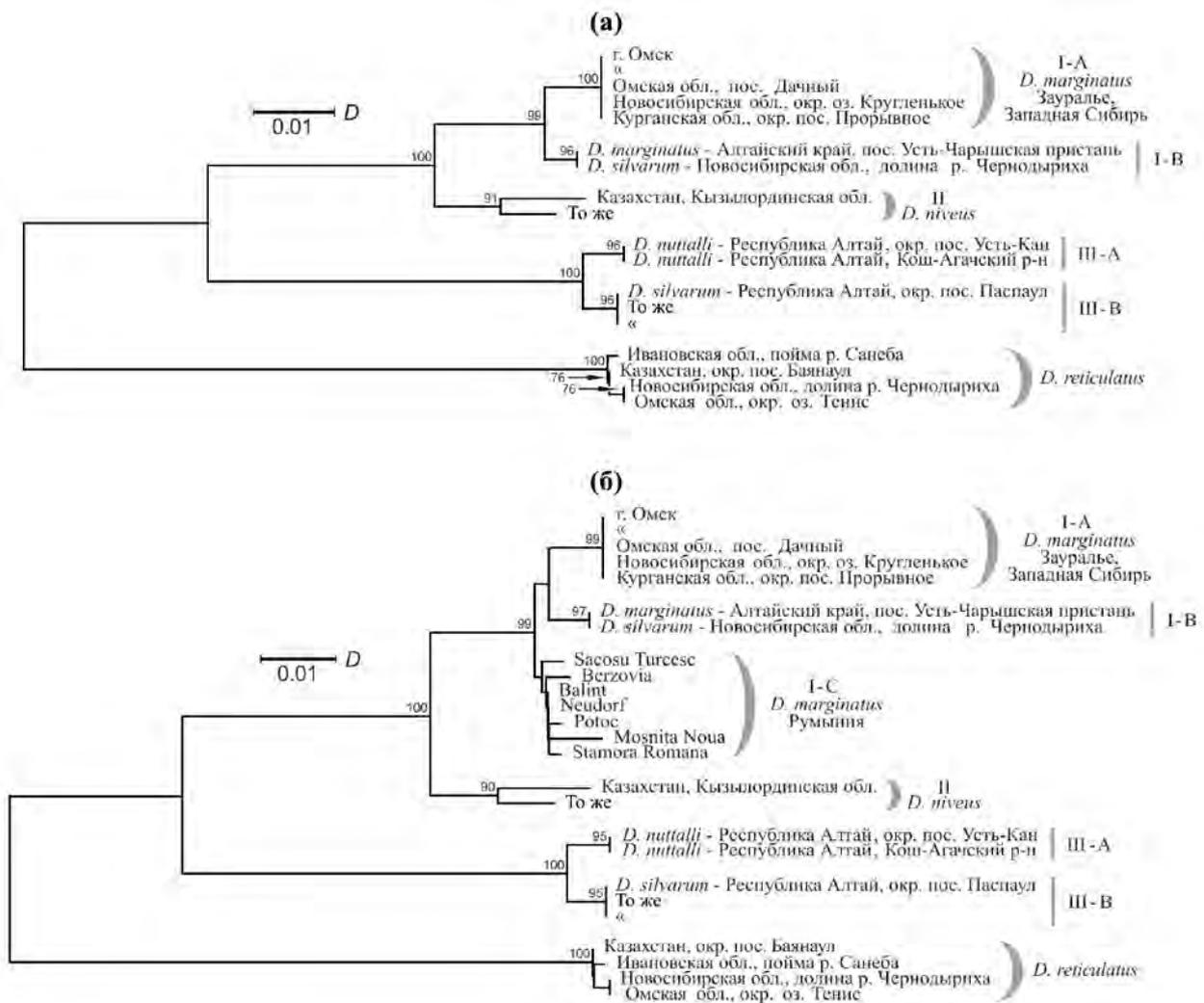


Рис. 6. Дендрограммы, построенные методом Neighbor Joining (NJ) при сравнении отдельных особей нескольких видов клещей группы *marginatus*, а также луговых клещей *Dermacentor reticulatus* по нуклеотидным последовательностям: а – фрагмента гена *COI* (643 пары нуклеотидов); б – фрагмента гена *COI* (562 пары нуклеотидов), включая взятый из базы GenBank дополнительный материал по *D. marginatus* из Румынии. В узлах ветвления дендрограмм указаны значения бутстреп-индекса, превышающие 70%. *D* – масштабная шкала генетических дистанций.

Богданов А.С., Макенов М.Т., Медяникова Л.В., Щучинова Л.Д., Якименко В.В. Изменчивость фрагментов митохондриального гена первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*) у нескольких видов иксодовых клещей группы *marginatus* (Ixodidae, Amblyomminae, Dermacentor) // Известия РАН. Серия биологическая. 2017. № 4. С. 378–383. DOI: 10.7868/S000233291703002X
(**Bogdanov A.S.,** Makenov M.T., Medyanikova L.V., Shchouchinova L.D., Yakimenko V.V. Variability of mitochondrial cytochrome oxidase first subunit gene (*coi*) fragments in several tick species of the *Marginatus* group (Ixodidae, Amblyomminae, Dermacentor) // Biology Bulletin. 2017. V. 44. № 4. P.

Подраздел 5.

Домовые мыши (род *Mus*) – гетерогенная группа, которая включает в себя множество форм, в разной степени отличающихся друг от друга как по морфологическим, экологическим, этологическим, так и по генетическим характеристикам. Вследствие её высокого разнообразия, несинхронной изменчивости морфологических и генетических признаков, а также из-за гибридизации синантропных форм, таксономическая система рода многократно пересматривалась и не является общепринятой и в настоящее время.

Нами выполнено исследование генетического разнообразия домашних мышей из нескольких популяций Восточной Европы, Закавказья, Средней Азии и Сибири по нуклеотидной последовательности фрагмента 12-го экзона аутосомного ядерного гена *BRCAl* 2331 п.н. В общей сложности проанализировано 26 экземпляров *M. musculus*, принадлежащих, по крайней мере, двум подвидам – *M. t. musculus* и *M. t. wagneri*, (*M. macedonicus* и *M. spicilegus* использованы в качестве аутгрупп). Показано наличие в пределах вида *M. musculus* двух генетически значительно разобщённых группировок, шесть экземпляров, гетерозиготных по фиксированным заменам, могут быть определены как гибридные.

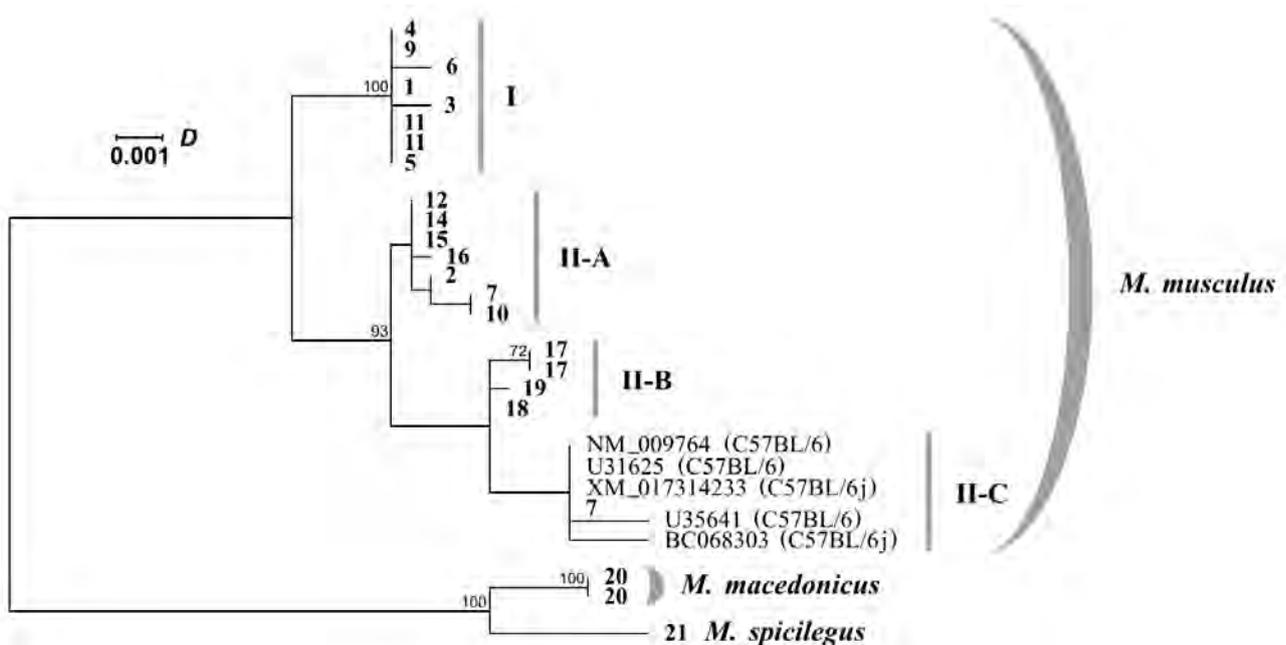


Рис. 7. ML-дендрограмма, построенная при сравнении *M. musculus*, *M. spicilegus*, *M. macedonicus* из естественных популяций, а также лабораторных мышей линий C57BL/6 и 18

C57BL/6j, по фрагменту экзона 12 гена *BRCA1*. Гетерозиготные (гибридные) экземпляры, имеющие в геноме гаплотипы I и II групп, исключены из анализа. В узлах ветвления дендрограммы указаны значения бутстреп-индекса, превышающие 70%, а справа от ветвей – пункт отлова мышей (см. следующий рисунок) (рис. 7).

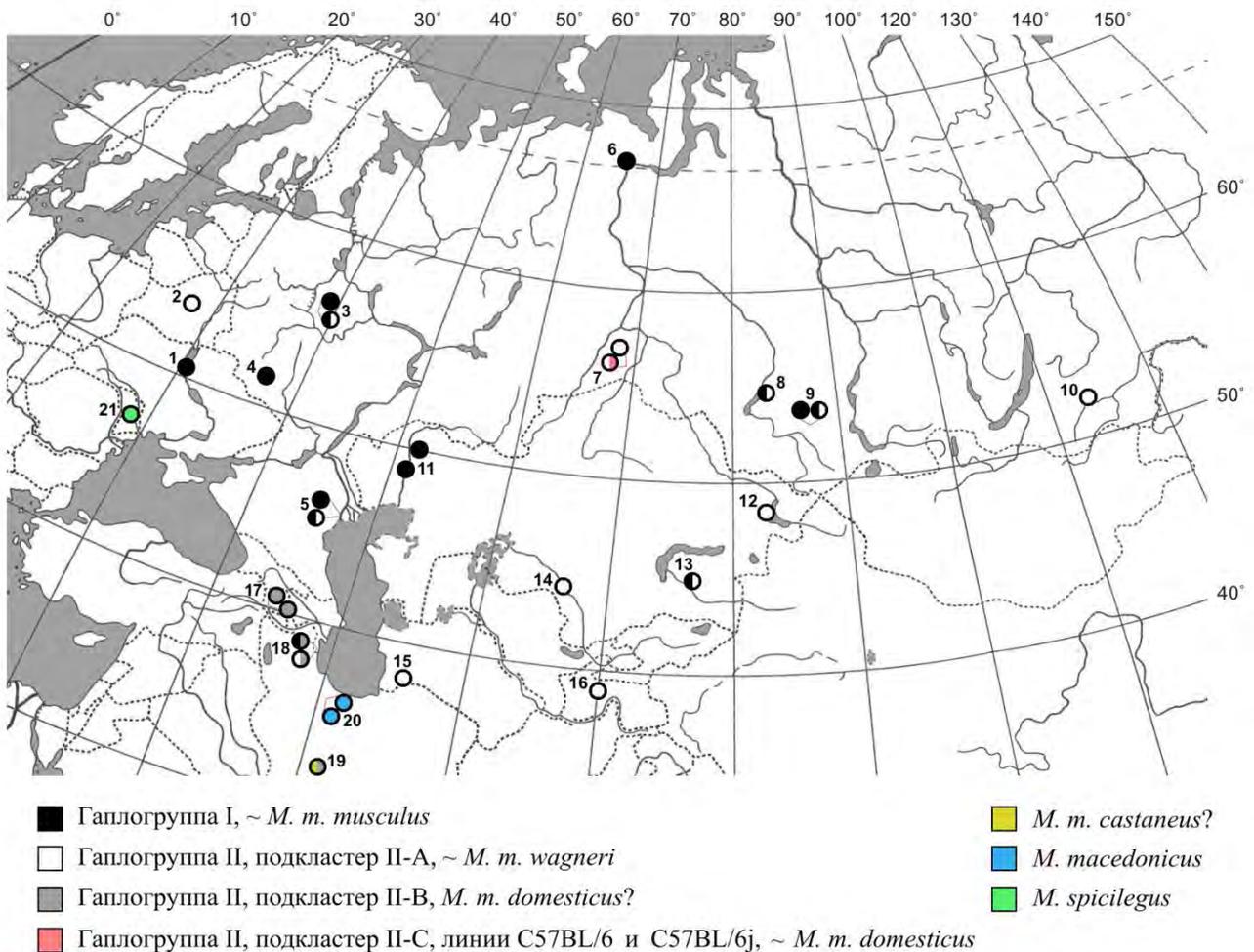


Рис. 8. Распространение гаплотипов гена *BRCA1* в исследованных естественных популяциях домашних мышей. Каждый значок соответствует одному экземпляру; двуцветные значки обозначают гетерозиготных (гибридных) мышей с разными гаплотипами гена *BRCA1*.

Гаплотипы группы I выявлены, главным образом, у домашних мышей из популяций Восточной Европы и Западной Сибири, то есть у подвида *M. m. musculus* в самом узком его понимании. Глубокое проникновение мышей с гаплотипами группы I на территорию Средней Азии с образованием гибридных экземпляров, и наоборот, мышей с гаплотипами группы II-A в Южную Сибирь и даже в Белоруссию, вероятно, является следствием как их естественной инвазии, расширяющей зону парапатрии, так и завоза различными транспортными средствами (рис. 8).

Наибольшим генетическим разнообразием отличается население домовых мышей Каспийского региона, что согласуется с предположением о его близости к центру происхождения рода *Mus* и расположении на пути древних миграций предшественников современных подвидов (Boursot et al., 1996).

Богданов А.С., Мальцев А.Н., Маликов В.Г., Darvish J. Использование фрагмента экзона 12 ядерного гена *BRCAl* как молекулярно-генетического маркера в исследовании изменчивости и дифференциации домовых мышей Восточной Европы, Закавказья, Средней Азии и Сибири // Пространственно-временная динамика биоты и экосистем Арало-Каспийского бассейна. Материалы II Международной конференции, посвящённой памяти выдающегося натуралиста и путешественника Николая Алексеевича Зарудного (г. Оренбург, 09–13 октября 2017 г.). Оренбург, 2017. С. 17–24.

Подраздел 6.

Проведено исследование генетической изменчивости ценного промыслового объекта, сибирского остра По пяти тетраплоидным микросателлитным локусам и контрольному региону митохондриальной ДНК (685 п.н., 151 особей) показано, что сибирский осетр представлен генетически хорошо различающимися группировками, соответствующим гидрографическим бассейнам: Обь-Иртышская, Байкало-Енисейская, Ленская и Колымская (рис. 9). Эти данные должны учитываться при проведении природоохранных мероприятий, а также при разведении в неволе этого ценного промыслового объекта.

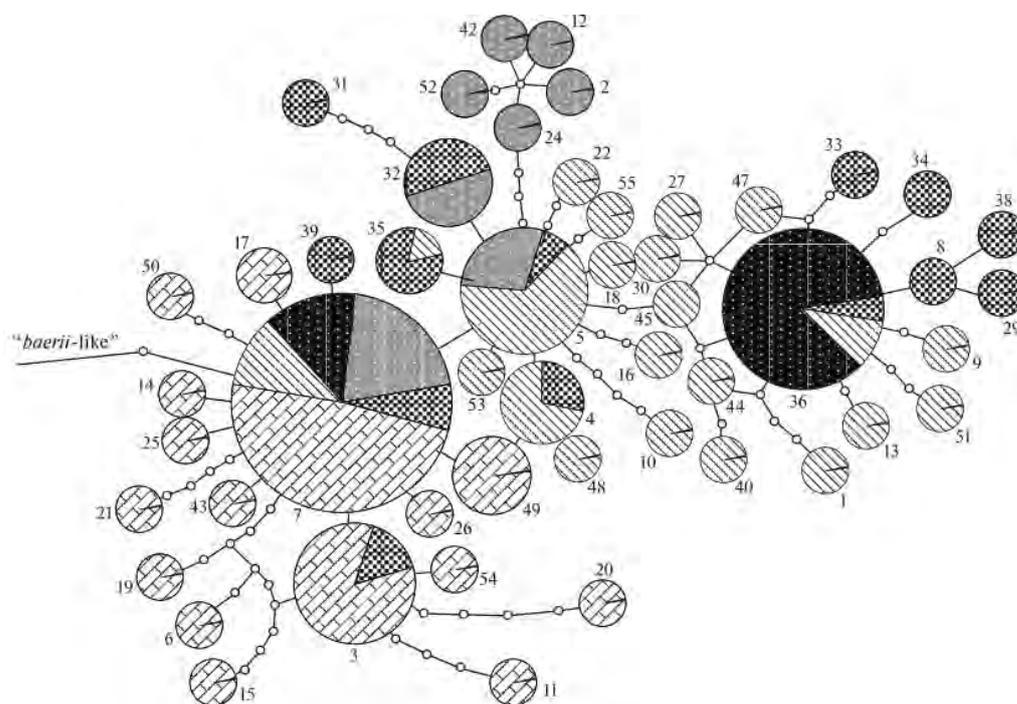


Рис. 9. Сеть гаплотипов изученных популяций сибирского осетра из рек Лена, Енисей, Колыма, Обь, озера Байкал. Номера соответствуют номерам гаплотипов.

Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Природный генетический полиморфизм и филогеография сибирского осетра *Acipenser baerii* Brandt, 1869 // Генетика. 2017. Т. 53. № 3. С. 345-355. DOI: 10.7868/S001667581703002X (Barmintseva A.E., Muge N.S. Natural genetic polymorphism and phylogeography of siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt, 1869 // Russian Journal of Genetics. 2017. V. 53. N. 3. P. 358–368. DOI: 10.1134/S1022795417030024) IF (WoS)= **0.55** IF(Scopus)=**0.49** Импакт-фактор РИНЦ 2016 =**1,005**

Подраздел 7.

Божьи коровки вида *Harmonia axyridis* являются интересным модельным объектом для изучения инвазий и их последствий для биоценозов. Вместе с тем, данная группа также интересна симбиотическими связями с различными микроорганизмами. На обширном материале из природных нативных и инвазийных популяций нами были проанализированы особенности расселения вида-хозяина и наличие эндосимбионтов. Был проведен генетический анализ образцов по нескольким маркерам. Во-первых, была проведена проверка принадлежности для жуков по митохондриальному гену *cox1*, затем все образцы были проанализированы с помощью PCR с праймерами, специфичными для эндосимбионтов *Rickettsia* и *Spiroplasma* (ген citrate synthase gene

(gltA) для *Rickettsia*, для детекции *Spiroplasma* sp., использованы фрагменты 16S RNA и 23S RNA генов). Эндосимбионты *Rickettsia* обнаружена как в нативных, так и в инвазийных популяциях *H. axyridis*, тогда как *Spiroplasma* обнаружена только в природных популяциях. Высказано предположение о том, что *Spiroplasma* может снижать инвазийный потенциал *Harmonia axyridis*. По-видимому, *Spiroplasma* является более функционально значимым эндосимбионтом для *Harmonia axyridis* в сравнении с *Rickettsia* и *Wolbachia*.

Goryacheva, I., **Blekhman A.**, Andrianov B., Zakharov I. Heritable bacterial endosymbionts in native and invasive populations of *Harmonia axyridis*. // *Biological Invasions*. 2017. V. 19. P. 493–502. DOI 10.1007/s10530-016-1298-8 IF (WoS) **2.473** IF(Scopus)=**2.71**

Заключение.

Основные результаты исследований, проведенных в 2017 опубликованы в ведущих научных журналах, в том числе из Q1 (*Molecular Ecology*). Исследования по всем группам будут продолжены, включая сбор и обработку материала, и поиск новых генетических маркеров.

Раздел 3. Изучение эволюции систем детерминации пола в различных группах животных.

Введение.

Наличие половых хромосом XX у самок и XY у самцов и гонад (яичников и семенников, соответственно) характерно для большинства млекопитающих, однако существует целый ряд видов с различными отклонениями в структуре генома (XX или X0 у самок и самцов при полной или частичной потере Y хромосомы). Половые хромосомы слепушонок *Ellobius* уникальны для млекопитающих: 5 видов имеют три типа половых хромосом: XY♂/XX♀, X0♂/X0♀ у и XX♂/XX♀, последний вариант является уникальным, не описан для других видов млекопитающих. Нам принадлежит приоритет в области изучения особенностей мейоза и детерминации пола у данной группы.

Методы.

Использованы современные молекулярно-генетические и цитогенетические методы для анализа первичной структуры ДНК, мейоза и гаметогенеза: секвенирование нуклеотидных последовательностей ряда генов каскада детерминации пола самцов и самок, иммуноцитохимические методы с использованием антител к основным белкам синапсиса хромосом, а также метод распластанных мейоцитов для изучения синапсиса и рекомбинации хромосом в профазе мейоза I и метод спредирования мейоцитов для изучения мейоза в целом. Для анализа данных использованы современные пакеты программ MEGA6, DNASTAR, MrBayes ver. 3.2 и др.

Результаты.

Проведен сравнительный анализ генетических особенностей детерминации пола и эволюции половых хромосом у слепушонок рода *Ellobius*, (Matveevsky et al., 2017). Описаны особенности профазы I мейоза для всех пяти видов слепушонок, имеющих три типа половых хромосом. Вид *Ellobius alaicus* оставался последним представителем рода слепушонок, для которого не было сведений о наличии или отсутствии гена *Sry* (*Sex-determining Region Y*). В соответствии с предыдущими исследованиями нами не было выявлено какой-либо *Sry*-подобной последовательности у самцов и самок *E. lutescens*, *E. tancrei*, *E. talpinus* и, впервые, у *E. alaicus*. Неожиданностью оказалось наличие высококонсервативного HMG box гена *Sry* не только у самцов, но и у самок *E. fuscocapillus*. Короткие фрагменты HMG box (138 п. н.) были обнаружены во всех исследованных образцах *E. fuscocapillus* за исключением одной самки, фрагменты

большей длины (203 п.н.), т.е. полный HMG box, выявлен у другой самки, причем не исключена вероятность того, что *Sry* представлен в геноме и самцов, и самок несколькими копиями и, возможно, перешел в состояние псевдогена. Судя по нашим данным по гену *Sry* и данным о делеции 14 п.н. участка TESCO гена *Sox9* у *E. fuscicapillus* (Bagheri-Fam et al., 2012), оба гена, являющиеся ключевыми для детерминации пола у плацентарных, могут оказаться не функциональными у *E. fuscicapillus*.

Для реконструкции эволюционной истории половых хромосом и филогенетической реконструкции рода *Ellobius* использовались фрагменты еще двух генов: гена фактора сперматогониальной пролиферации *Eif2s3y*, в норме локализуемого на Y хромосоме, а также его гомолога, расположенного на X хромосоме - *Eif2s3x*. Получены сопоставимые результаты для гена *Eif2s3x*, вплоть до 93-94% идентичности с соответствующим фрагментом гена *Mus musculus*, для всех видов слепушонок, кроме *E. fuscicapillus*. У этого вида короткий фрагмент одного из экзонов (162 п.н.) *Eif2s3x* имеет одну замену (A-T). Полученная нами последовательность фрагмента *Eif2s3y* имеет протяженную вставку, предположительно являющуюся интроном. По-видимому, часть интрона *Eif2s3y* (206 п. н.) у всех видов слепушонок является доместицированным фрагментом мобильного элемента SINE B2-B4, что было выявлено при анализе данного фрагмента с использованием базы данных RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>). Интронная часть *Eif2s3y* значительно отличается у всех изученных видов слепушонок, за исключением видов *E. alaicus* и *E. tancrei*. Реконструкция филогенетических отношений пяти видов слепушонок рода *Ellobius* по данным секвенирования фрагмента гена *Eif2s3y* методом байесовской оценки обратной вероятности показывает хорошую поддержку ветвления для всех видов рода *Ellobius* с четким разделением на два кластера, соответствующих признаваемым в настоящее время под родам *Ellobius* и *Bramus* (рис. 10). Вместе с тем, сравнительный анализ по экзонной части гена *Eif2s3y* не позволяет рассматривать слепушонок как монофилетическую группу.

Важно подчеркнуть, что по генам *Eif2s3x* и *Eif2s3y* нами не было выявлено различий между самцами и самками всех видов слепушонок, что неудивительно для *Eif2s3x*, но требует объяснения для *Eif2s3y*.

Полученные впервые данные, наряду с особенностями структуры кариотипов, описанных нами ранее, позволяют предположить, что в ходе эволюции слепушонок рода *Ellobius* Y хромосома была утрачена дважды и независимо в под родах *Bramus* и *Ellobius*. До того, как Y хромосома была утрачена, часть этой хромосомы была, вероятно, дублирована и затем транслоцирована на X хромосому. Такая схема объясняет наличие разных копий гена *Sry* у самок

E. fuscocapillus, а также отсутствие этого гена у других видов при наличии гена *Eif2s3y*. Следует подчеркнуть, что, хотя нами было показано наличие гена фактора сперматогониальной пролиферации *Eif2s3y* у самок четырех видов слепушонок, его функция у самок остается неизвестной. Вопрос о структурных изменениях других экзонов гена *Eif2s3y* и его функциональности является предметом отдельного исследования. Вместе с тем, изученные нами гены оказались валидными маркерами для анализа эволюции слепушонок.

Полученные не сегодняшний день данные подтверждают гипотезу о независимой эволюции половых хромосом и генов каскада детерминации пола в подродах *Ellobius* и *Bramus*.

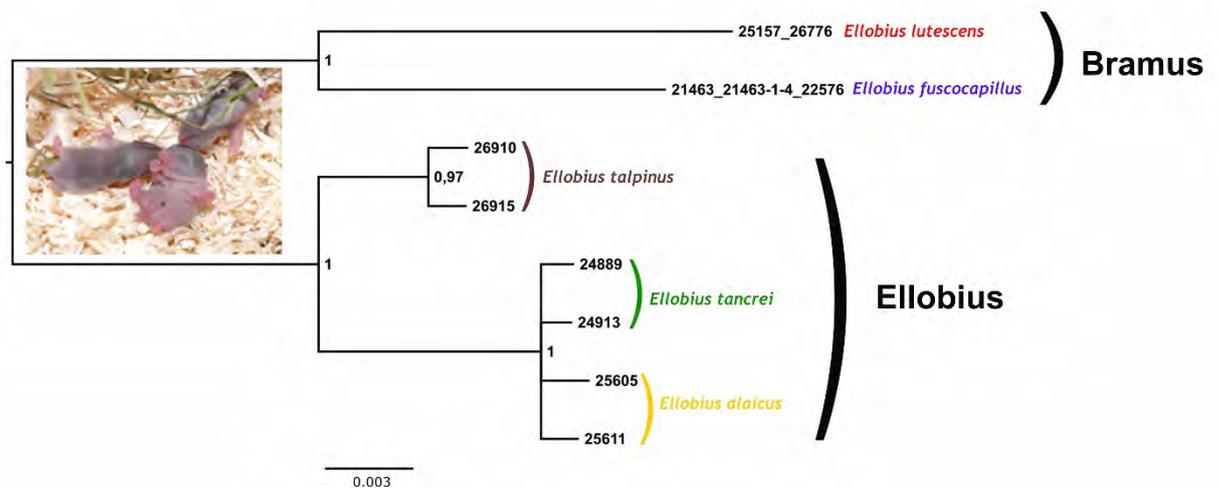


Рис. 10. Реконструкция филогенетических отношений в роде *Ellobius* на основе данных по секвенированию фрагмента гена *Eif2s3y* (использована программа MrBayes ver. 3.2).

Заключение.

Основные данные по генетике детерминации пола получены для человека и лабораторной мыши, имеющих половые хромосомы XX-XY, однако исключения, такие как различные отклонения в структуре генома (XX или X0 у самок и самцов, полная или частичная потеря Y хромосомы), заставляют усомниться в универсальности пути детерминации пола и оценить заново роль общепринятых ключевых факторов детерминации пола и выявить возможные замещающие каскады генов. Следует подчеркнуть, что исследование, проведенное на природном объекте, виде, длительное время существующем в природе, имеет несомненный приоритет перед анализом генетических взаимодействий на лабораторных объектах с искусственно изменённым геномом, такими как линии лабораторных мышей. Полученные нами данные опубликованы в рейтинговом международном журнале с открытым доступом, входящем в Q1. Реконструкции филогении по молекулярно-генетическим маркерам, наряду с анализом кариотипа и особенностями мейоза у

разных видов слепушонок заставляют усомниться в монофилии рода. Для проверки этой гипотезы нами начата работа с использованием других маркеров, в частности, митохондриального гена цитохрома *b*, а также нескольких генов, вовлеченных в каскад детерминации пола.

Matveevsky S., Kolomiets O., **Bogdanov A.**, Hakhverdyan M., **Bakloushinskaya I.** Chromosomal evolution in mole voles *Ellobius* (Cricetidae, Rodentia): bizarre sex chromosomes, variable autosomes and meiosis// *Genes*. 2017. V. 8(11). 306. doi: 10.3390/genes8110306 IF (WoS)= **3.6** IF(Scopus)=**3.62**

Раздел 4. Изучение популяционно-генетических механизмов поддержания полиморфизма мтДНК и ядерных псевдогенов митохондриального происхождения в природных популяциях у дрозофил группы *virilis*.

Введение.

Псевдогены митохондриального происхождения, или NUMT-ы, представляют собой «молекулярные ископаемые» и могут служить маркерами эволюционных событий, связанных с дивергенцией родственных видов, изменением скорости накопления изменчивости, свидетельствовать о размахе предковой изменчивости митохондриальных гаплотипов. На основе парсимониальных методов сравнения NUMT-последовательностей предложен способ оценки гаплотипического разнообразия предковых популяций и возраста этих последовательностей.

Методы.

Для выявления псевдогенов митохондриального происхождения использовали метод BLAST митохондриального генома видов *D.virilis* и *D.americana* против последовательностей ядерных скаффолдов соответствующих видов. Выравнивание NUMT-последовательностей проводили в программе MegAlign (Lasergene), оценку предковых полиморфизмов митохондриальных последовательностей проводили с учетом частоты несинонимичных замен в кодирующих фрагментах NUMT-последовательностей (возникших после переноса NUMT в ядерную хромосому), и пропорциональной доли вновь возникших синонимичных замен в соответствии с нуклеотидным составом кодирующего фрагмента и выбранной моделью замен.

Результаты и обсуждение

Анализ NUMT-последовательностей в геномах *D.virilis* и *D.americana* позволил оценить время вырождения митохондриальных последовательностей в ядерном геноме дрозофил группы *virilis*. Формальная оценка скорости накопления замен предполагает время вырождения NUMT-последовательности длиной порядка 500 п.о. от 3-х до 11 млн. лет, в зависимости от показателей геномной нестабильности в данном локусе. Тем не менее, учитывая фрагментацию последовательностей и формирование вставок и делеций, алгоритм поиска гомологий накладывает существенные «штрафы» на оценки идентичности, что может значительно сократить оцениваемое время вырождения последовательности. Интересно, что анализ тандемно расположенных дублированных NUMT-последовательностей выявил механизм конверсионных перестроек последовательностей, приводящий к восстановлению их предковой изменчивости и, таким образом, «стиранию истории» накопления изменчивости и переоценке времени их вырождения.

Заключение.

При использовании NUMT-последовательностей в качестве молекулярных маркеров эволюционных событий необходимо принимать во внимание их структурную организацию, эффекты фрагментации последовательности и конверсионной перезаписи при наличии тандемно расположенных копий.

Раздел 5. Генетические основы формирования презиготических изолирующих барьеров, на примере дрозофил группы *virilis*.

Введение.

Многообразие презиготических изолирующих барьеров характерно для симпатрически дивергирующих видов. Тем не менее, цена затрат вида на избирательное спаривание, в соответствии с оценками Коина и Орра, Гаврильца (Coyne, Orr, 2004; Gavrillets, 2005), стоит камнем преткновения на пути понимания механизмов видообразования на неразделенной территории. Предположительно, цена затрат существенно снижается при условии автоматического формирования предпочтений при выборе брачного партнера в условиях разделения популяции по адаптивным нишам. Анализ генетических основ формирования этих изолирующих механизмов позволит определить основные закономерности формирования изолирующих барьеров в случае симпатрического видообразования, подтвердить ведущую роль брачного поведения и возможность реализации ранних этапов дивергенции на основе имеющегося в популяциях полиморфизма по признакам выбора брачного партнера.

Методы.

Материалом для данного исследования являются изосамковые линии дрозофил *D.virilis* и *D.americana*, межвидовые гибриды от скрещивания данных видов, в количестве 30-и линий, по завершению изогенизации линий в течении 15-и поколений. Для родительских и гибридных линий проводилась оценка количественных признаков брачного поведения, формы копулятивного аппарата самцов и формы крыловой пластины.

Для определения, количественной оценки и формализации признаков брачного поведения использовали видеозапись ухаживания кон- и гетероспецифичных пар дрозофил данных видов, сделанных на камеру Sony HDR-SR 12E. Анализ проводили с помощью компьютерной программы Virtual Dub 1.10.3.

Копулятивные аппараты самцов препарировали тонкими стальными иглами в капле воды под бинокулярной лупой, при увеличении 12x8. От жировых структур препараты освобождали кипячением в 10%-ном растворе NaOH. Морфометрический анализ проводится по фотографиям препаратов, сделанным на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP STED.

Крылья препарировали тонкими стальными иглами, расправляли в капле смеси спирт/глицерин и сохраняли под покровным стеклом. Изменчивость признаков формы крыльев

анализировали по фотографиям препаратов с использованием методов геометрической морфометрии (программа TPS).

Локализация генов оцениваемых количественных признаков проводится с применением видоспецифических молекулярных маркеров (300 маркеров на геном), с применением метода анализа на чипах (на чипридере и чипрайтере Perkin Elmer).

Поиск молекулярных маркеров выполнялся сравнением геномов с применением программ Mauve (поиск гомологичных последовательностей) и FastPCR (поиск зондов для каждой пары гомологов).

Результаты и обсуждение

На данном этапе работы формализованы все количественные признаки близкородственных видов дрозофил группы *virilis*, используемых в экспериментах с межвидовыми гибридами. Показаны значимые различия по признакам направленной асимметрии формы крыла, формы копулятивного аппарата самцов, продолжительности и характеру элементов брачного поведения видов *D. virilis* и *D. americana*.

Видоспецифические признаки брачного поведения исследованы на нескольких видах группы *virilis*: *D. virilis*, *D. lummei* и *D. littoralis*. Последний вид представлен двумя линиями, основатели которых были выловлены в местах обитания южной и северной рас *D. littoralis*. Проведен анализ поведения ухаживания кон- и гетероспецифических пар методом видеотипирования. Конспецифические пары *D. virilis* и *D. lummei* не демонстрировали различий по длительности элементов репродуктивного поведения и их латентных периодов. В то же время, гетероспецифические пары ♀ *D. virilis* + ♂ *D. lummei* и ♀ *D. lummei* + ♂ *D. virilis* показали резкое снижение длительности всех основных элементов ухаживания, а также значимое снижение процента копуляций (рис.11). Сравнение поведения северной и южной рас *D. littoralis* выявило некоторые различия в структуре брачного ритуала, но не выявило препятствий для успешного спаривания особей северной и южной рас *D. littoralis*. Напротив, обнаружены большие различия в структуре брачного ритуала в гетероспецифических реципрокных парах *D. littoralis* + *D. virilis* и *D. littoralis* + *D. lummei*. Самцы филады *D. virilis* теряли интерес к самкам *D. littoralis* сразу же после начала ощупывания; напротив, самцы *D. littoralis* демонстрировали полный ритуал ухаживания как за самками *D. lummei*, так и за самками *D. virilis*. В то же время, все гетероспецифические пары *D. lummei* + *D. littoralis* и *D. virilis* + *D. littoralis* характеризовались очень низким процентом копуляций.

Выделены образцы геномной ДНК из 23-х изогенизированных линий от межвидовых скрещиваний и готовятся библиотеки для анализа видоспецифических маркеров на микрочипах. Обработывается методика изготовления микрочипов, применимых для метода Single-base extension (SBE) определения видоспецифических SNP-полиморфизмов. Подготовлена к печати статья по анализу признака избирательности самок и конкурентоспособности самцов дрозофил общего происхождения с разными пищевыми адаптациями.

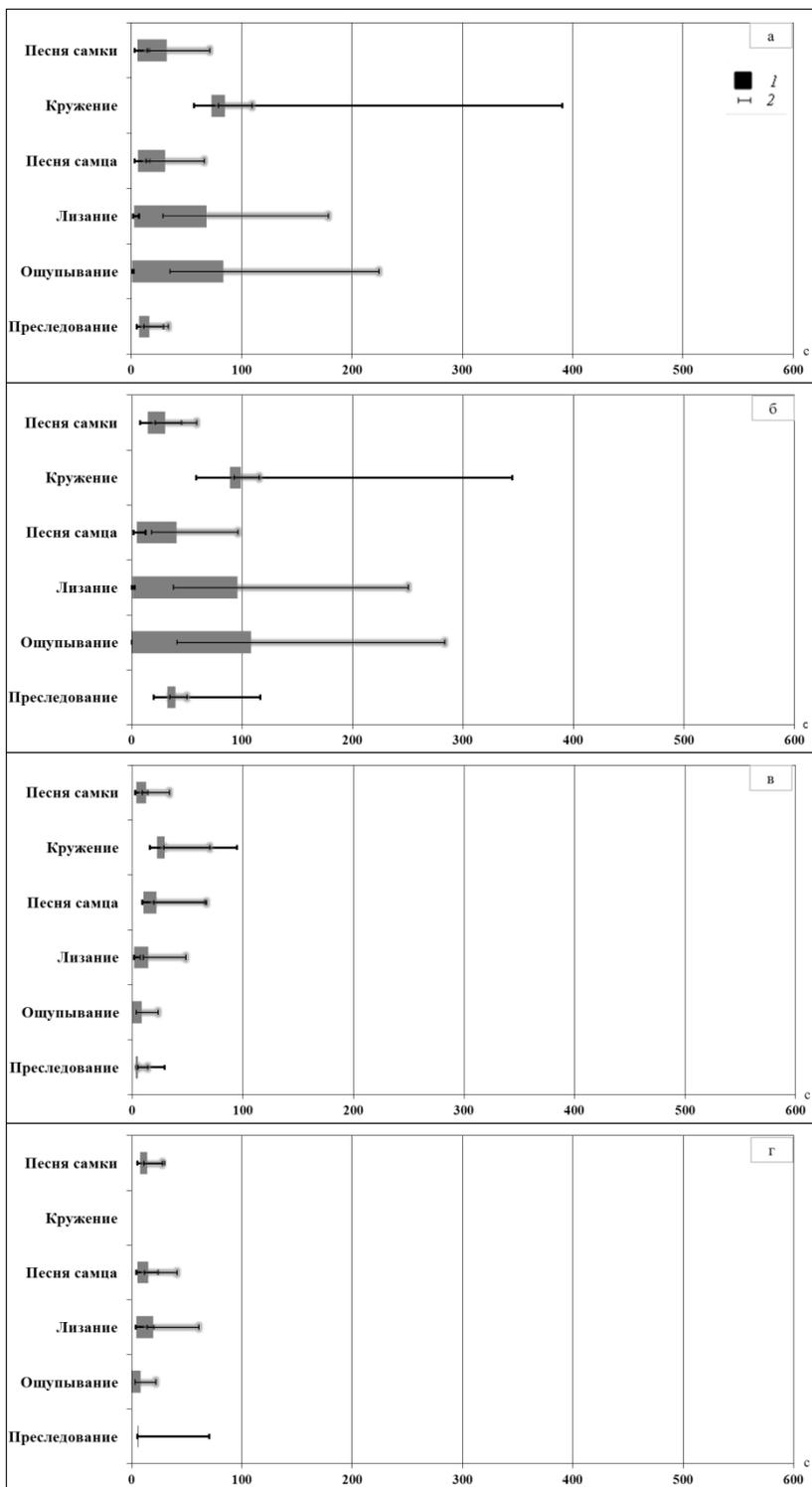


Рис. 11. Латентный период и длительность элементов брачного поведения *D. virilis* и *D. lummei*. а – ♀ *D. virilis* + ♂ *D. virilis*; б – ♀ *D. lummei* + ♂ *D. lummei*; в – ♀ *D. virilis* + ♂ *D. lummei*; г – ♀ *D. lummei* + ♂ *D. virilis*. 1 – средняя продолжительность элемента, 2 – 95%-ный доверительный интервал. Левый край прямоугольника соответствует среднему времени начала данного элемента, а правый – среднему времени его окончания. Отрезки обозначают 95%-ный доверительный интервал средней длительности элементов (подсвеченные тонкие линии) и средней длительности латентных периодов (простые толстые линии).

Заключение

Оценка роли брачного поведения в формировании изолирующих барьеров позволяет заключить, что процент успешных копуляций определялся выбором самки на самом последнем этапе ухаживания. Генетические основы видоспецифических количественных признаков – форма крыловой пластины и полового аппарата самцов, брачное поведение, будут установлены на очередном этапе исследования.

Раздел 6. Генетика агрессивности.

Введение.

В предыдущих исследованиях было показано, что признаки агрессивности в пределах нормы реакции для каждого социума находятся под контролем генов AR, HTR1A, HTR2A, DRD2, взаимодействия пары генов DAT1-COMT. Тем не менее, суммарно эти гены объясняют не более 20% изменчивости по признакам агрессивного поведения, тогда как общие оценки наследуемости этих признаков составляют порядка 70%. Для выявления новых генов, участвующих в контроле признаков агрессивного поведения, было предпринято кроссгеномное исследование этих признаков на двух выборках мужчин армянской национальности и славянской национальности.

Методы

Использованы современные методы подбора праймеров по базе данных «1000 GENOMES» для мультиплексной панели с применением веб-инструмента AmplySeq и NGS-секвенирования на приборе Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) по всем подобранным 250-и парам праймеров. Генотипирование образцов проводилось с применением геномного браузера IGV. Для оценки признаков агрессивности и когнитивных способностей применяли соответствующие тесты (Buss и Perry и др.). Уровень тестостерона и эстрогена в крови определяли с помощью наборов DELFIA Testosterone и DELFIA Estradiol.

Результаты и обсуждение

Проанализированы выборки мужчин армянской национальности (г.Ереван, 40 человек) и славянской национальности (студенты и аспиранты МГУ и РГГУ, 20 человек) по признакам агрессивности, когнитивным способностям, гормональному фону и антропометрическим показателям. Методом NGS-секвенирования выявлены 250 молекулярных маркеров, равномерно распределенных по геному. На основании полученных данных проводится полногеномное ассоциативное исследование (Genome Wide Association Study – GWAS) всех проанализированных признаков.

Заключение

Обе выборки генотипированы по большинству маркеров, проводится работа по выявлению статистически значимых связей маркеров и анализируемых признаков.

Раздел 7. Исследование онтогенетических механизмов морфологической диверсификации пучка видов: сравнительный анализ онтогенетических каналов (крупные африканские усачи).

Введение.

Долгое время аллопатрическое видообразование считалось основным, если не единственным, механизмом формирования новых видов. Однако в последние годы было накоплено множество свидетельств появления новых видов без географической изоляции. Одними из наиболее ярких примеров симпатрического видообразования являются пучки видов, возникшие в результате адаптивной радиации и отличающиеся высокой степенью морфологического разнообразия. В ряде случаев темпы морфологической и экологической диверсификации форм столь быстры, что к ним применяется термин «взрывное видообразование» (Sullivan et al., 2002). При этом темпы накопления генетических различий между формами значительно отстают от темпов формирования морфологических различий (Turgeon et al., 1999; Осинов, 2002; Сиделева, 2010), что наводит на мысль о ведущей эволюционной роли онтогенетических изменений (Parsons, Albertson, 2009; Concannon, Albertson, 2015; Powder et al., 2015; Santos-Santos et al., 2015; Pabic et al., 2016). В связи с этим, изучение онтогенетических механизмов, лежащих в основе стремительной морфологической диверсификации, стало актуальной задачей современной эволюционной биологии.

Одними из наиболее ярких примеров взрывного симпатрического видообразования являются озерные пучки видов лучеперых рыб (Голубцов, 2010). В частности, последние годы опубликовано множество работ, посвященных путям и механизмам формирования фенотипического разнообразия в пучках видов Африканских и Американских цихлид. Показаны морфологические, экологические, поведенческие, физиологические, онтогенетические и другие различия между симпатрическими видами цихлид. Определены основные генетические преобразования, произошедшие в ходе их эволюции (Albertson et al., 2003; Seehausen et al., 2008; Hulsey, 2009; Parsons, Albertson, 2009; Schwarzer et al., 2011; Wagner et al., 2012; Brawand et al., 2014; Parsons et al., 2014; Concannon, Albertson, 2015; Koblmuller et al., 2015; и другие). В настоящий момент особый интерес вызывают молодые пучки видов, в которых процесс формообразования находится на ранних этапах, что позволяет обнаружить и изучить триггерные микроэволюционные механизмы (Kusche et al., 2015; Kautt et al., 2016, Fruciano et al., 2016; A.Meyer et al., https://www.researchgate.net/profile/Axel_Meyer). К таким пучкам можно отнести монофилетический пучок видов крупных Африканских усачей, сформировавшийся в оз. Тана в течение последних 15 000 лет и состоящий из 15 форм/видов, различающихся по своей экологии и

морфологии (Nagelkerke, Sibbing, 1998; Nagelkerke, Sibbing, 2000; De Graaf et al., 2008; De Graaf et al., 2010). Формы, входящие в состав пучка, не имеют ярко выраженных генетических различий, о чем свидетельствуют исследования ядерного и митохондриального геномов (Berrebi, Valushok, 1998; De Graaf et al., 2010), а также отсутствие механизмов постзиготической изоляции (Держинский и др., 2007).

Предполагается, что основную роль в формировании наблюдаемого морфологического разнообразия танского пучка видов играют механизмы, приводящие к изменению хода предкового онтогенеза и, как следствие, к изменению направления предкового онтогенетического канала. В качестве наиболее вероятного механизма подобных изменений рассматривают гетерохронии, изменения темпов и сроков онтогенетических процессов, приводящие к серьезным морфологическим последствиям. Изначально данное предположение базировалось на сравнении онтогенетических траекторий относительных размеров отдельных краниальных окостенений некоторых видов усачей (Mina et al., 2001; Mina, Golani, 2004). Однако в данных работах использовались усачи, выловленные в природе. В результате, исследователи могли лишь предполагать видовую принадлежность сравниваемых рыб, особенно особей, не достигших половой зрелости что не позволяло сравнить ранние этапы онтогенеза.

В связи с этим, представляется актуальным проведение экспериментальных работ, которые позволят: 1) сравнить онтогенетические траектории потомства, полученного от производителей с установленной видовой принадлежностью, 2) определить степень наследуемости видоспецифических признаков усачей, 3) определить фенокритические периоды в их развитии, и 4) обнаружить гетерохронии, определяющие дефинитивную морфологию усачей.

Кроме того, выращивание потомства разных видов усачей в стандартизированных экспериментальных условиях позволит провести оценку их морфогенетического гомеостаза, стабильности развития. Предполагается, что стабильность развития может значимо меняться в зависимости от характера и продолжительности микроэволюционных преобразований. Так, при действии стабилизирующего отбора уровень стабильности развития растет в результате усиления канализованности развития. При действии направленного отбора предполагается обратный эффект (Moller, Swaddle, 1997). Таким образом, стабильность развития может являться одним из показателей степени генетической коадаптации симпатрических форм и свидетельствовать о характере и продолжительности хода микроэволюционных преобразований. Однако данные предположения остаются по большей части гипотетическими (Dongen, 2006; Klingenberg, 2015). Пожалуй, единственный тезис не вызывающий сомнений у большинства исследователей, состоит в том, что показатели стабильности развития могут являться мерой стресса, испытываемого

организмом в ходе развития в результате отклонения внутренних и внешних факторов от оптимума, а усредненные показатели отдельных особей могут отражать общее состояние популяции. (Moller, Swaddle, 1997; Gordon, 1999; West-Eberhard, 2003; Dongen, 2006; Klingenberg, 2015).

Нам представляется актуальным оценить и сравнить стабильность развития в природных популяциях разных видов танских усачей. Это позволит оценить, изменяется ли стабильность развития в ходе микроэволюционных преобразований. Анализ стабильности развития рыб, выращенных в стандартизированных условиях, покажет, что лежит в основе изменений морфогенетического гомеостаза: условия среды или снижение генетической коадаптации у недавно сформировавшихся видов. Кроме того, анализ онтогенетических серий позволит ответить на вопросы, как изменяются показатели стабильности развития в ходе онтогенеза. Таким образом, исследование стабильности развития танских усачей позволит верифицировать несколько гипотез относительно природы нарушения онтогенетического гомеостаза при видообразовании.

Методы

Учитывая, что основные морфологические различия танских усачей связаны с различиями формы, использование методов геометрической морфометрии является наиболее адекватным подходом для описания фенотипического разнообразия, наблюдаемого в пучке видов, оценки внутри- и межвидовой изменчивости усачей и выявления видоспецифических признаков. Предварительное сравнение формы головы и тела нескольких видов усачей методами геометрической морфометрии уже было проведено нашей группой (Шкиль и др., 2015). В ходе настоящих исследований нами расширен список сравниваемых видов и особей в анализируемых выборках, а также проводится оценка внутри- и межвидовой изменчивости, что не делалось ранее. Оценка формы головы и тела проводится для следующих видов усачей: *L. intermedius*, *L. brevicephalus*, *L. megastoma*, *L. crassibarbis*, *L. macrophthalmus*, *L. platydorsus*, *L. truttiformais*. Всего было обработано и проанализировано более 250 цифровых изображений взрослых особей усачей, выловленных в оз. Тана и его притоках в период 2007-2015 гг. Для сравнительно-морфологического анализа использована ранее отработанная схема реперных точек (Шкиль и др., 2015). В качестве основного метода, позволяющего оценить изменчивость формы головы и тела усачей, используется метод главных компонент (Principal component analysis). Определение видоспецифических различий формы проводится с использованием дискриминантного анализа (Discriminant function analysis) и анализа канонических переменных (Canonical variate analysis). Статистическая обработка данных проводится с использованием специализированных программных пакетов tpsRelw (www.life.bio.sunysb.edu/morph/index.html) и MorphoJ 1.06d

(http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm), позволяющих формализовать и визуализировать обнаруженные различия в форме исследуемых объектов (Klingenberg, С., 2011, 2013).

Результаты

В 2017 г. сравнительный анализ общей морфологии взрослых особей семи видов танских усачей: *L. intermedius*, *L. brevicephalus*, *L. megastoma*, *L. macrophtalmus*, *L. crassibarbis*, *L. platydorsus*, *L. truttiformis*, выловленных в природе (Рис. 12). В результате для каждого из изучаемых видов были установлены видоспецифические признаки - признаки формы головы и тела (Рис. 13). Ранее данные признаки использовались в качестве диагностических для танских усачей, но не имели адекватного количественного выражения, что вызывало определенные трудности при их применении. Созданная нами система реперных точек позволяет гораздо более точно диагностировать видовую принадлежность взрослых рыб, что необходимо для проведения исследований биологии и экологии данных видов, а также работ по сохранению и восстановлению численности природных популяций. Последнее является крайне актуальной задачей, т.к. подавляющее большинство видов танских усачей являются эндемиками данного озера, находящимися под угрозой исчезновения, и включены в Красный список МСОП (www.iucnredlist.org).

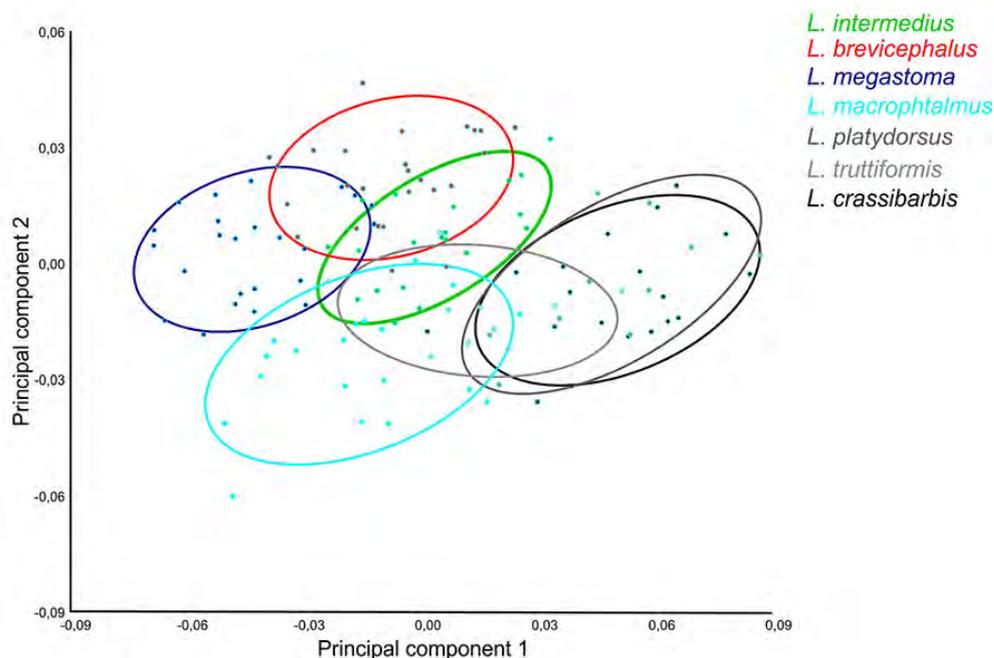


Рис. 12. Распределение взрослых особей танских усачей в пространстве 1 и 2 главных компонент.

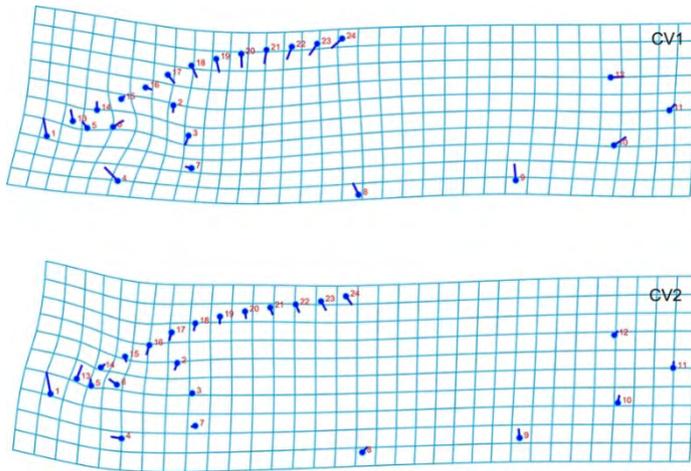


Рис. 13. Трансформация формы усачей в пространстве главных компонент.

Разработанная система реперных точек позволила провести предварительный анализ изменения морфологии (форма головы и тела, стандартная длина) исследуемых видов усачей в онтогенезе и построить онтогенетические каналы (Рис. 14). Предварительный анализ онтогенетических изменений общей морфологии рыб показал, что часть видов *L. intermedius*, *L. breviscephalus*, *L. crassibarbis* приобретают взрослую морфологию уже на ранних этапах развития, в возрасте полгода-год. В тоже время, фенотипические признаки *L. megastoma* достигают взрослого состояния значительно позднее, в возрасте 3-4 лет.

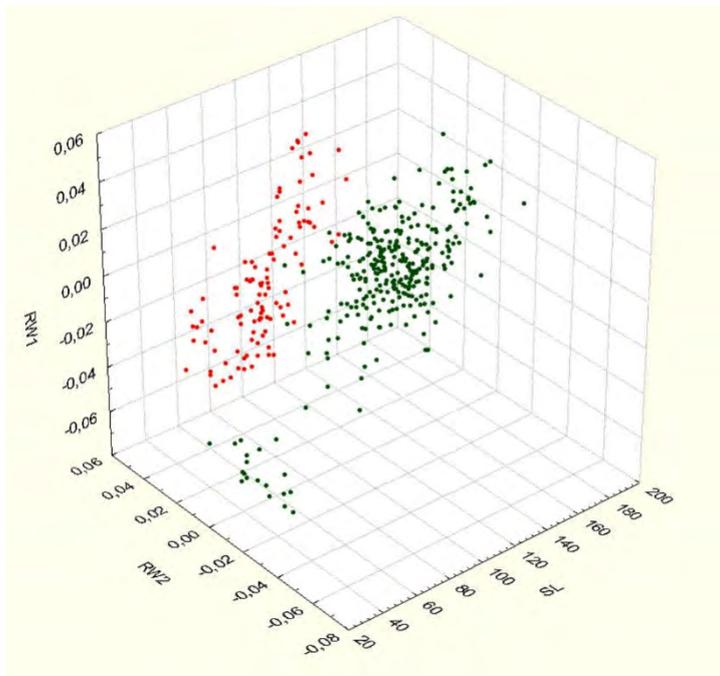


Рис. 14. Онтогенетические каналы *L. intermedius* (красный) и *L. macrophthalmus* (зеленый). SL- стандартная длина. RW1, RW2 – главные компоненты.

В результате работ по сравнению морфологии различных краниальных окостенений усачей положено начало формирования коллекции цифровых изображений остеологических препаратов. В дальнейшем, оцифрованные изображения костей черепа и общей морфологии танских усачей будут выложены в сеть для общего доступа.

Предварительные результаты сравнительно-морфологического анализа краниальных окостенений показали, что далеко не все из них несут видоспецифические признаки формы. Часть костей демонстрирует внутривидовую изменчивость, значимо превышающую межвидовую. К ним можно отнести кости верхней и нижней челюстей (*dentale*, *maxillare*, *praemaxillare*) и кости жаберной крышки (*suboperculum*, *interoperculum*, *operculum*). К костям, проявляющим значимую межвидовую изменчивость можно отнести преорбитальный отдел нейрокраниума (Рис. 15), *quadratum*, *hyomandibulare*, *pharyngeale*. Примечательно, что признаки формы костей нижней и верхней челюсти (*dentale*, *praemaxillare*, *maxillare*) не демонстрируют ярко выраженных видоспецифических различий, не смотря на различия в экологии и питании исследуемых видов, а также положении их рта.

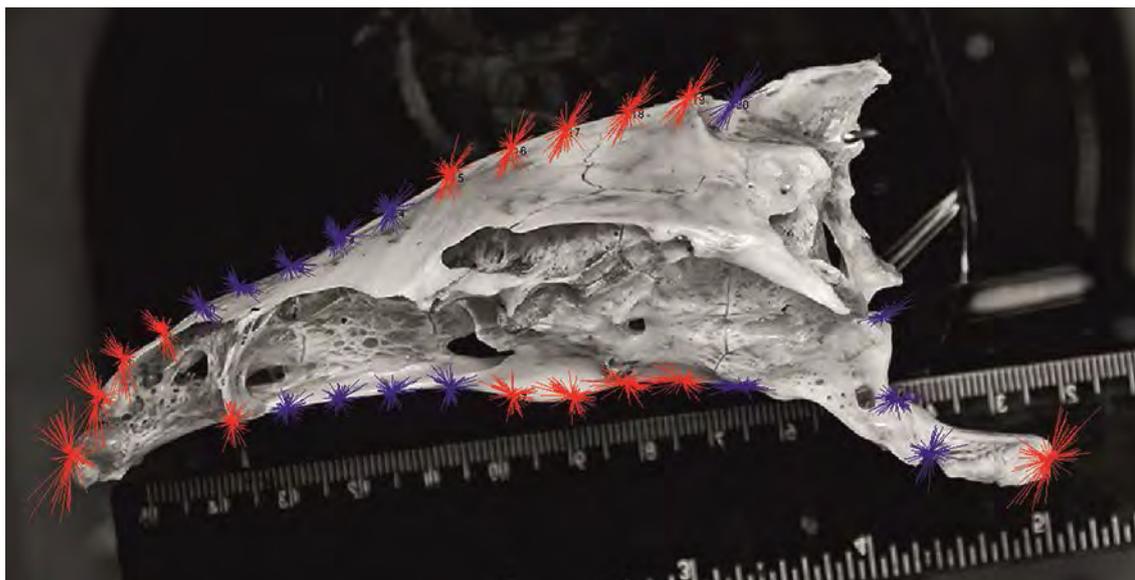


Рис. 15. Отделы нейрокраниума, демонстрирующие межвидовые различия (выделены красным) и не демонстрирующие межвидовых различий (выделены синим).

Проведены подготовительные работы для сравнительно-морфологического анализа краниальных окостенений на разных этапах онтогенеза. Отобраны и подготовлены к фотографированию остеологические препараты трех видов усачей, выращенных в искусственных условиях до достижения половой зрелости.

Помимо сравнения общей морфологии и формы отдельных окостенений у разных видов усачей, начаты работы по оценке уровня флуктуирующей асимметрии. Проведено межвидовое

сравнение стабильности развития меристических и части пластических признаков у взрослых особей трех видов усачей, выловленных в природных популяциях. К настоящему моменту не обнаружено статистически значимых межвидовых различий в уровне стабильности развития исследуемых видов (Рис. 16).

Часть результатов работы вошла в опубликованную в 2017 г. году статью (Shkil F.N., Dzerzhinskii K.F., Belay Abdissa, Borisov V.B., Wondie Zelalem, Kapitanova D.V., Mesfin Tsegaw, Smirnov S.V. 2017. Notes on the breeding of large Tana barbs (*Labeobarbus*) in nature and laboratory. *Ethiopian Journal of Biological Sciences*, 16, pp. 149-170), а также была представлена в виде устных докладов на III международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции» (16-20 октября 2017 г. Москва). Тезисы докладов были опубликованы:

Капитанова Д.В., Шкиль Ф.Н., Лазебный О.Е., Смирнов С.В. 2017. Генетические и онтогенетические аспекты морфологического разнообразия крупных африканских усачей р. *Labeobarbus* (=Barbus) (Cyprinidae; Teleostei) оз. Тана, Эфиопия. Материалы III международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции». 16-20 октября 2017 г. Москва. М: ГДМ, 2017. С. 76.

Шкиль Ф.Н., Борисов В.Б., Селезнев Д.Г., Смирнов С.В. 2017. Онтогенетическая последовательность как носитель филогенетической информации. Материалы III международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции». 16-20 октября 2017 г. Москва. М: ГДМ, 2017. С. 368.

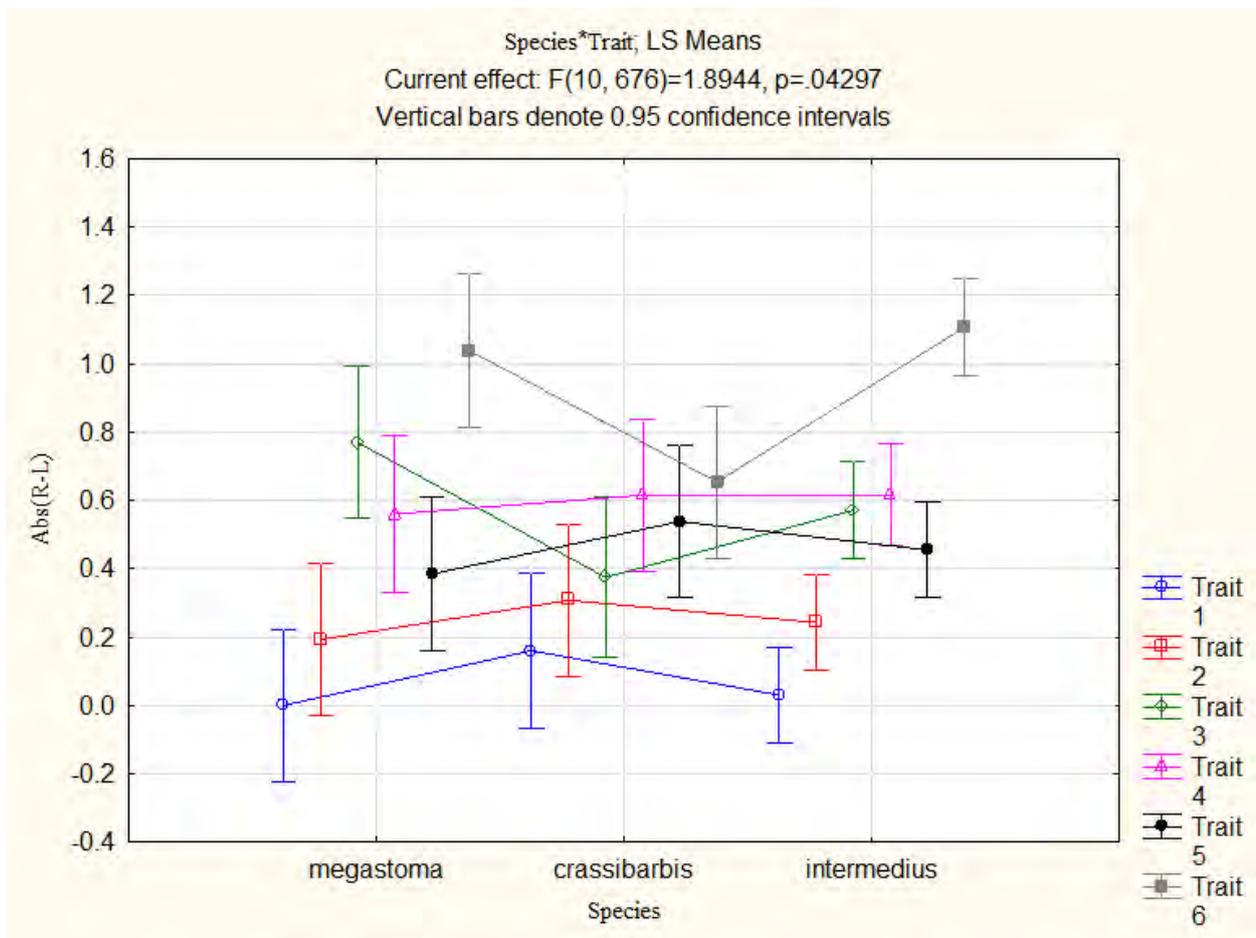


Рис. 16. Показатели стабильности развития пяти меристических признаков трех видов усачей. megastoma – *L. megastoma*, crassibarbis – *L. crassibarbis*, intermedius – *L. intermedius*.

Заклучение

Методами геометрической морфометрии проведено сравнение общей морфологии семи симпатрических видов усачей р. *Labeobarbus* (Cyprinidae; Teleostei), входящих в состав пучка видов оз. Тана (Эфиопия). Проведена оценка внутри- и межвидовой изменчивости формы головы и тела усачей. Полученные количественные характеристики формы позволили применить статистические методы и выделить ряд видоспецифических признаков формы головы и тела, которые могут рассматриваться в качестве диагностических для данных видов.

Проведен предварительный анализ изменений морфологии усачей в ходе их развития, и воссозданы онтогенетические каналы для нескольких исследуемых видов. Анализ онтогенетических каналов выявил различия в сроках формирования взрослой морфологии у разных видов усачей, и показал, что многие видоспецифические морфологические признаки формируются на ранних этапах онтогенеза.

Проведена обработка остеологических препаратов черепов различных видов танских усачей. В результате, положено начало формирования коллекции цифровых изображений остеологических препаратов эндемичных усачей оз. Тана, которая в последствии будет выложена в сеть в открытом доступе. Начат сравнительный анализ морфологии отдельных краниальных окостенений усачей. Используются методы геометрической морфометрии и классической морфометрии. В результате предварительного анализа установлено, что часть костей черепа демонстрирует крайне высокий уровень внутривидовой изменчивости, не позволяющий выявить значимые межвидовые различия. Остальные краниальные окостенения несут видоспецифические признаки формы. Начата подготовка материала по оценке изменения формы отдельных краниальных окостенений в онтогенезе изучаемых видов.

Начаты работы по оценке уровня стабильности развития симпатрических видов усачей. На данном этапе установлено, что счетные (меристические) признаки черепа демонстрируют флуктуирующую асимметрию. Однако, значимых межвидовых различий в уровне стабильности развития не обнаружено. Пластические признаки нейрокраниума также демонстрируют флуктуирующую асимметрию, но значимые межвидовые различия по ее уровню на данном этапе не обнаружены.

Раздел 8. Анализ значимости онтогенетических изменений в возникновении фенотипического разнообразия в процессах видообразования. Разработка подходов для практической оценки механизмов формообразования, как основы для обеспечения сохранения биоразнообразия и рационального природопользования

Введение

Одним из главных направлений эволюционной биологии является изучение начальных этапов эволюционных преобразований – микроэволюционных процессов, протекающих внутри вида и приводящих к формированию различий между организмами и популяциями, возникновению внутривидовых группировок и новых видов. В этих исследованиях важнейшее место занимает вопрос о механизмах возникновения фенотипического разнообразия в процессах видообразования. Эти процессы удобно изучать на широко распространенных полиморфных видах, представленных различающимися географическими группировками и симпатрическими формами.

К числу таких видов относится арктический голец *Salvelinus alpinus* (L.) - комплексный вид семейства лососевых, известный необычайной изменчивостью и высоким полиморфизмом. Он образует множество географических алло- и симпатрических форм, значительно различающихся по целому ряду параметров и признается одним из самых изменчивых позвоночных на Земле. В связи с этим арктический голец является одним из наиболее перспективных модельных объектов эволюционных, экологических и онтогенетических исследований. Этот вид имеет широкий циркумполярный ареал, охватывающий арктические побережья Европы, Азии и Северной Америки, а также встречается в некоторых более южных горных областях – в частности, в горах Сибири.

В течение ряда лет нами проводится изучение путей и механизмов формообразования на примере арктических гольцов Сибири. Эти работы включают оценку морфологического, экологического и генетического разнообразия их аллопатрических и симпатрических группировок, выяснение их филогенетических связей, определение степени генетических различий и репродуктивной изоляции симпатрических, парapatрических и аллопатрических форм и роли симпатрического и аллопатрического формообразования в их происхождении.

В 2017 г. основными направлениями исследований были изучение разнообразия нерестовых стратегий и конкретных особенностей нереста внутривидовых форм арктического гольца из разных популяций Забайкалья, приводящих к возникновению репродуктивной изоляции, изучение раннего онтогенеза разных форм и их гибридов в экспериментальных условиях на

молоди, полученной путем искусственных скрещиваний, а также продолжение филогеографических исследований.

Материал и методы

Гольцов отлавливали жаберными сетями. У рыб определяли пол, стадию зрелости, плодовитость, диаметр зрелых ооцитов, вычисляли гонадо-соматический индекс, определяли уловы на единицу промыслового усилия на разных глубинах до, во время и после нереста. При помощи дночерпателя брали пробы грунта на нерестилищах. Для определения температурных режимов озер в районах нерестилищ на разной глубине на срок до года выставляли термодатчики, фиксировавшие температуру каждые 2-6 часов. С использованием эхолота и GPS-навигатора составляли карты глубин в районах нерестилищ. Для изучения событий раннего онтогенеза у гольцов брали живую икру, которую оплодотворяли сухим способом и доставляли в Москву, где в помещенных в аквариумы плавучих садках при температуре 5°C проводились ее инкубация, а затем при той же температуре в пластиковых кюветах и в аквариумах - подращивание молоди с периодическим отбором проб. Генетические анализы проводили по стандартным методикам.

Результаты и обсуждение

В 2017 г. было продолжено изучение закономерностей формирования фенотипического разнообразия у животных на примере арктического гольца. В рамках работ по изучению механизмов возникновения репродуктивной изоляции его внутривидовых форм проведены исследования экологических особенностей их размножения в нескольких труднодоступных озерах Забайкалья.

Завершены исследования размножения глубоководной карликовой планктоноядной формы гольца в системе соединяющихся озер Большое и Малое Леприндо. Ранее нами было обнаружено, что в обоих озерах карликовые гольцы нерестятся в профундальной зоне на глубине 25-55 м в разные сроки. В первом нерест летний, а во втором сильно растянутый, с зимне-весенним пиком, и требуются ежемесячные наблюдения, чтобы полностью выяснить его динамику. Такие наблюдения были завершены 2017 г. сбором данных по недостающим месяцам, и было продемонстрировано, что нерест в этом озере продолжается с января по июль с пиком в январемарте. В июле-августе были также собраны новые данные по летнему нересту в оз. Бол. Леприндо. Помимо этого были привлечены литературные сведения об осеннем прибрежном нересте исчезнувшей в этих озерах крупной формы гольца. В результате обобщения всех данных показано, что в них в ходе эволюции сформировалась уникальная комбинация симпатрических и парapatрических форм гольца с летним, осенним и зимне-весенним нерестом, происходящим на

разных глубинах, на разных нерестовых субстратах и при разных температурных режимах. Эти различия привели к возникновению репродуктивной изоляции и генетических различий между формами.

В системе озер – Кирылта-3 и Кирылта-4 обнаружена частично сходная ситуация. В 2016 г. в нижнем озере Кирылта-4 нами были установлены сроки нереста мелкой планктоноядной формы гольца (ноябрь-декабрь). В 2017 г. ее нерест был подробно изучен; были получены первые данные о нересте симпатричной с ней крупной хищной формы (сроки частично перекрываются, возможна гибридизация между формами), а в верхнем озере Кирылта-3 был обнаружен и изучен весенний нерест мелкой планктоноядной формы (март-апрель). Таким образом, между парапатрическими популяциями мелкой формы из этих двух озер, как и между популяциями карликовой формы из озер Бол. и Мал. Леприндо, существует темпоральная репродуктивная изоляция, хотя сроки нереста иные. Остаются неизвестными сроки, места и особенности нереста крупной формы в оз. Кирылта-3, их изучение является приоритетной задачей на будущее. Следует отметить, что до сих пор на территории России были известны только популяции арктического гольца с типичным для этого вида осенним нерестом и единичные популяции с летним; весенний нерест отмечен нами впервые.

В озере Камканда, в котором обитают три симпатрические формы гольца, в 2017 г. были изучены особенности размножения двух из них - карликовой бентосоядной и мелкой планктоноядной. Показано, что обе формы используют одни и те же прибрежные нерестилища, но в разное время – соответственно, в сентябре и ноябре-декабре, т.е., как парапатрические формы в системах озер Леприндо и Кирылта, репродуктивно изолированы за счет различий в сроках нереста. При этом отдельные самцы мелкой формы созревают уже в сентябре, и возможна их ограниченная гибридизация с самками карликовой формы, т.е. изоляция, вероятно, неполная. Это открывает перспективу выяснения степени гибридизации между симпатрическими формами в природе, а также получения экспериментальных гибридов симпатрических форм для изучения их развития.

В озерах Даватчан и Токко собраны новые материалы по летнему - соответственно, глубоководному и прибрежному, нересту карликовой формы.

Для сравнительного анализа раннего онтогенеза арктических гольцов, принадлежащих к разным популяциям и формам, методом искусственного оплодотворения получена живая икра гольцов карликовой формы из озер Бол. Леприндо и Токко, мелкой формы из озер Кирылта-3, Кирылта-4 и Камканда. Для изучения формирования механизмов репродуктивной изоляции также проведено искусственное скрещивание между значительно дивергировавшими по морфологии, экологии и генетике гольцами из аллопатрических популяций – самцы карликовой формы из оз.

Бол. Леприндо (глубоководные многотычинковые планктофаги) скрещены самками из оз. Даватчан (глубоководные малотычинковые эврифаги) и из оз. Токко (литоральные малотычинковые бентофаги). Также проведено скрещивание между симпатрическими крупной и мелкой формами из оз. Кирылта-4. Полученная оплодотворенная икра транспортирована в Москву, где на базе кафедры ихтиологии МГУ проводилась ее инкубация. На момент написания отчета из икры гольцов, принадлежащих к весенне- и летненерестующим популяциям (Кирылта-3, Бол. Леприндо, Токко), получена молодежь, которая перешла на внешнее питание; проводится ее подращивание и изучение ранних стадий развития. Икра из осенненерестующих популяций (Кирылта-4, Камканда) инкубируется, зародыши достигли стадии появления пигмента в глазу. Первые результаты проводимых онтогенетических исследований свидетельствуют о наличии значительного межпопуляционного разнообразия по ряду параметров ранних стадий развития и об относительно высокой жизнеспособности гибридов, при том, что у некоторых из них отмечены нарушения в развитии.

В 2017 г. также продолжены генетические исследования арктических гольцов. На основании анализа нуклеотидных последовательностей контрольной области мтДНК проведен филогеографический анализ арктических гольцов европейской части России и Сибири. Показано, что выделенные ранее атлантическая и сибирская филогенетические группы (Brunner *et al.*, 2001) в связи с их близостью следует объединить в единую евроазиатскую группу в ранге подгрупп; уточнены их состав и ареалы. Гольцы с гаплотипами атлантической подгруппы обнаружены в Карелии, на Кольском п-ове, Полярном Урале, Новой Земле, Таймыре, с гаплотипами сибирской – в Забайкалье, в горных верховьях бассейнов Яны и Индигирки, в низовьях Анабара. В бассейне нижнего Анабара также обнаружены арктические гольцы с интрогрессированным от северной мальмы гаплотипом берингийской группы (рисунок). Полученные данные свидетельствуют о широкомасштабном послеледниковом расселении проходной формы гольцов атлантической подгруппы по атлантическому и ледовитоморскому бассейнам; об общем происхождении и близких филогенетических связях арктических гольцов сибирской подгруппы из разных областей Сибири и их возможных миграциях между этими областями в периоды плейстоценовых похолоданий. Они также подтверждают участие гольцов из Берингии в заселении арктических побережий Сибири и свидетельствуют об их проникновении на запад дальше, чем было известно ранее.

Опубликованы результаты изучения происхождения гольцов из оз. Черечень (бассейн Колымы) (рис.16, выборка 26) и их филогенетических связей с другими представителями гольцов арктической группы. На основании анализа изменчивости аллозимных локусов, мтДНК и гена RAG1 подтверждена их принадлежность к арктоидным гольцам, однако однозначно отнести их к

евроазиатской группе *Salvelinus alpinus* или к группе гольца Таранца на основании этих данных невозможно. Показано, что присутствие в их геноме мтДНК мальмы *S. m. malma* – также результат интрогрессивной гибридизации с этим видом, что подтверждает вторичный контакт разных представителей комплекса *S. alpinus*-*S. malma* в бассейне Колымы.

Заключение

Проведенные работы показывают, что дивергенция по особенностям размножения играет важнейшую роль в возникновении фенотипического разнообразия в процессах формообразования у арктического гольца. В разных озерах Забайкалья происходит расхождение симпатрических и парапатрических форм этого вида по времени и местам нереста, нерестовым субстратам, за счет чего достигается их репродуктивная изоляция. Разнообразие репродуктивных стратегий обуславливает значительные межпопуляционные различия по особенностям раннего онтогенеза. В свою очередь, последние сами оказывают существенное влияние на процессы формообразования. Как следует из результатов экспериментов по искусственной гибридизации, возникновение прекопуляционных репродуктивных барьеров между формами гольца не сопровождается формированием жестких посткопуляционных барьеров, несмотря на их генетические различия. Полученные данные по особенностям размножения гольцов в разных озерах Забайкалья важны также для разработки практических мер их охраны, т.е. для сохранения биоразнообразия. Проведенные филогеографические исследования проясняют родственные связи и плейстоценовую историю расселения и гибридизации гольцов Евразии.

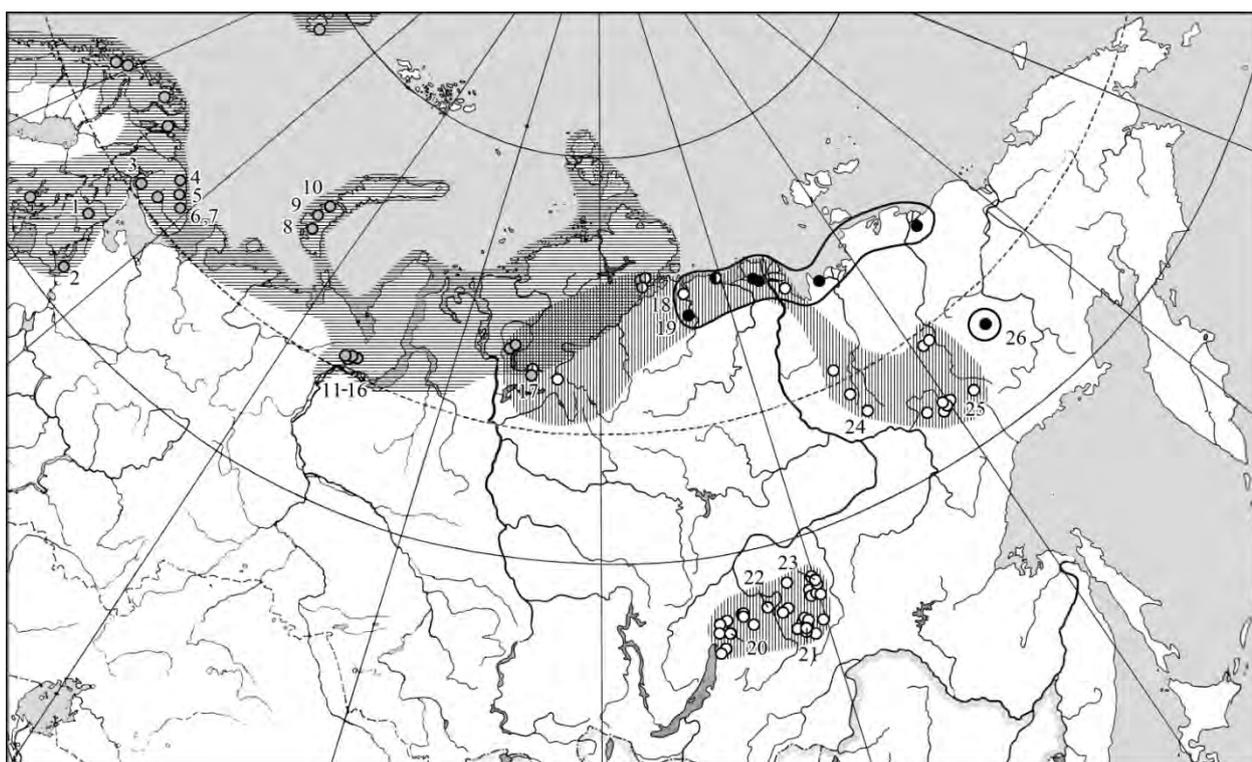


Рис.16 Популяции арктического гольца европейской части России и Сибири, изученные в наших исследованиях 2017 г. (нумерованные кружки), а также в наших предыдущих и в иностранных работах (Brunner *et al.* (2001), Alekseyev *et al.* (2009), Moore *et al.* (2015), Osinov *et al.* (2017)) (ненумерованные кружки). Показаны ареалы филогенетических групп и подгрупп, выделяемых по мтДНК. Серые кружки, горизонтальная штриховка - атлантическая подгруппа евроазиатской группы; белые кружки, вертикальная штриховка - сибирская подгруппа евроазиатской группы; черные кружки и линии – берингийская группа (арктические гольцы с интрогрессированной мтДНК северной мальмы).

Раздел 9. Исследование стабильности развития биологических систем. Оценка состояния биоразнообразия и здоровья среды.

Введение

Все возрастающее воздействие на окружающую природную среду диктует необходимость контроля ее состояния, обеспечения ее благоприятности для живых существ и человека. Эта задача все чаще звучит как обеспечение здоровья среды. Под здоровьем среды, в самом общем смысле, принимается ее состояние (качество), необходимое для обеспечения здоровья человека и других видов живых существ. Это ставит на повестку дня необходимость разработки операциональных систем его оценки.

Существует большой арсенал методов для выявления эффекта различных воздействий на состояние среды. Основная проблема состоит не в разработке новых методов, а в создании методологии, обеспечивающей критерии того, как сделать правильный выбор. Методология оценки здоровья среды как раз и предлагает возможный путь решения этой задачи. Обоснование подхода предполагает как характеристику его соответствия современным требованиям к организации мониторинга качества среды, так и апробацию для оценки возможностей его практического использования.

Оценка качества среды оказывается узловой задачей любых мероприятий в области охраны природы и природопользования. При всей важности проведения оценки качества среды на всех уровнях, с применением различных подходов приоритетной представляется именно биологическая оценка, связанная с оценкой благоприятности условий для живых существ и человека. При учете того, что определение содержания каждого поллютанта в различных компонентах среды и лабораторная оценка его токсичности, в особенности, при учете возможного кумулятивного эффекта различных воздействий, не представляется возможным, на первый план выходит оценка состояния живых существ при всем комплексе имеющихся воздействий.

Система оценки качества среды в настоящее время должна быть адекватной для решения ряда задач. Используемые подходы и методы должны обеспечивать возможность для выявления последствий различных, как естественных, так и антропогенных воздействий, включая факторы химического и физического загрязнения среды, изменение ландшафтов и др. Оценка среды необходима как в пространстве, так и во времени. Отдельной задачей, роль которой сейчас все возрастает, является обеспечение регистрации откликов окружающей среды не только на возрастание, но и на снижение степени неблагоприятного воздействия.

Для решения указанных задач современные подходы и методы оценки должны отвечать следующим требованиям.

Прежде всего, это необходимость оценка степени отклонения исследуемых показателей от оптимальных значений. Чувствительность методов, применяемых для оценки состояния среды, является одним из наиболее важных требований. Методология должна быть универсальной как в отношении вида оцениваемого воздействия, так и типа экосистем и вида живых существ, по отношению к которым такая оценка проводится. Она должна быть пригодная для широкого использования с целью оценки реальной природной ситуации. Даже самые совершенные лабораторные модели, позволяющие оценить биологические последствия различных антропогенных воздействий, обычно оказываются недостаточными для понимания реальной ситуации в природе.

Все это свидетельствует об актуальности поиска все новых форм мониторинга, разработки операциональной системы интегральной биологической оценки состояния видов и экосистем, пригодной для широкого использования с целью ранней «диагностики» происходящих изменений среды.

Суть предлагаемой методологии - в том, что характеристика качества среды производится путем оценки состояния разных видов живых существ. Особенностью такого подхода является то, что для оценки состояния экосистемы используются не экосистемные и популяционные параметры, как таковые, а показатели состояния организма.

Характеристика популяции получается по усредненным оценкам для выборки особей. Операциональным подходом для биомониторинга на экосистемном уровне может быть получение ответа на вопрос о состоянии популяций различных видов живых существ, представляющих различные ее компоненты. Путем суммирования такой информации можно получить характеристику состояния экосистемы.

Таким образом, в соответствии с предлагаемой системой главным объектом биомониторинга оказывается состояние живого организма, надежная оценка которого может быть получена на популяционном уровне. Биологическая характеристика экосистемного уровня сводится к оценке состояния популяций составляющих ее видов. Именно в этом и заключается ключевое значение исследования природных популяций, от состояния которых, в конечном счете, зависит как сохранение отдельных видов, так и нормальное функционирование экосистем.

Предлагаемая система мониторинга основана на использовании различных подходов для оценки состояния природных популяций разных видов, находящихся под воздействием различных

естественных и антропогенных факторов. Фундаментальным показателем такого состояния является эффективность механизмов гомеостаза развития. В нормальных условиях организм реагирует на воздействие среды посредством системы буферных гомеостатических механизмов. Эти механизмы поддерживают оптимальное протекание процессов развития. Под воздействием неблагоприятных условий эти механизмы могут быть нарушены, что приводит к изменению различных показателей развития (Захаров, 1987; *Developmental instability...*, 1994; *Developmental homeostasis...*, 1997). Такие нарушения гомеостаза могут происходить до появления изменений обычно используемых параметров жизнеспособности. Такой подход к оценке здоровья среды, основанный на исследовании эффективности гомеостатических механизмов, открывает возможность для выявления начальных последствий определенного неблагоприятного воздействия.

Изменения гомеостаза развития отражают базовые изменения функционирования живых существ и находят выражение в процессах, протекающих на разных уровнях и могут быть оценены по различным параметрам с использованием различных методов.

Принципиальная важность гомеостаза развития для живого организма позволяет использовать для анализа разные виды животных и растений. Нарушения, выявляемые по разным показателям у разных видов являются свидетельством изменения состояния организма при определенном воздействии, исключая возможность выявления частного специфического ответа или артефакта.

Предлагаемая система оказывается связанной со многими другими подходами к решению задачи организации биологического мониторинга.

Программы биоразнообразия нацелены на характеристику природных ситуаций путем оценки видового разнообразия и его изменений, при учете демографических параметров. При этом получается необходимая базовая информация о том, сколько каких видов и в каком количестве представлено в экосистеме. Важной дополнительной информацией при этом могла бы быть получение информации о том, в каком состоянии находятся природные популяции исследуемого видового разнообразия, представленное в той или иной экосистеме (*Вопросы экологического...*, 2011).

Интенсивно развивающиеся экотоксикологические подходы, главным образом, нацелены на оценку последствий разных видов воздействия на различные характеристики живых организмов в лабораторных моделях. При этом создаются необходимые базы данных по тому, каковы могут быть последствия применения того или иного поллютанта для определенных

параметров жизнедеятельности организма (Wildlife..., 2010; Kendall, 2016). Это позволяет прогнозировать опасность того или иного воздействия для живой природы. Необходимой дополнительной информацией при таком подходе оказывается интегральная оценка состояния видов живых существ в природе при всем комплексе различных воздействий.

Разрабатываемая система биомаркеров нацелена на обнаружение последствий воздействия различных химических соединений на определенные физиологические и биохимические показатели состояния организма (Peakall, 1992; Biomarkers..., 1999). Развивается направление, связанное с оценкой и поддержанием благополучного состояния организма для разных видов животных по этологическим и физиологическим показателям (Broom, Johnson, 1993; Broom, 2007). Совместными усилиями медиков и экологов развивается пограничный подход, устанавливающий параллель в реализации задач охраны природы и обеспечения здоровья человека (conservation biology & conservation medicine), который условно может быть определен как экологическая медицина. На практике это означает выявление разносторонних связей здоровья человека и животных (Conservation..., 2002).

Суть предлагаемой методологии оценки здоровья среды как раз и состоит в ответе на вопрос о состоянии разных видов живых существ в природе. Оценка проводится в отношении того видового разнообразия, которое представлено в исследуемой экосистеме. Необходимый ответ дается на базе интегральной оценки состояния живого организма по наиболее общей характеристике, гомеостазу развития. Из арсенала различных методов отбираются те, которые пригодны для выявления неспецифического ответа живых существ на стрессовые воздействия в реальных природных ситуациях. Таким образом, предлагаемая методология оказывается пограничной, объединяя определенные аспекты различных подходов в области мониторинга среды, включая биотестирование и биоиндикацию, подходы, связанные с исследованием биоразнообразия и экотоксикологии, оценки благополучия животных и экологической медицины. Он дает интегральную характеристику здоровья отдельных видов и экосистемы в целом при всем многообразии различных естественных и антропогенных воздействий.

Все это и определяет перспективность подхода для решения задач экологического нормирования.

Методы

Методология предполагает использование спектра методов, которые оценивают эффективность механизмов гомеостаза развития. При этом подразумевается, что набор конкретных методов в зависимости от целей проводимой оценки, а также по мере

совершенствования технологии может несколько изменяться (см. Биотест..., 1993; Захаров и др., 2000; Захаров и др., 2001а, б).

Морфологический подход. В качестве базового подхода использован морфологический подход, основанный на оценке стабильности развития. Основным подходом при оценке морфологических изменений, вследствие нарушений гомеостаза развития, является морфогенетический, который связан с оценкой стабильности развития. Эта характеристика дает оценку совершенства онтогенетических процессов по величине фенотипического разнообразия, связанного с нарушениями в индивидуальном развитии (Захаров, 1987; Clarke, 1995; Palmer et al., 1994; Soule, 1967; Valentine, Soule, 1971). Снижение эффективности гомеостаза приводит к возрастанию частоты отклонений от нормального строения различных морфологических признаков, как следствие «онтогенетического шума», оценка которого возможна по величине флуктуирующей асимметрии (как незначительных ненаправленных отклонений от совершенной билатеральной симметрии). Уровень таких морфологических отклонений от нормы оказывается минимальным лишь при определенных условиях, которые могут рассматриваться как оптимальные, и неспецифично возрастает при любых стрессовых воздействиях. Для комплекса морфологических признаков используется величина интегрального показателя флуктуирующей асимметрии. Для получения сравнительных оценок разработана пятибалльная шкала отклонений состояния организма от нормы по величине интегрального показателя. Частота фенотипических отклонений, как явных отклонений в развитии, патологоанатомические и гистологические изменения также могут быть использованы для оценки стрессовых воздействий. Но эти методы часто отражают специфические необратимые изменения и могут быть использованы, главным образом, для подтверждения серьезности выявляемых последствий при существенном воздействии неблагоприятных факторов.

Оценка стабильности развития проводилась в отношении следующих модельных объектов, включая представителей млекопитающих (рыжая полевка, *Clethrionomys glareolus*), рыб (плотва, *Rutilus rutilus*) и растений (береза повислая, *Betula pendula*). Был проведен анализ данных, полученных в районах антропогенного воздействия, включая химическое и радиационное загрязнение, а также на моделях для исследования последствий изменения климата (включая представителей млекопитающих, обыкновенная бурозубка, *Sorex araneus*, и растений, береза повислая). Параллельно с оценкой стабильности развития были использованы генетический и иммунологический подходы для характеристики гомеостаза развития.

Генетический подход. Цитогенетические изменения в соматических клетках представляют собой интегральный показатель гомеостаза развития, характеризуя как мутагенность среды, так и

эффективность иммунной системы организма. В норме, большинство генетических нарушений элиминируется посредством иммунной системы. Наличие таких нарушений является индикатором стресса, ведущего к появлению аномальных клеток и снижению иммунной потенции организма элиминировать подобные нарушения. Такие генетические нарушения могут быть выявлены как на хромосомном, так и на молекулярном уровне. Цитогенетические методы, основанные на оценке структурных и числовых изменений хромосом в соматических клетках (включая микроядерный тест, сестринские хроматидные обмены, хромосомные aberrации и др.), а также разрывы ДНК (комет-тест) обеспечивают характеристику стрессового состояния организма (Орджоникидзе и др., 2014). По частоте aberrантных клеток разработана шкала отклонений состояния организма от условной нормы. Эти исследования проводились совместно с ИПЭЭ РАН.

Иммунологический. Одной из наиболее важных характеристик состояния живого организма является оценка эффективности иммунной системы. В дополнение к выше указанному цитогенетическому подходу, характеризующему эффективность иммунной системы организма в отношении элиминации клеток с генетическими нарушениями, возможна оценка и других изменений иммунной потенции организма путем анализа других иммунологических параметров, таких как состав крови, продукция антител, эффективность иммунного ответа, устойчивость к заболеваниям и стрессу и др. В качестве одного из основных показателей было предложено использовать пролиферативную активность лимфоидных клеток, а для балльной оценки – индекс отклонений от условной нормы. Эти исследования проводилось совместно с НИЦЭМ Минздрава РФ).

Результаты

Был проведен анализ и обобщение оригинальных полученных данных по нарушению стабильности развития при разных видах антропогенного воздействия.

В результате оценок, проведенных в районе серьезного загрязнения, вследствие работы ряда химических предприятий (Средняя Волга), были выявлены существенные изменения показателей здоровья среды (на уровне 4-5 балла, критическое состояние) как по наземным, так и по водным экосистемам.

На сходном уровне оказались отклонения показателей стабильности развития в исследованном районе химического загрязнения среды в результате железнодорожной аварии. Однозначный эффект оцениваемого воздействия был выявлен практически по всем используемым показателем для всех исследованных видов. По наземным экосистемам нарушение стабильности развития наблюдалось у растений и млекопитающие (до 4-5 балла пятибалльной шкалы

отклонений от нормы, критическое состояние, $p < 0,01$). Нарушения стабильности развития у млекопитающих сопровождались изменением цитогенетических и иммунологических показателей (до уровня четвертого балла, $p < 0,05$). Для водных экосистем нарушение стабильности развития у рыб и земноводных свидетельствует о крайне высоком уровне отклонений от нормы (4-5 балл пятибалльной шкалы) у животных, развитие которых происходило в условиях загрязнения. Значимость проекта - в демонстрации возможностей подхода для выявления таких последствий не в результате хронического воздействия, что было показано в рамках предыдущего проекта, а вследствие разового воздействия (аварийного химического загрязнения). Адекватность подхода для выявления последствий недавно произошедшей аварии связана с тем, что подход нацелен на выявление возможных изменений состояния организма в ходе онтогенеза. Целесообразность использования подхода определялась и тем, что в данном случае оставался неопределенным точный перечень загрязняющих веществ и их количество, попавшее в результате аварии в окружающую среду, а проведение оценок возможных последствий воздействия загрязнения для здоровья человека иным способом было затруднительно в этом практически ненаселенном районе.

Исследование, проведенное на радиационно загрязненных территориях Брянской области, показало, что даже не столь высокие уровни загрязнения могут иметь эффект для оценок здоровья среды. Как для наземных, так и для водных экосистем были выявлены отклонения в показателях здоровья среды. При отклонении показателей стабильности развития у растений (береза повислая) на уровне 2-3 балла, отклонения показателя для мелких млекопитающих (рыжая полевка) достигают 3-4 балла ($p < 0,05$). Причем, сходные оценки были получены по пяти видам мелких млекопитающих как по стабильности развития, так и показателям цитогенетического гомеостаза и иммунного статуса. По показателям цитогенетического гомеостаза отклонения достигают пятого балла ($p < 0,01$). Все эти изменения наблюдаются на фоне прежнего биоразнообразия.

По водным экосистемам для рыб (золотой карась (*Carassius carassius*) и земноводных (зеленые лягушки гибридного комплекса (*Rana esculenta*)) отклонения показателя стабильности развития достигают 4-5 балла ($p < 0,01$), при частоте фенотипических отклонений у рыб (нарушения нормального строения плавников и жабр) на уровне 30 процентов. Эти отклонения у земноводных сопровождаются изменениями показателей иммунного статуса.

Главный результат проекта – отклонения от нормы по разным показателям и видам говорят об изменении здоровья среды даже в условиях относительно невысокого уровня радиационного загрязнения. Это свидетельствует о целесообразности использования подхода для ведения мониторинга таких территорий. При использовании показателей биоразнообразия и численности отдельных видов и ориентации на уровень отклонений от нормы (например, по частоте

аберрантных клеток), который может быть промоделирован в лабораторных условиях, но практически не встречается в природных популяциях, заключение о благополучной ситуации на таких территориях – результат того, что «планка опасности» завышена. Предлагаемый подход, который ориентирован на оценку чувствительных показателей состояния организма по гомеостазу развития применительно к природным популяциям, представляется наиболее адекватным для решения поставленной задачи – для установления «планки опасности» на уровне необходимом для обеспечения благополучного состояния организма.

При оценки последствий воздействия неионизирующего излучения сравнение природных популяций на контрольном участке и на экспериментальном участке, подверженном воздействию радара в течение весенне-летних месяцев, позволило выявить эффект воздействия по показателям стабильности развития как для растений, так и для млекопитающих и по иммунным показателям для мелких млекопитающих. Причем и в том и в другом случае изменения были на уровне 4-5 балла, критическое состояние ($p < 0,05$). Если выявленный эффект по физиологическим показателям (параметры фотосинтеза у березы повислой) носил обратимый характер и исчезал через несколько дней после прекращения воздействия, то морфологические изменения носят необратимый характер (во всяком случае для тех признаков, которые формируются на ранних стадиях онтогенеза и не подвержены дальнейшим возрастным изменениям). Эффект прослеживался на фоне неизменного биоразнообразия. Кроме сходства сообщества мелких млекопитающих, специально проведенное исследование по почвенной фауне не выявило изменений в видовом составе и численности отдельных видов беспозвоночных.

Оценка, проведенная в районе двух химических предприятий, позволила выявить разную степень отклонения состояния биоты в зависимости от степени воздействия.

Если в отношении одного предприятия отклонения оказались не столь значительными и локальными (на уровне второго балла), то в отношении другого они соответствовали о существенных изменениях (были выявлены изменения до 5 балла пятибалльной шкалы отклонений от условной нормы, критическое состояние). Согласованные изменения были выявлены для различных объектов (включая представителей млекопитающих, земноводных, рыб и растений) по различным подходам (включая цитогенетические и иммунологические показатели) как по наземным, так и по водным экосистемам.

Рекогносцировочная оценка качества среды в низовьях Волги проводилась для наземных и водных экосистем. Ситуация выше по течению реки относительно города соответствует условной норме. Ниже по течению ситуация может быть оценена как критическая, видимо, вследствие воздействия агропромышленного комплекса. Еще ниже по течению реки ситуация несколько

улучшается, но, по-прежнему, остается напряженной. Этот район представляет собой зону интенсивного сельского хозяйства. Несмотря на некоторые отличия, которые наблюдаются по различным подходам и видам, все основные исследованные параметры изменяются согласованно, позволяя представить картину наблюдаемых изменений здоровья среды даже при такой рекогносцировочной оценке.

В рамках данного проекта оценка проводилась как рекогносцировочная для характеристики общей ситуации на значительной территории. Опыт реализации проекта свидетельствует о возможности использования подхода для решения задачи, связанной с оценкой общей нагрузки на здоровье среды вне зависимости от конкретных факторов воздействия. В данном случае в разных районах превалирует либо промышленное, либо сельскохозяйственное воздействие. Принципиально сходная картина, полученная для наземных и водных экосистем, открывает возможность использования подхода для оценки здоровья среды для водно-болотных угодий.

Исследование оценок здоровья среды было проведено в ряде районов на территории города Москвы. По тем подходам, для которых было возможно использовать разработанную балльную систему оценки, ситуация по разным районам для наземных экосистем варьировала от 2 до 4 балла пятибалльной шкалы отклонений от нормы, для водных экосистем от 2 до 5 балла. Оценка проводилась для наземных экосистем по растениям (береза повислая) и мелким млекопитающим (полевая мышь), для водных экосистем по рыбам (плотва) и земноводным (озерная лягушка). О значимости оценок свидетельствует согласованность изменения используемых показателей (включая оценки стабильности развития по всем исследуемым объектам, а также показатели цитогенетического гомеостаза в отношении млекопитающих, рыб и земноводных и иммунного статуса в отношении млекопитающих). Выявленный тренд нарастания степени отклонений от условно нормального состояния, в общем, соответствует известной картине нарастания степени экологической нагрузки на территории города (на основании химических и физических анализов и эколого-эпидемиологических оценок).

Этот результат свидетельствует о целесообразности проведения таких оценок в условиях города для характеристики ситуации при всем комплексе самых разных воздействий, имеющих место на урбанизированной территории.

Таким образом, каждая из представленных моделей вносит свой вклад в формирование картины возможных изменений здоровья среды, что и определяет возможности предлагаемой методологии и используемых при этом подходов.

Заключение

Значимость оценок, получаемых при использовании методологии оценки здоровья среды, определяется возможностью характеристики реальной ситуации, которая имеет место на определенной территории (в природных популяциях разных видов) при разных видах антропогенного воздействия. Это химическое загрязнение, ионизирующая и неионизирующая радиация, в также комплексное воздействие в районах промышленной и сельскохозяйственной активности, на урбанизированных территориях. В этом и состоит назначение подхода, поскольку оценка всех загрязняющих веществ и видов воздействия оказывается затруднительной, а предсказание и моделирование кумулятивного эффекта их возможных сочетаний не представляется возможным вовсе. Как показал опыт проведенных оценок, существенные изменения здоровья среды могут наблюдаться на фоне прежнего или даже возросшего, в силу определенных причин, биоразнообразия и высокой продуктивности экосистем.

Реальная ситуация, которая может быть выявлена при таком подходе, может оказаться как хуже, так и лучше того заключения, которое можно сделать на основании анализа формальных данных по степени воздействия или при использовании иных подходов.

При этом появляется возможность для выявления последствий как хронического, так и разового воздействия, как на локальном уровне, так и на уровне фонового состояния значительных территорий. Получаемая информация, связанная с оценкой состояния онтогенеза в природных популяциях при разных видах воздействия, представляет практический интерес и может быть использована для выделения зон экологического неблагополучия (даже на фоне сохранения прежних экосистем и биоразнообразия), экологического нормирования и определения предельно допустимой нагрузки.

При таком подходе возможна оценка последствий разных воздействий в отношении разных видов животных и растений, разных типов экосистем. Такой анализ может дать необходимую информацию о качестве среды даже в тех случаях, когда точный перечень загрязняющих веществ и других видов воздействия остается неопределенными. При этом может быть получена ориентировочная информация и о благоприятности среды для здоровья человека, что дает возможность такой характеристики даже для ненаселенных районов. В целом, такая оценка, давая характеристику благоприятности среды для живых существ и человека, представляет как теоретический, так и практический интерес, определяет формирование нового подхода к сохранению живой природы, обращая внимание на важность не только поддержания численности разных видов, но и на их благополучное состояние.

Методология оценки здоровья среды представляет собой не просто еще один метод, а принципиально иной подход, в результате которого вместо обычной мозаики ответов по различным биологическим показателям может быть получен скоррелированный ответ по разным подходам к оценке гомеостаза развития, что и позволяет подойти к характеристике состояния разных видов живых существ. Ее значимость – в возможности оценки реальной ситуации в природе, получения информации, которая не может быть получена в ходе лабораторных экспериментов.

Существуют две возможности использования методологии: в отношении районов, представляющих особый интерес, целесообразно использование различных подходов; для быстрого сканирования возможно использование сокращенной, но достаточно эффективной для ориентировочной оценки ситуации, системы, ограниченной наиболее доступными методами (основанными, главным образом, на морфогенетических показателях), пригодными для широкого использования.

Основанием для возможности использования морфогенетических методов при рекогносцировочной оценке ситуации служит опыт использования методологии в лаборатории и в природе. Практически во всех случаях, изменения в гомеостазе развития, фиксируемые при использовании различных подходов (включая генетические, физиологические, биохимические и иммунологические) сопровождаются изменениями морфогенетических показателей. Это позволяет рекомендовать морфогенетические методы в качестве операционального и доступного для широкого использования подхода для получения первых ориентировочных оценок.

Подход представляется перспективным для мониторинга последствий антропогенного воздействия, а также последствий изменения климата

Дальнейшее развитие методологии, основанной на оценке гомеостаза развития в природных популяциях, видимо, должно быть связано с совершенствованием методов и конкретных показателей, которые используются в рамках ее основных подходов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что адаптивная радиация видов, приводящая к формированию «букетов видов», может происходить параллельно в различных филогенетических линиях, и обладать сходными паттернами морфологических и молекулярно-генетических признаков, обусловленных отбором в сходных условиях обитания видов. Для различных групп животных выявлены молекулярно-генетические и цитогенетические маркеры поздних этапов дивергенции. Для грызунов *Apodemus flavicollis* в качестве таких маркеров выступает набор В-хромосом, имеющих общее происхождение и сходных путях эволюционных преобразований. Для различных видов животных молекулярными маркерами эволюционных событий могут быть NUMT-последовательности, сохраняющие информацию об особенностях вымерших к настоящему времени митохондриальных гаплотипов. Работы по филогеографии видов, исследования зон гибридизации между близкородственными видами позволяет реконструировать картину распространения и эволюции видов в ходе климатических изменений после вюрмского оледенения. Применение современных методов анализа молекулярно-генетических маркеров позволило разработать диагностические панели для хозяйственно-ценных видов, осуществить таксономические ревизии в различных группах беспозвоночных животных: клещей, ракообразных, моллюсков. Продолжаются работы по определению генетических основ сложных количественных признаков, связанных с морфологией, физиологией и поведением животных и человека. Разработаны новые методические подходы для биомониторинга на экосистемном уровне, основанные на характеристике состояния ключевых видов сообществ по гомеостазу развития.

Список публикаций

1. Boscari E., Barmintseva A., Zhang S., Yue H., Li C., Shedko S.V., Lieckfeldt D., Ludwig A., Wei Q.W., **Mugue N.S.**, Congiu L. Genetic identification of the caviar-producing Amur and Kaluga sturgeons revealed a high level of concealed hybridization // *Food Control*. 2017. V. 82. P. 243-250. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.07.001. (WoS, Scopus)
2. Boscari E., Vitulo N., Ludwig A., Caruso C., **Mugue N.S.**, Suci R., Onara D.F., Papetti C., Marino I.A.M., Zane L., Congiu L. Fast genetic identification of the Beluga sturgeon and its sought-after caviar to stem illegal trade // *Food Control*. 2017. V. 75. P. 145-152 DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.11.039. (WoS, Scopus)
3. Ekimova I., Deart Y., **Schepetov D.** Living with a giant parchment tube worm: a description of a new nudibranch species (Gastropoda: Heterobranchia) associated with the annelid Chaetopterus// *Marine Biodiversity*. 2017. P. 1-12. DOI: 10.1007/s12526-017-0795-z. (WoS, Scopus)
4. Evgenev M.B., Krasnov G.S., Nesterova I. V., Garbuz D.G., Karpov V.L., Morozov A.V., Snezhkina A.V., Samokhin A.N., Sergeev A., **Kulikov A.M.**, Bobkova N.V. Molecular mechanisms underlying neuroprotective effect of intranasal administration of human Hsp70 in mouse model of Alzheimer's disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017. V. 59. N 4. P. 1415-1426. DOI: 10.3233/JAD-170398. (WoS, Scopus)
5. **Kapustina S., Brandler O.** Species affiliation of the complete mitochondrial genome of Daurian ground squirrel *Spermophilus dauricus* Brandt, 1843 (Rodentia, Sciuridae) // *Mitochondrial DNA Part B*. 2017. V. 2. N 1. P. 296-297. (WoS, Scopus)
6. Matveevsky S., Kolomiets O., Bogdanov A., Hakhverdyan M., **Bakloushinskaya I.** Chromosomal evolution in mole voles *Ellobius* (Cricetidae, Rodentia): bizarre sex chromosomes, variable autosomes and meiosis // *Genes*. 2017. V. 8. N 1. P. 306. DOI: 10.3390/genes8110306. (WoS, Scopus)
7. Naumenko S.A., Logacheva M.D., Popova N.V., Klepikova A.V., Penin A.A., Bazykin G.A., Etingova A.E., **Mugue N.S.**, Kondrashov A.S., Yampolsky L.Y. Transcriptomebased phylogeny of endemic Lake Baikal amphipod species flock: fast speciation accompanied by frequent episodes of positive selection // *Molecular Ecology*. 2017. V. 26. P. 536–553. DOI: 10.1111/mec.13927. (WoS, Scopus)
8. Osinov A.G., Volkov A.A., Sergeev A.A., **Alekseyev S.S.**, Oficerov M.V., Kirillov A.F. On the origin and phylogenetic position of arctic charr (*Salvelinus alpinus* complex, Salmonidae) from lake cherechen' (middle kolyma river Basin): controversial genetic data // *Polar Biology*. 2017. V.40. N 4. P. 777-786. DOI: 10.1007/s00300-016-2000-4. (WoS, Scopus)

9. Rajičić M., Romanenko S.A., Karamysheva T.V., Blagojević J., Adnadević T., Budinski I., **Bogdanov A.S.**, Trifonov V.A., Rubtsov N.B., Vujošević M. The origin of B chromosomes in yellownecked mice (*Apodemus flavicollis*)-Break rules but keep playing the game // PLoS ONE. 2017. V. 12. N. 3. e0172704 DOI: 10.1371/journal.pone.0172704. (WoS, Scopus)
10. Reisser C.M.O., Fasel D., Hurlimann E., Dukic M., Haag-Liautard C., Thuillier V., **Galimov Y.**, Haag C.R. Transition from environmental to partial genetic sex determination in daphnia through the evolution of a female-determining incipient w chromosome // Molecular biology and evolution. 2017. V. 34. N 3. P. 575-588. DOI: 10.1093/molbev/msw251. (WoS, Scopus)
11. Shilova V.Y., Zatssepina O.G., Garbuz D.G., Funikov S.Y., Zelentsova E.S., Schostak N.G., **Kulikov A.M.**, Evgenev M.B. Heat shock protein 70 from a thermotolerant Diptera species provides higher thermoresistance to *Drosophila* larvae than correspondent endogenous gene // Insect Mol Biol. 2017. Aug 10. DOI: 10.1111/imb.12339. (WoS, Scopus)
12. **Smirina E.**, Ananjeva N. On the longevity, growth and reproductive characteristics of *Lichtenstein's Toadhead Agama*, *Phrynocephalus interscapularis* Lichtenstein, 1856 (Agamidae, Sauria) // Amphibia Reptilia. 2017. V. 38. N 1. P. 31-39. DOI: 10.1163/15685381-00003080. (WoS, Scopus)
13. Bryja J., Kostin D., Meheretu Y., Šumbera R., Bryjová A., Kasso M., Mikula O., Lavrenchenko L.A. Reticulate pleistocene evolution of ethiopian rodent genus along remarkable altitudinal gradient // Molecular phylogenetics and evolution. 2017. V. 118. P. 75-87. DOI: 10.1016/j.ympev.2017.09.020. (WoS, Scopus)
14. Anijalg P., Ho S.Y.W., Davison J., Keis M., Tammeleht E., Bobowik K., Tumanov I.L., Saveljev A.P., **Lyapunova E.A.**, Vorobiev A.A., Markov N.I., Kryukov A.P., Kojola I., Swenson J.E., Hagen S.B., Eiken H.G., Paule L., Saarma U. Large-scale migrations of brown bears in Eurasia and to North America during the Late Pleistocene // Journal of Biogeography. 2017. N 15. DOI: 10.1111/jbi.13126 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jbi.13126/full>. (WoS, Scopus)
15. **Богданов А.С.**, Макенов М.Т., Медяникова Л.В., Щучинова Л.Д., Якименко В.В. Изменчивость фрагментов митохондриального гена первой субъединицы цитохромоксидазы (COI) у нескольких видов иксодовых клещей группы *Marginatus* (Ixodidae, Amblyomminae, Dermacentor) // Известия РАН. Серия биологическая. 2017. № 4. С. 378-383. DOI: 10.7868/S000233291703002X. (РИНЦ). (Bogdanov A.S., Makenov M.T., Medyanikova L.V., Shchouchinova L.D., Yakimenko V.V. Variability of mitochondrial cytochrome oxidase first subunit gene (COI) fragments in several tick

species of the marginatus group (Ixodidae, Amblyomminae, Dermacentor) // Biology Bulletin. 2017. V. 44. N 4. P. 379-383. DOI: 10.1134/S1062359017030025. (WoS, Scopus)

16. Булатова Н.Ш., Павлова С.В., Потапов С.Г., **Громов А.Р.** Ядрышкообразующие районы (яор) хромосом обыкновенных полевков как ядерные маркеры геномной дифференциации по данным из гибридной зоны двух кариоформ, *arvalis* и *obscurus* // Генетика. 2017. Т. 53. № 6. С. 761-764. DOI: 10.7868/S0016675817060030 (РИНЦ). (Bulatova N.S., Pavlova S.V., Potapov S.G., Gromov A.R. Nucleolar organizing regions (NORs) of common vole chromosomes as nuclear markers of genome differentiation in data from a hybrid zone of two karyoforms, *arvalis* and *obscurus* // Russian Journal of Genetics. 2017. V. 53. 6. P. 736-739. DOI: 10.1134/S1022795417060035. (WoS, Scopus)

17. **Захаров В.М.**, Крысанов Е.Ю., Пронин А.В., **Трофимов И.Е.** Исследование гомеостаза развития в природных популяциях. Концепция здоровья среды: методология и практика оценки // Онтогенез. 2017. Т.48. 6. С. 418-432. DOI: 10.7868/S0475145017060052. (РИНЦ). (Zakharov V.M., Krysanov E.Y., Pronin A.V., Trofimov I.E. Study of developmental homeostasis in natural populations. Health of environment concept: Methodology and practice of estimation // Russian Journal of Developmental Biology. 2017. V. 48. N 6. P. 355-368. DOI: 10.1134/S1062360417060054. (WoS, Scopus)

18. **Захаров В.М.**, Трофимов И.Е. Морфогенетический подход к оценке здоровья среды: исследование стабильности развития // Онтогенез. 2017. Т.48. № 6. С. 433-442. DOI: 10.7868/S0475145017060064. (РИНЦ). (Zakharov V.M., Trofimov I.E. Morphogenetic approach to estimation of health of environment: Study of developmental stability // Russian Journal of Developmental Biology. 2017. V. 48. N 6. P. 369-378. DOI: 10.1134/S1062360417060066. (WoS, Scopus)

19. Goryacheva I.I., **Blekhman A.V.** Genetic structure of native and invasive populations of *Harmonia axyridis* Pall. in the light of global invasion // Russian Journal of Genetics. 2017. V. 53. 1. P.9-20. DOI: 10.1134/S1022795416120048

20. Смолянинов В.В., **Гуляев Д.В.** Онтогенез локомоторной волны севрюги // Биофизика. 2017. Т. 62. № 2. С. 395-404. (РИНЦ) . (Smolyaninov V.V., Gulyaev D.V. The ontogeny of the locomotor wave in sevruga fish (*Acipenser stellatus* Pall.) // Biophysics (Russian Federation). 2017. V. 62. 2. P. 312-320. DOI: 10.1134/S0006350917020257. (WoS, Scopus)

21. **Яблоков А.В.**, Левченко В.Ф., Керженцев А.С. О концепции «управляемой эволюции» как альтернативе концепции «устойчивого развития» // Теоретическая и прикладная экология. 2017. № . С. 4-8. (РИНЦ). (Yablokov A.V., Levchenko V.F., Kerzhentsev A.S. The conception of

"controlled evolution" as an alternative to the conception of "sustainable development" // Theoretical and Applied Ecology. 2017. V. 2. P. 4-8. (Scopus)

22. **Yablokov A.V.** Contribution of N.W. Timoféeff-Ressovsky to biology and methodology of science, Book Chapter, Genetics, Evolution and Radiation: Crossing Borders, The Interdisciplinary Legacy of Nikolay W. Timofeeff-Ressovsky1 January 2017, Pages 29-32. Scopus,2-s2.0- 85034234101. DOI: 10.1007%2f978-3- 319-48838- 7_31

23. **Yablokov A.V.** Fundamental difficulties in dose calculation, Book Chapter. Genetics, Evolution and Radiation: Crossing Borders, The Interdisciplinary Legacy of Nikolay W. Timofeeff-Ressovsky", Pages 371-384. DOI=10.1007%2f978-3- 319-48838- 7_31

Отчет утвержден Ученым советом 06 декабря 2017 г., протокол №9