

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

ФГАОУВПО «КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ЗООЛОГИИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГИСТОЛОГИИ

Направление подготовки: 020400.68 – Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ МАГИСТЕРСКАЯ РАБОТА

МОРОВА АРСЕНИЯ РОМАНОВИЧА

**ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СТАТУС АРКТИЧЕСКИХ СЕПИОЛИД
РОДА *ROSSIA* ПО ДАННЫМ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО И
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗОВ:
ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ БАРЕНЦЕВА МОРЯ**

Работа завершена:

«16» 04 2013 г.  (A. P. Morov)

Работа допущена к защите:

Научные руководители -

кандидат биологических наук, доцент

«16» апреля 2013 г.  (R. M. Sabirov)

доктор биологических наук, с.н.с. Департамента
рыболовства Фолклендских о-вов, г. Стенли

«16» 04 2013 г.  (V. V. Laptevskiy)

Заведующий кафедрой

кандидат биологических наук, доцент

«16» апреля 2013 г.  (R. M. Sabirov)

РЕФЕРАТ

Ключевые слова: Баренцево море, морфологический анализ, молекулярно-генетический анализ, арктическая россия, форма «*palpebrosa*», форма «*glaucopis*», фрагменты генов COI и 18S рРНК.

Изучен таксономический статус арктических сепиолид с использованием комбинированного подхода морфологического и молекулярно-генетического анализов.

Один из массовых видов головоногих моллюсков Баренцева моря арктическая россия *R. palpebrosa* представлен двумя формами: арктической папильчатой «*palpebrosa*» и boreально-арктической гладкой (без папилл) «*glaucopis*». Вооружение ловчего аппарата данных форм не является значимым признаком для их диагностирования.

У самок обеих форм арктической россии типичное сепиолидное строение репродуктивной системы. Показатели репродуктивной системы и гонады значительно увеличиваются по мере созревания. Шесть фаз развития ооцитов характерно для яичника, также установлено наличие «резорбирующего фонда» ооцитов. Потенциальная плодовитость не превышает трех сотен ооцитов. Онтогенетическое развитие фонда ооцитов в гонаде арктической россии пульсирующее, нерест происходит порциями (3 – 6 порций). Количество яиц в одной порции 20 – 40 штук. Размеры зрелых ооцитов достигают 11,5 мм.

Показана высокая гомология (93 – 99%) последовательностей фрагментов генов COI и 18S рРНК от образцов баренцевоморской арктической россии с последовательностями из GenBank *R. palpebrosa* из Канадской Арктики. Сиквенсы по фрагментам двух генов от образцов формы «*glaucopis*» и «*palpebrosa*» идентичны. Фрагмент гена COI наиболее подходит для видовой идентификации и реконструкции отношений в пределах рода, фрагмент гена 18S рРНК позволяет взглянуть на эволюционные отношения десятируких головоногих на уровне отрядов.

Исходя из морфологических и молекулярно-генетических аспектов изучения таксономии арктических сепиолид рода *Rossia*, обе формы арктической россии принадлежат к одному политипическому виду, которым в соответствии с принципом приоритета, является *R. palpebrosa*. *R. glaucopis* должна быть отнесена к младшему синониму.

Работа изложена на 109 страницах машинописного текста, содержит 56 рисунков (в т.ч. 44 – оригинальных), 11 таблиц. Библиография: 103 наименования, в т.ч. 62 – на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ПРИМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ В СИСТЕМАТИКЕ И ФИЛОГЕНЕТИКЕ ЦЕФАЛОПОД.....	7
1.1. Морфологический анализ.....	7
1.1.1. Признаки репродуктивной системы самок каракатиц.....	7
1.1.2. Признаки репродуктивной системы самок сепиолид.....	14
1.2. Молекулярно-генетический анализ.....	21
1.3. Пути решения проблемы таксономии комплексными подходами (на примере <i>Rossia palpebrosa</i> – <i>R. glaukopis</i>)	34
2. КРАТКАЯ ГИДРОЛОГИЧЕСКАЯ И ГИДРОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАРЕНЦЕВА МОРЯ.....	36
3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	45
3.1. Материал и методы морфологического анализа	45
3.2. Материал и методы молекулярно-генетического анализа.....	48
3.3. Статистическая обработка материала.....	51
4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	52
4.1. Морфологический анализ форм арктической россии в Баренцевом море.....	52
4.1.1. Анализ географического распределения по характеру покровов тела и головы.....	52
4.1.2. Анализ географического распределения по вооружению ловчего аппарата.....	55
4.1.3. Анализ географического распределения по признакам репродуктивной системы.....	57
4.1.3.1. Район ВШ.....	64
4.1.3.2. Район ЗФИ.....	69
4.1.3.3. Район ЦБМ.....	74
4.1.3.4. Район ЮБМ.....	79
4.2. Молекулярно-генетический анализ сепиолид рода <i>Rossia</i>	83
4.2.1. Анализ форм арктической россии в Баренцевом море.....	85
4.2.2. Исследование и реконструкция филогенетических отношений в пределах семейства Sepiolidae.....	87
4.2.2.1. Анализ по фрагменту гена COI.....	87
4.2.2.2. Анализ по фрагменту гена 18S рРНК.....	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
ВЫВОДЫ.....	99
БЛАГОДАРНОСТИ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

ВВЕДЕНИЕ

С конца семидесятых годов XX века начинается активное применение молекулярно-биологических признаков в систематике и филогении организмов. Усовершенствованные методы секвенирования (определение аминокислотной или нуклеотидной последовательности белков и нуклеиновых кислот) и обработки материала стали позволять получать данные в сравнительно короткие сроки. Систематика и филогения получили новый мощный инструмент для своих построений в виде молекулярных филогенетических древ на основании анализа по различным генам или их участкам. А процесс определения аминокислотных или нуклеотидных последовательностей практически стал рутинной лаборантской работой. Можно говорить, что в биологии сформировалась новая парадигма – все многообразие форм органического мира есть отображение многообразия ДНК.

Достаточно быстро проявились несоответствия между многими предложенными филогенетическими древами. Секвенирование дало такое море информации, которой никогда не было в биологической науке. Возникло несоответствие между знанием и пониманием. Распознавание функционально значимой части генома стало возможным благодаря биоинформатике. А такая проблема как, способность структуры ДНК отображать филогенетические отношения организмов в полной мере, является дискуссионной и по настоящее время.

В решении данного вопроса очевидным становится применение продуктивного пути развития систематики и филогенетики, который заключается в разработке синтетических схем развития организмов. Эти схемы должны совмещать морфологические и молекулярные данные, в таком случае можно говорить о комплексном подходе в изучении систематики и филогенетики организмов. Такого рода подходы стали активно разрабатываться уже с середины 90-х годов прошедшего столетия (Patterson, 1994; Margulis, 1996 и др.). А в начале XXI века были уже получены результаты, касающиеся вопросов систематики «проблематичных» таксонов многоклеточных животных с использованием комплексного метода анализа (Giribet et al., 2001; Giribet, Wheeler, 2002). Применение такого подхода в изучении систематики и филогении не обошло стороной и такую группу морских беспозвоночных как головоногие моллюски (Cephalopoda). Они являются очень разнообразной, малоизученной и представляющей огромный интерес со стороны исследователей всего мира группой морских беспозвоночных животных. Цефалоподы – это важный и перспективный

объект промысла. Из-за высоких пищевых качеств, короткого жизненного цикла и необыкновенно быстрого роста головоногие моллюски также выступают ценным продуктом марикультуры (Несис, 1982; Лаптиховский, 2005).

Систематическое положение арктических сепиолид Баренцева моря остается не ясным до сих пор. Для одного из самых массовых видов головоногих моллюсков Баренцева моря арктической россии *Rossia palpebrosa* Owen, 1834 в литературе упоминается близкий вид – *R. glaucopis* Loven, 1845. Ареал данного вида является симпатическим по отношению к *R. palpebrosa*. Но *R. glaucopis* преимущественно встречается в южных частях ареала. Данные виды имеют основные морфологические отличия по вооружению ловчего аппарата и характеру покровов тела и головы. У *R. palpebrosa* присоски в проксимальных частях рук перестраиваются в 4 ряда, бугорки (папиллы) на теле крупные и заметные; у *R. glaucopis* 4-х рядное расположение присосок не выражено, папиллы на теле незаметны. Данные признаки могут быть очень изменчивыми (Несис, 1982).

В связи со всем вышеизложенным **целью** настоящей работы явилось изучение таксономического статуса арктических сепиолид Баренцева моря с использованием морфологических и молекулярно-генетических аспектов анализа. Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- 1) Провести анализ географического распределения *R. palpebrosa* и *R. glaucopis* по основным морфологическим различиям видов;
- 2) Изучить морфо-функциональные различия и степень изменчивости репродуктивной системы арктических сепиолид в различных районах Баренцева моря;
- 3) Провести молекулярно-генетический анализ с использованием нуклеотидных последовательностей генов 18S рРНК и цитохром С оксидазы субъединицы I (COI) от образцов арктических сепиолид Баренцева моря;
- 4) Реконструировать филогенетические отношения арктических сепиолид Баренцева моря на молекулярных древах по нуклеотидным последовательностям изучаемых генов;
- 5) Выполнить статистическую обработку полученных массивов данных.

Настоящая выпускная квалификационная работа выполнена в рамках грантов:

- PINRO/IMR (Норвежско-Российский, 2008-2012) «Joint Norwegian-Russian environmental status, Barents Sea Ecosystem»;
- Student Exchange Support Program (Scholarship for short-term study in Japan) of Japan Student Services Organization (JASSO), № S71115401008, January – April, 2012.

миопсидных кальмаров. Образец баренцевоморской арктической россии образовал достоверно значимый кластер с канадской арктической россией в трёх случаях (бутстреп-поддержка по методу NJ равна 89, по методу МЕ – 91 и по методу МЛ – 98). Также на родовом уровне с высокой достоверностью выделяется другой кластер, объединяющий представителей рода *Heteroteuthis*. Кластеризация подсемейств сепиолид имеет место с достоверно значимыми результатами. Но объединение в кластер уровней «семейство» и «отряд» для сепиолид недостоверно значимо. На уровне отряда с высокой бутстреп-поддержкой в кластеры объединяются лишь кальмары. Объединение сепиид в кластер отрядной единицы происходит, но значения бутстреп-анализа в результате оказываются недостоверно значимыми. Следовательно, остается ряд спорных вопросов об отношениях десятируких цефалопод выше уровня «семейство».

ВЫВОДЫ

1. Популяция арктической россии *R. palpebrosa* в Баренцевом море представлена формами «*palpebrosa*» (арктическая папильчатая) и «*glaucopis*» (boreально-арктическая гладкая, без папилл). Соотношение численности во всех сборах форм «*palpebrosa*» и «*glaucopis*» для обоих полов составило 0,3/0,7 ($p < 0,01$). Температура воды – главный фактор, влияющий на географическое распределение форм: «*palpebrosa*» встречается при придонных температурах ниже 0°C, наиболее многочисленна при $t > -1^{\circ}\text{C}$. Форма «*glaucopis*» более эвритермная и встречается повсюду в местах обитания «*palpebrosa*», наиболее многочисленна при $t > 0^{\circ}\text{C}$, до $t +3 - +5^{\circ}\text{C}$.

2. Вооружение ловчего аппарата сепиолид не является значимым признаком для диагностирования форм «*palpebrosa*» и «*glaucopis*»: 2-х, 2 – 3-х и 2 – 4-х рядное расположение присосок на руках характерно для обеих форм. Вероятность 4-х рядного расположения присосок увеличивается с увеличением размеров особей ($p < 0,05$).

3. Типичное сепиолидное строение репродуктивной системы самок арктической россии характерно для обеих форм. Показатели индекса репродуктивной системы (ИРС) максимальны у зрелых самок из северных районов Баренцева моря – в районе Земли Франца-Иосифа ИРС достигает 34,3% ($R^2=0,8$). Показатели гонадосоматического индекса (ГСИ) могут достигать значительного процента – до 1/4 от общего веса у зрелых самок формы «*palpebrosa*» ($R^2=0,9$). У формы «*glaucopis*», которая тяготеет к

субарктической зоне, показатели ГСИ варьируют в большей степени 16,5% ($R^2=0,9$) (южные районы) – 31% ($R^2=0,8$) (северные районы). Очевидно, что в северной зоне обитания генеративная составляющая обмена выше.

4. Выделено 6 фаз развития ооцитов в яичнике, установлено наличие «резорбирующего фонда» ооцитов. Потенциальная плодовитость (ПП) у самок формы *«glaucopis»* и формы *«palpebrosa»* не превышает трех сотен ооцитов. В целом у сепиолид подсемейства *Rossiinae* ПП имеет тенденцию к увеличению в бореальном направлении.

5. Онтогенетическое развитие фонда ооцитов в гонаде арктической россии пульсирующее, нерест происходит порциями. Самки обеих форм способны откладывать яйца 3 – 6 раз. Количество яиц в порции в северных районах у самок составляет до 20, в продвижении на юг количество яиц возрастает до четырех десятков на одну порцию. Размеры зрелых ооцитов достигают 11,5 мм у самок обоих форм из северных районов, в то время как размеры ооцитов у самок из южных районов варьируют от 6,3 до 9,5 мм. Это вполне укладываются в закономерность правила Торсона – Расса.

6. Полученные нуклеотидные последовательности по фрагментам генов COI и 18S рРНК от образцов баренцевоморской арктической россии показали высокую гомологию (93 – 99%) с депонированными GenBank последовательностями изучаемых фрагментов генов образца *R.palpebrosa* из Канадской Арктики. Сравнительный анализ полученных сиквенсов по фрагментам двух генов от образцов формы *«glaucopis»* и *«palpebrosa»* не выявил никаких различий между ними в нуклеотидном составе.

7. Реконструкции филогенетических древ по разным методам демонстрирует достоверно значимую кластеризацию образца арктической россии из Баренцева моря и образца арктической россии из Канадской Арктики в анализе фрагментов нуклеотидных последовательностей генов COI (NJ = 98, ME = 99, ML = 97) и 18S рРНК (NJ = 89, ME = 91, ML = 98). Фрагмент гена COI наиболее ценен в анализе видовой идентификации и реконструкции отношений в пределах рода, в то время как фрагмент гена 18S рРНК позволяет взглянуть на эволюционные отношения десятируких головоногих на уровне отрядов.

8. Использование комбинации методов морфологического и молекулярно-генетического анализов позволило прояснить таксономический статус арктической россии *R.palpebrosa* в Баренцевом море. Обе формы принадлежат к одному политипическому виду, которым в соответствии с принципом приоритета, является *R. palpebrosa*. *R. glaucopis* должна быть отнесена к младшему синониму.