

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Биологический факультет

Беломорская биологическая станция МГУ

Московская школа на Юго-Западе №1543

**Генетическая ревизия атлантических представителей рода *Scina*
(Amphipoda, Hyperiidea, Scinidae) по материалам 87-го рейса НИС
«Академик Мстислав Келдыш»**

Никита Александрович Абрамков

Научные руководители:

к. б. н. Татьяна Владимировна Неретина

Нина Алексеевна Тутубалина

Москва 2025

Оглавление

1. Введение	3
2. Цели и задачи	5
3. Обзор литературы	5
3.1. Секвенирование ДНК: метод Сэнгера, NGS и технологии третьего поколения	5
3.2. Применение данных секвенирования в современной биологии: филогения, ДНК-баркодинг, подбор универсальных праймеров	6
3.3. Nuregidae: характеристика группы и роль в экосистеме	9
4. Материалы и методы	13
4.1. Сбор материала	13
4.2. Выделение ДНК и амплификация целевого фрагмента с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)	13
4.3. Обработка данных	14
5. Результаты	15
6. Обсуждение	17
7. Выводы	18
8. Благодарности	18
9. Вклад авторов	19
10. Приложения	19
11. Список литературы	19

1. Введение

В современной биологии наблюдается стремительное развитие молекулярно-генетических подходов, таких как ДНК-баркодинг, секвенирование по Сэнгеру и многих других, к изучению систематики и таксономии организмов.

ДНК-баркодинг — это метод молекулярной идентификации видов на основе анализа коротких стандартизированных участков генома. Он позволяет определять таксономическую принадлежность организмов, даже если их морфологическая диагностика затруднена (например, на стадии личинок или при работе с фрагментами тканей).

У беспозвоночных животных чаще всего используются следующие молекулярные маркеры для ДНК-баркодинга:

Митохондриальные гены:

- COI (цитохром-с-оксидаза, субъединица I) — наиболее популярный маркер для животных, особенно в проектах Barcode of Life (Evans, Paulay, 2012)

- 16S рРНК — ген малой субъединицы рибосомы (SSU rRNA), применяется в дополнение к COI, особенно для групп с высокой вариабельностью этого гена.

Ядерные гены:

- 18S рРНК — ген малой субъединицы рибосомы (SSU rRNA), консервативный маркер, применяемый для анализа эволюционных отношений крупных таксонов (уровень типов, классов, реже отрядов).

- 28S рРНК — ген большой субъединицы рибосомы (LSU rRNA), менее консервативен, чем 18S. Используется для разрешения таксономических вопросов на уровне семейств и отрядов.

- H3 (гистон H3) — белок-кодирующий ядерный ген с умеренной скоростью эволюции. Применяется в комбинации с другими маркерами для увеличения филогенетической поддержки (Zou Z. et al. 2023).

Сейчас происходит развитие многих направлений, связанных с эволюцией молекулярно-генетических подходов, в частности, молекулярной филогенетики. Молекулярная филогенетика — это раздел эволюционной биологии, который изучает родственные связи между организмами на основе анализа ДНК, РНК и белковых последовательностей. Она позволяет реконструировать эволюционное дерево (филогению). В частности, молекулярные методы позволили пересмотреть классификацию Hyperiidea: исследования на основе гена COI показали необходимость реорганизации этой группы (Hurt et al. 2013), а анализ генов 18S рРНК и COI выявил возможные криптические виды в роде *Themisto* (Tempestini et al. 2017; Murray et al. 2023). Также молекулярные данные способствовали уточнению филогении спорных таксонов, таких как семейства Mimonectidae и Proscinidae, положение которых в системе Hyperiidea долгое время оставалось дискуссионным (Zeidler, 2012, 2004).

Рассматриваемая в моей работе группа Hyperiidea, включающая род *Scina*, который впервые был описан Prestandrea в 1833 году, — это крупная и разнообразная группа морских амфипод (Amphipoda), широко распространённая в толще воды от поверхностных слоёв до

абиссали. В отличие от многих других амфипод, большинство гиперIID ведёт паразитический или комменсальный образ жизни, связанный с медузами, гребневиками, сальпами и другими пелагическими беспозвоночными. Некоторые виды, однако, являются свободноживущими хищниками или планктофагами (Gasca, Haddock, 2004).

Долгое время систематика Hyperiidеа основывалась преимущественно на морфологических признаках, но в последние годы их филогения была значительно пересмотрена благодаря молекулярно-генетическим методам (например, исследованиям на основе генов 18S рРНК, COI и др.). Эти данные помогли уточнить эволюционные связи внутри группы, выявить проблемные таксоны и пересмотреть традиционную классификацию (Browne et al. 2007; Tempestini et al. 2017).

Хотя COI широко используется для видовой идентификации, у некоторых пелагических ракообразных (включая гиперIID) этот ген может демонстрировать недостаточную вариабельность или проблемы с амплификацией (Browne et al. 2007; Geller et al. 2013). Поэтому в их исследованиях часто комбинируют несколько маркеров, например, COI + 18S + 28S, чтобы повысить точность филогенетических реконструкций.

Молекулярные методы, включая баркодинг, позволили пересмотреть систематику Hyperiidеа, выявить криптические виды и уточнить их эволюционные связи с другими амфиподами. Тем не менее, для многих групп данных всё ещё недостаточно, что подчёркивает необходимость дальнейших исследований.

Для многих групп, включая род *Scina*, эти методы до сих пор не были применены, что создает значительный пробел в наших знаниях об их филогении и таксономическом разнообразии.

Сложившаяся ситуация с изучением рода *Scina* характеризуется несколькими существенными проблемами. Во-первых, существующие данные основаны исключительно на морфологических признаках, что, как показали последние исследования (Zeidler, 2012), часто оказывается недостаточным для надежного разграничения видов, особенно в случаях криптического видообразования или морфологической конвергенции. Классические работы по систематике *Scina* (Vinogradov et al. 1982), несмотря на их фундаментальное значение, не учитывают генетическую изменчивость и не позволяют оценить реальное видовое разнообразие этой группы.

Во-вторых, современные исследования надсемейства Scinoidea, включающее род *Scina*, развиваются крайне неравномерно. С одной стороны, продолжаются традиционные таксономические исследования (Zeidler, 2004, 2012), ограниченные морфологическими описаниями. С другой стороны, проводятся экологические работы (Gasca, Haddock, 2004; Gasca, 2003, 2005, 2009), которые, однако, опираются на устаревшую или неполную таксономическую базу. При этом комплексные исследования, сочетающие морфологические и молекулярные подходы, для данного рода полностью отсутствуют.

Особую актуальность настоящему исследованию придает широкое распространение представителей рода *Scina* в Атлантическом океане (De Broyer et al. 2014). Отсутствие надежных молекулярных маркеров существенно ограничивает возможности изучения их филогенетических связей, анализа биогеографических закономерностей и понимания экологической роли в пелагических экосистемах.

Проводимое исследование, основанное на материалах 87-го рейса НИС «Академик Мстислав Келдыш», впервые применяет молекулярные методы для изучения и уточнения

существующей систематики рода *Scina*. Полученная информация может быть использована для дальнейших эволюционных, биогеографических и экологических исследований данной группы морских организмов, что особенно важно в условиях наблюдаемых изменений морских экосистем.

2. Цели и задачи

Целью моей научной работы является пересмотр систематики атлантических представителей рода *Scina* по генетическим данным.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить прочтения маркерного гена (COI) методом секвенирования по Сэнгеру представителей разных видов рода *Scina*, собранных в южной части Атлантического океана и в Южном океане в ходе 87-го рейса НИС «Академик Мстислав Келдыш»;
2. Сравнить результаты морфологического анализа собранных экземпляров с данными молекулярной идентификации, соотнести существующую систематику рода *Scina* с полученными молекулярными данными.

3. Обзор литературы

3.1. Секвенирование ДНК: метод Сэнгера, NGS и технологии третьего поколения

Метод Сэнгера, разработанный Фредериком Сэнгером и его коллегами в 1977 году, — это метод секвенирования ДНК, основанный на случайном включении терминирующих цепь дидезоксинуклеотидов (ddNTP) во время синтеза ДНК *in vitro* (искусственный синтез ДНК). В изначальной версии метода использовались четыре отдельные реакции, каждая содержащая один из четырех типов ddNTP, и продукты разделялись классическим электрофорезом в полиакриламидном геле (технический гель — высокомолекулярное соединение, представляющее собой сшитый полимер акриламида) (Краснов et al. 2014). Современные модификации метода Сэнгера используют флуоресцентно меченые (отмеченные специальной меткой, которая при излучении на неё светится определенным цветом в зависимости от нуклеотида) нуклеотиды, что позволяет проводить все четыре реакции в одной пробирке, а разделение фрагментов осуществляется с помощью капиллярного электрофореза (в отличие от классического электрофореза, он полностью автоматизирован, разделение происходит не в полиакриламидном геле, а в капиллярной трубке, заполненной электролитом, нуклеотиды детектируются с помощью флуоресцентных меток лазерным детектором). Эта технология обеспечивает высокую точность определения последовательности (98%) и способна генерировать прочтения длиной до 1000 пар нуклеотидов, что делает ее золотым стандартом для валидации результатов секвенирования (Краснов et al. 2014)

Секвенирование нового поколения (NGS), введенное в коммерческое использование в 2005 году, изначально называлось массивно-параллельным секвенированием, поскольку позволяло одновременно секвенировать множество цепей ДНК вместо одной за раз, как в случае с традиционным методом Сэнгера (Mardis, 2008). Платформы Illumina и схожие секвенаторы основаны на принципе секвенирования путем синтеза, где нуклеотиды добавляются к растущей цепи ДНК и каждое добавление детектируется на основе флуоресценции. В отличие от метода Сэнгера, который генерирует длинные прочтения (800-1000 пар оснований), NGS производит короткие прочтения (обычно 50-300 пар оснований), но обеспечивает значительно более высокую производительность, позволяя одновременно

анализировать миллионы фрагментов ДНК. NGS позволяет исследовать сотни и тысячи генов одновременно в множественных образцах, а также обнаруживать различные типы геномных вариаций за один запуск секвенатора (Mardis, 2008).

Технологии же третьего поколения, включающие платформы Oxford Nanopore и Pacific Biosciences, представляют собой методы секвенирования отдельных молекул, которые обеспечивают ультрадлинные прочтения без необходимости амплификации ДНК (Wang et al. 2024). Секвенирование на платформе Oxford Nanopore работает путем пропускания одиночных молекул ДНК или РНК через нанопоры (в основном — белковые), встроенные в электроустойчивую мембрану (биологическая или синтетическая мембрана, способная сохранять свою целостность и функциональность при воздействии электрических полей или токов), при этом каждое азотистое основание идентифицируется по характерному нарушению электрического тока в режиме реального времени (Clarke et al. 2009). PacBio использует технологию SMRT (Single Molecule Real-Time), которая основана на наблюдении синтеза ДНК в реальном времени с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов в специальных микроскопических ячейках (Tamang, Aryal, 2024). По сравнению с классическим методом Сэнгера, который обеспечивает прочтения длиной около 500–1000 пар оснований, современные технологии секвенирования третьего поколения, такие как PacBio и Oxford Nanopore, способны генерировать значительно более длинные прочтения. Технология PacBio обычно даёт прочтения длиной до 30 тысяч пар оснований, а нанопоровое секвенирование — прочтения в среднем в несколько тысяч пар оснований, с максимальными зарегистрированными прочтениями длиной свыше 100 тысяч пар оснований. Такая значительная длина прочтений позволяет эффективно разрешать сложные геномные регионы и повторяющиеся последовательности, которые остаются недоступными для анализа короткими прочтениями (Tamang, Aryal, 2024). Благодаря этому новые методы расширяют возможности геномных исследований и улучшают качество сборки геномов.

3.2. Применение данных секвенирования в современной биологии: филогения, ДНК-баркодинг, подбор универсальных праймеров

Современные технологии секвенирования революционизировали множество областей биологических исследований. Поиск мутаций стал более точным благодаря разработке специализированных методов, таких как HiDEF-seq, который способен детектировать ранние молекулярные изменения в ДНК с точностью до одной ошибки на 100 триллионов проанализированных пар оснований (Liu et al. 2024). Сборка геномов значительно упростилась с появлением высокопроизводительных технологий секвенирования, позволяя реконструировать полные геномные последовательности из коротких фрагментированных прочтений ДНК (Cariou et al. 2013). Филогенетические исследования получили мощный инструмент для анализа эволюционных взаимоотношений между организмами на основе сравнения гомологичных последовательностей ДНК или белков (Cariou et al. 2013). ДНК-баркодинг (метод молекулярной идентификации, который позволяет по коротким генетическим маркерам в ДНК определять принадлежность организма к определённому таксону) стал эффективным методом идентификации и аутентификации видов на основе коротких стандартизированных последовательностей ДНК, обеспечивая точность идентификации более 95% видов (Patwardhan et al. 2014).

В молекулярной филогении для построения филогенетических деревьев используются различные типы маркеров в зависимости от исследуемых групп организмов. Рибосомальная РНК считается наилучшей мишенью для изучения филогенетических взаимоотношений, поскольку она универсальна и состоит из высококонсервативных и вариабельных доменов

(устойчивые участки ДНК), (Lopez-Garcia et al. 2010). Ядерные рибосомальные гены, включая 18S и 28S рРНК, кодируются в едином рДНК-кластере, транскрибируемом двумя различными РНК-полимеразами (Lopez-Garcia et al. 2010). Внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS) ядерной рибосомальной ДНК являются наиболее широко используемыми маркерами для филогенетических исследований растений на низких таксономических уровнях (Logacheva et al. 2010). Гены различных белков, таких как цитохром с оксидаза I (COI) и гистон H3, широко распространены и используются в филогенетических исследованиях различных групп организмов (Gupta, 1998). У беспозвоночных COI часто применяется для анализа филогенетики ракообразных, моллюсков и других групп, где он служит эффективным маркером для построения филогенетических деревьев и идентификации видов. Гистон H3 используется для уточнения филогенетических связей на уровне родов и семейств у беспозвоночных. У позвоночных COI применяется для филогеографии и таксономии птиц, млекопитающих и рыб, позволяя различать близкородственные виды и популяции. Гистон H3 также используется в филогенетике позвоночных для анализа ядерных генов, дополняя митохондриальные данные и помогая реконструировать эволюционные взаимоотношения.

Современные подходы к филогении основаны на использовании геномных данных и консервативных молекулярных маркеров, что позволяет более точно реконструировать эволюционные взаимоотношения между микроорганизмами. В отличие от ранних моделей, которые опирались на анализ консервативных инделей в белковых последовательностях, как это предложил Gupta в 1998 году (Gupta, 1998), современные исследования базируются на комплексном анализе полногеномных последовательностей и универсальных белковых маркеров. В частности, системы, такие как Genome Taxonomy Database (GTDB), разработанная Parks и коллегами в 2018 году, стандартизируют классификацию микроорганизмов на основе анализа десятков консервативных генов, что значительно повышает разрешающую способность филогенетических деревьев и минимизирует ошибки, вызванные рекомбинацией или горизонтальным переносом генов (Parks D.H. et al. 2018). Анализ консервативных белковых доменов, например, рибосомальных белков, позволяет разделять таксоны даже на уровне штаммов, а применение современных методов машинного обучения способствует выявлению сложных эволюционных связей и функциональных кластеров. Такие подходы особенно эффективны при изучении некультивируемых микроорганизмов, что стало возможным благодаря интеграции метагеномных данных. Например, в исследованиях метанотрофных бактерий, таких как *Methylocapsa palsarum*, сочетание GTDB-таксономии и филогенетического анализа белковых семейств GH39 и GH65 позволило уточнить происхождение ферментов, выявить их факультативные функции и отклонить ошибочные предсказания активности (Наумов Д.Г., Дедыш С.Н., 2023). Таким образом, современные методы филогении, основанные на работах Hugenholtz, Parks и их коллег (Parks D.H. et al. 2018), обеспечивают надежную и детальную основу для изучения микробной эволюции, функциональной адаптации и таксономического разнообразия, значительно превосходя по точности и информативности более ранние модели, основанные на анализе консервативных инделей.

Процесс построения филогенетического дерева начинается с множественного выравнивания последовательностей, которое является обязательным этапом в молекулярной филогении. Выравнивание последовательностей может быть парным или множественным, глобальным или локальным, при этом цель состоит в идентификации гомологичных позиций в молекулярных последовательностях.

Существуют две основные категории методов построения филогенетических деревьев: дистанционные методы и методы, основанные на признаках (Zou et al. 2024). Дистанционные методы, такие как UPGMA и neighbor-joining, сначала преобразуют матрицу признаков в матрицу расстояний для представления эволюционных дистанций между парами видов (Zou et al. 2024). Методы, основанные на признаках, включают максимальную парсимонию (метод в филогенетике, использующийся для построения эволюционных деревьев, основанный на предпочтении к дереву с наименьшим числом мутаций), которая минимизирует общее количество изменений состояний признаков, и максимальное правдоподобие (статистический подход к построению эволюционного дерева, который ищет наиболее вероятную филогенетическую гипотезу, исходя из заданной модели эволюции), которое использует статистическую структуру для оценки параметров в вероятностной модели генерации данных (Zou et al. 2024). Аутгруппа представляет собой более отдаленно родственную группу организмов по сравнению с исследуемыми, к примеру, если исследуют род, то аутгруппой будет один из видов ближайшего к исследуемому роду. Аутгруппа необходима для укоренения филогенетического дерева (Maddison et al. 1984).

Субъединица I цитохром с оксидазы (COI-5P (5P- это 5 prime (обозначение одного из концов молекулы нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), где находится пятый углерод в молекуле сахара (дезоксирибозы или рибозы), связанный с фосфатной группой))) является основным маркером, используемым в ДНК-баркодинге животных. Это компонент последнего фермента в цепи переноса электронов, который необходим для аэробного клеточного дыхания и энергетического обмена (Nugent et al. 2020). COI-5P имеет особые селективные ограничения, связанные с сильным отрицательным отбором против изменений в аминокислотной последовательности, которые могут нарушить структуру и функцию белка, особенно против изменений соответствующей аминокислотной последовательности, которые модифицируют структуру белка и негативно влияют на метаболизм (Nugent et al. 2020). Стандартный фрагмент COI длиной 658 пар оснований успешно используется для баркодинга широкого спектра морских беспозвоночных, включая представителей восьми основных типов: Annelida, Arthropoda, Chordata, Cnidaria, Echinodermata, Mollusca, Nemertea и Platyhelminthes (Lobo et al. 2013). Поскольку аминокислотная последовательность в области COI-5P высоко консервативна, большинство инсерций (включения одного или нескольких лишних нуклеотидов) и делеций (выпадения одного или нескольких нуклеотидов), вызывающих сдвиг рамки считывания при трансляции, скорее всего являются техническими артефактами. Это делает трансляцию нуклеотидных последовательностей надёжным способом выявления таких ошибок. (Nugent et al. 2020).

Универсальные праймеры широко используются в молекулярных экологических исследованиях, где один и тот же локус анализируется в широком диапазоне таксонов из разных типов (Lobo et al. 2013). Праймеры Фолмера (HCO2198-LCO1490) для амплификации фрагмента длиной в 658 пар нуклеотидов 5'-конца митохондриального гена цитохром с оксидазы субъединицы I показали большой успех в амплификации этого генного фрагмента у широкого спектра морских многоклеточных типов (Geller et al. 2013; Lobo et al. 2013; Folmer et al. 1994)

Для решения проблем с универсальностью существующих праймеров были разработаны усовершенствованные праймеры, способные амплифицировать область COI-5P у широкого спектра морских организмов (Lobo et al. 2013). Неразрушающие методы экстракции ДНК (например, вымачивание, контактное вытирание, извлечение из аморфных биологических следов, микропробоотбор, электроэлюция и другие) показывают перспективы для

метабаркодинга (метод идентификации таксономического состава сообщества организмов по образцам окружающей среды путём анализа последовательностей маркерных генов-баркодов) беспозвоночных образцов, позволяя использовать образцы как для метабаркодинга, так и для построения референсных библиотек ДНК-баркодов (Carew et al. 2018).

3.3. Hyperiididae: характеристика группы и роль в экосистеме

Гипериидные амфиподы представляют собой исключительно морских пелагических ракообразных с широким вертикальным распространением в океанах. В соответствии со старой литературой, видов приблизительно 260 видов по всему миру (Vinogradov et al. 1982). Типичный представитель гипериид имеет пухлое, округлое тело и большие глаза, занимающие большую часть боковой поверхности глубокой шаровидной головы (рис. 1) (Laval, 1980). Подотряд также характеризуется отсутствием щупика максиллипеда, слиянием второго и третьего уросомальных сегментов и отсутствием или малым размером кокс (Vinogradov et al. 1982).

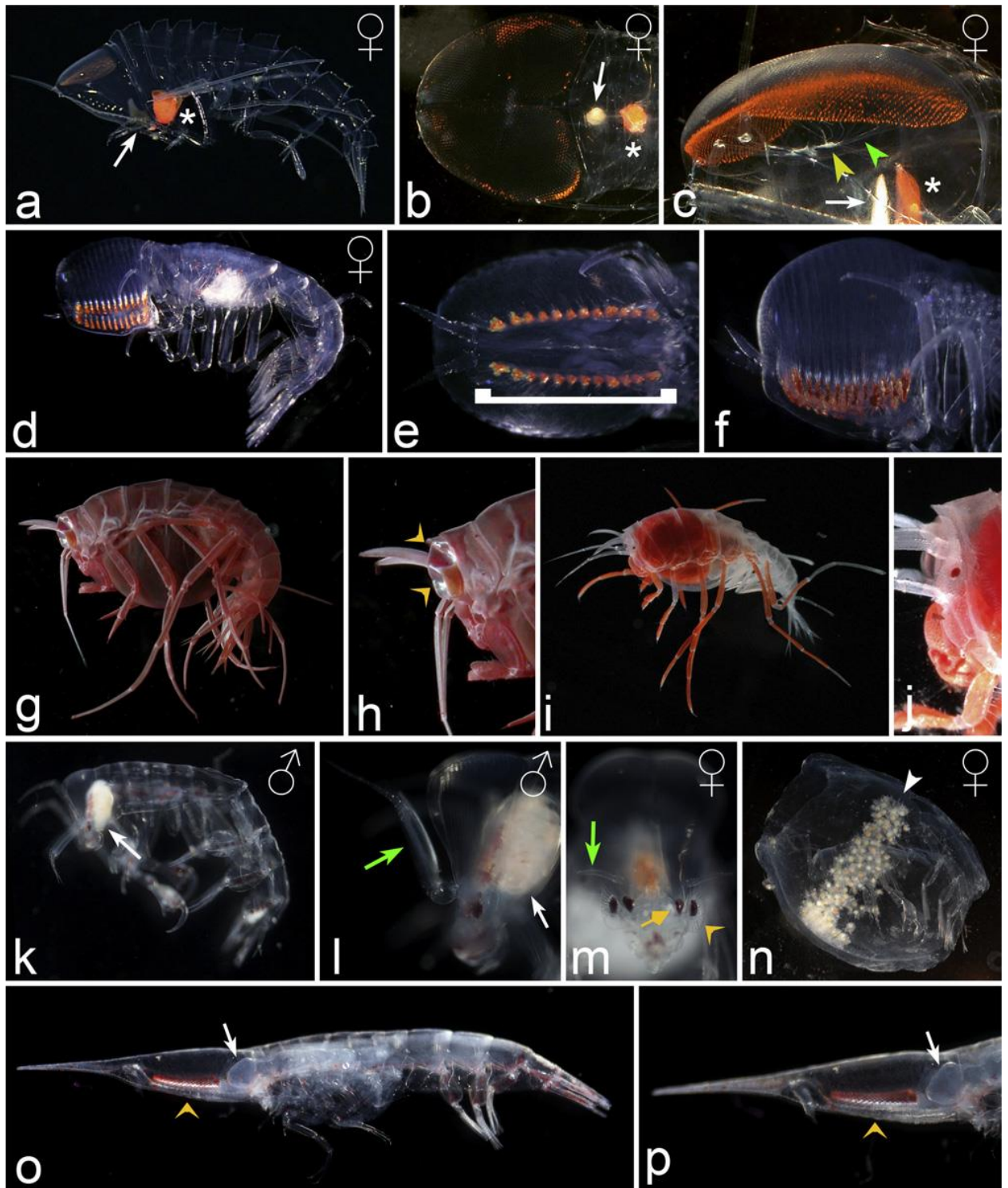


Рис. 1. Типичные представители Гипериид. (a) Вид *Cystisoma pellucida* сбоку, (b) Вид головки и передней стенки цистизомы сзади, (c) Переднелатеральный вид цистизомы, (d) Вид сбоку на *Paraphronima gracilis*, (e) Вид головы спереди, (f) Крупный план головы *Paraphronima* сбоку, (g) Вид сбоку *Scypholanceola* sp., (h) Крупный план головы *Scypholanceola*, (i) Вид *Lanceola loveni* сбоку, (j) Крупный план головки ланцетника, (k) Вид сбоку на самца *Phronima sedentaria*, (l) Голова френимы крупным планом, (m) Переднебрюхий вид самки *Phronima sedentaria*, (n) Самка *Phronima sedentaria* в 'бочке', изготовленной из ткани тальника, (o) Вид *Streetsia challengerii* сбоку, (p) Голова стритсии крупным планом) (Hurt et al. 2013).

Многие гиперIIDные амфиподы имеют сложные жизненные циклы, включающие симбиотические взаимоотношения с желатинозным зоопланктоном, таким как сцифоидные медузы, сифонофоры, ктенофоры или сальпы, но некоторые являются свободноживущими хищниками (Hurt et al. 2013).

Согласно Всемирной базе данных амфипод, в 2025 году известно 284 вида Hyperiidea. Семейство Hyperiidae является одним из 20–23 признанных семейств в подотряде, при этом существует некоторые споры относительно точного числа семейств в зависимости от таксономического положения такой группы, как Thaumtopsidae (считаются они отдельными относительно их таксономического положения в составе подотряда Hyperiidea или нет; в научных исследованиях ведутся споры, считать ли Thaumtopsidae отдельным семейством или включать его в состав других семейств Hyperiidea, например, в семейство Hyperiidae или близкие по филогении группы). ГиперIIDные амфиподы распространены по всему миру, преимущественно в Атлантическом, Тихом и Южном океанах, их ареал может простирается от прибрежных районов до глубоководных сред в зависимости от вида (Burrige et al. 2016). Исследования показывают максимальное видовое и родовое богатство этой группы в экваториальной области апвеллинга (до 35 видов, 27 родов на место сбора данных), что в значительной степени обусловлено увеличенным разнообразием представителей надсемейства Platysceloidea (Burrige et al. 2016). Большинство семейств Hyperiidea ограничены теплыми водами, встречаясь только до 34–38°S, в то время как семейство Hyperiidae показывает иную картину, спорадически встречаясь в теплых водах, но доминируя в субантарктических водах (Burrige et al. 2016).

Первое многолокусное молекулярно-филогенетическое исследование взаимоотношений среди гиперIIDных амфипод было проведено с использованием 51 вида, принадлежащих к 16 из 23 признанных гиперIIDных семейств, для трех ядерных локусов (18S, 28S и H3) и митохондриального COI (Hurt, Haddock, Browne, 2013). Результаты показали поддержку трех монофилетических клад (то есть групп, включающих всех потомков одного общего предка) в пределах инфраотряда Physocephalata: Platysceloidea, Vibilioidea и Phronimoidea (рис. 2) (Hurt et al. 2013).

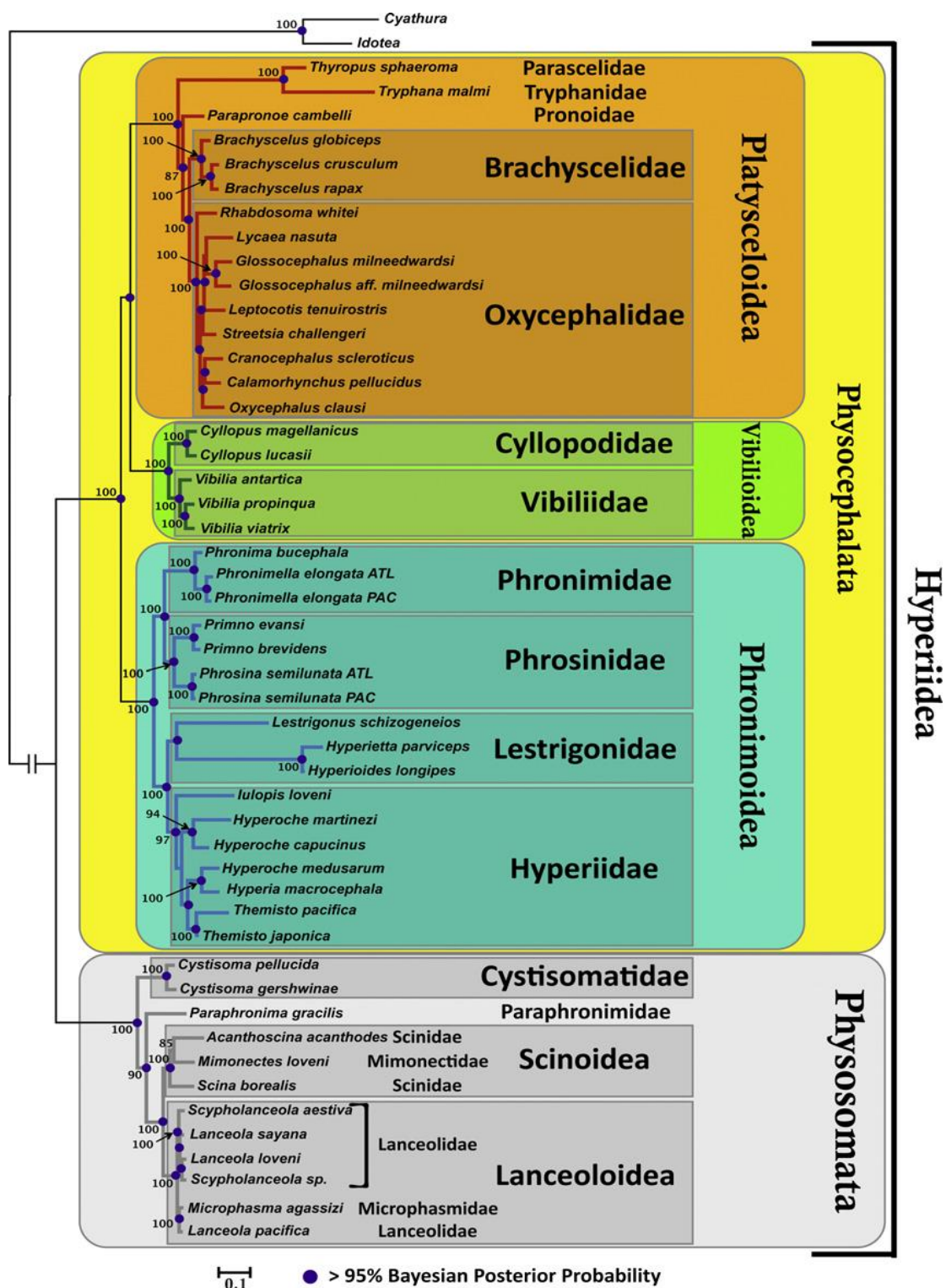


Рис. 2. Филогенетическое дерево Hyperiidea (Объединенные оценки дерева видов для объединенного набора данных с использованием байесовского критерия, выполненного MrBayes, и критерия максимального правдоподобия (ML), выполненного RAxML. Метки узлов указывают на поддержку апостериорной вероятности >95% и поддержку bootstrap >85% для байесовского и ML-деревьев соответственно) (Hurt et al. 2013).

Молекулярный анализ также прояснил неясное таксономическое положение Cystisomatidae и Paraphronimidae, поместив их в основание инфраотряда Physosomata, предполагая, что Physosomata в традиционном понимании является парафилетической группой (то есть

группой, включающей не всех потомков одного общего предка) (Hurt et al. 2013). Исследования выявили сильную поддержку клады Lestrigonidae, состоящей из *Hyperioidea*, *Hyperietta* и *Lestrigonus*, предложенной в статье Zeidler, 2004, которая имеет надежную bootstrap-поддержку сестринских групповых взаимоотношений с Hyperiidae (Zeidler, 2004; Hurt et al. 2013). В пределах Hyperiidae была обнаружена сильная поддержка группы, включающей роды *Iulopsis*, *Hyperoche*, *Hyperia* и *Themisto* (Hurt et al. 2013).

Род *Scina* (семейство Scinidae) населяет мезопелагические воды на глубинах свыше 200 м, представляя сообщество, которое остается в значительной степени неизученным (Zeidler, 2004). Виды *Scina* демонстрируют широкое географическое распространение: девять видов были зарегистрированы у западной Мексики, включая Калифорнийский залив, а также у берегов Гавайских островов (Zeidler, 2004).

Несмотря на морфологические исследования различных видов этого рода, молекулярные исследования разных видов рода *Scina* отсутствуют, из-за чего в понимании в понимании филогенетических взаимоотношений и потенциального криптического разнообразия внутри этой группы есть значительный пробел.

4. Материалы и методы

4.1. Сбор материала

Сбор материала проводили в южной части Атлантического океана и в Южном океане в ходе 87-го рейса НИС «Академик Мстислав Келдыш» с 7 декабря 2021 года по 6 апреля 2022 года. В коллекцию отбирали морских амфипод (Amphipoda) группы Hyperiidea, включающую род *Scina*. Собранные образцы определяли, по возможности, до вида (Vinogradov et al. 1982). Данные о месте и времени сбора и о таксономическом положении образца заносили в рабочий журнал. Каждый образец получал индивидуальный номер и буквы — маркировку спиртовой коллекции Беломорской биостанции МГУ, филиала коллекции Зоологического музея МГУ им. М. В. Ломоносова (начинающуюся на WS).

4.2. Выделение ДНК и амплификация целевого фрагмента с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для прочтения ДНК использовался метод Сэнгера (цепное терминаторное секвенирование) — классический способ определения последовательности ДНК. Он основан на синтезе комплементарной цепи ДНК с включением дидезоксинуклеотидов (ddNTP), которые останавливают удлинение цепи. Для всех полученных образцов ДНК амплифицировали участки маркерного гена COI.

Для выделения ДНК из плеоподы *Scina* использовался набор QIAamp Fast DNA Tissue Kit согласно протоколу производителя.

Для амплификации фрагмента гена COI применяли ПЦР с использованием 5x ScreenMix от компании Евроген. В одну пробирку реакционной смеси добавляли 14 мкл воды mQ, по 0,4 мкл прямого и обратного праймера концентрацией 10 пмоль/мкл, 4 мкл ScreenMix и 1,6 мкл ДНК-матрицы. Реакция ПЦР проводилась в 40 циклов со следующим температурным режимом: начальный разогрев 5 минут при 95°C, далее 40 циклов по 15 секунд при 95°C, 30 секунд при 45°C (для праймеров ZPlanc (табл. 1)) или 47°C (для праймеров jgCOI (табл. 1)), и 1 минута при 72°C, с завершающей элонгацией 5 минут при 72°C.

Таблица 1. Последовательности и названия праймеров, использованных в работе.

Название праймеров	Последовательность	Источник праймеров
jgLCO1490, jgHCO2198	Прямой праймер: 5' tgtaaacgacggccagtTITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG 3' Обратный праймер: 5' caggaacagctatgacTAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA 3'	Geller et al., 2013
ZplankF1_t1, ZplankR1_t1	Прямой праймер: 5' tgtaaacgacggccagtTCTASWAATCATAARGATATTGG 3' Обратный праймер: 5' caggaacagctatgacTTCAGGRTGRCCRAARAATCA 3'	Prosser et al., 2013

Из каждой пробирки ПЦР-продукт в объеме 1 мкл подвергали переосаждению. Для этого добавляли 50 мкл смеси для переосаждения, содержащей 43 мкл 96% этанола, 1,5 мкл 5М ацетата аммония и 4,7 мкл ddH₂O. Смесь перемешивали пипетированием, центрифугировали 20 минут при 2200 g и 4°C. После удаления супернатанта пробирки с осадком сушили при 40°C до полного исчезновения капель жидкости.

Для секвенирования готовили реакционную смесь на 48 пробирок с запасом на ошибки пипетирования. В одну смесь входили 49 мкл праймера M13 (прямого или обратного, 10 пмоль/мкл), 24 мкл реактива NovaDye и 86 мкл буфера из набора NovaDye Terminator Cycle Sequencing Kit, 288 мкл воды и 43 мкл смеси DMSO и бетаина. Эту смесь распределяли по 9,5 мкл на каждый образец.

Секвенсовую реакцию проводили при следующем температурном режиме: 1 минута при 96°C, затем 25 циклов по 15 секунд при 96°C, 5 секунд при 55°C, 4 минуты при 60°C.

После секвенсовой реакции продукт также подвергали переосаждению, добавляя 55 мкл смеси ацетата аммония и спирта, инкубируя 20 минут при 4°C, затем центрифугируя 20 минут при 2200 g и 4°C. После удаления супернатанта осадок сушили при 40°C до исчезновения жидкости.

В каждую лунку плашки для секвенирования добавляли по 11 мкл формамида, инкубировали при 95°C в течение 3 минут и загружали образцы в секвенатор (8-капиллярный 3500 Genetic Analyzer) для последующего анализа.

4.3. Обработка данных

Basecalling был проведен при помощи программы KB, после чего полученные хроматограммы были просмотрены вручную для проверки, что нуклеотиды распознаны верно.

Мы проводили множественное выравнивание полученных последовательностей с помощью программы MAFFT v7 и сравнивали их с депонированными в базе данных GenBank NCBI (табл. 2) последовательностями того же фрагмента ДНК исследуемых видов.

Таблица 2. Образцы, использованные в исследовании.

ID	Номер в коллекции ББС МГУ	Источник	Вид
XZ7804	ZMMU WS25422	Эта работа	<i>Scina sp.</i>
XZ7148	ZMMU WS20378	Эта работа	<i>Scina borealis</i>
XZ7802	ZMMU WS25419	Эта работа	<i>Scina sp.</i>
XZ7112	ZMMU WS20233	Эта работа	<i>Scina borealis</i>

XZ7144	ZMMU WS20374	Эта работа	<i>Scina crassicornis</i>
XZ7863	ZMMU WS25508	Эта работа	<i>Scina crassicornis</i>
XZ7106	ZMMU WS20326	Эта работа	<i>Scina curvidactyla</i>
XZ7068	ZMMU WS20257	Эта работа	<i>Scina marginata</i>
XZ7221	ZMMU WS20469	Эта работа	<i>Scina rattrayi</i>
XZ7070	ZMMU WS20259	Эта работа	<i>Scina tullbergi</i>
XZ7063	-	Эта работа	-
MW124711.1	-	GenBank	<i>Scina sp.</i>
MH572572.1	-	GenBank	<i>Scina cf. curvidactyla</i>
MH572677.1	-	GenBank	<i>Scina cf. curvidactyla</i>
EF989699.1	-	GenBank	<i>Scina borealis</i>
MW124655.1	-	GenBank	<i>Scina sp.</i>
MW124686.1	-	GenBank	<i>Scina sp.</i>
MW124687.1	-	GenBank	<i>Scina sp.</i>
MH572571.1	-	GenBank	<i>Scina curvidactyla</i>
OR211370.1	-	GenBank	<i>Themisto abyssorum</i>

Далее мы строили филогенетическое дерево на данных, полученных с MAFFT, на сайте NGPhylogeny с помощью алгоритма PhyML+SMS, помечая цветом вид образца и указывая в подписях его номер, для того, чтобы можно было далее сверить филогенетические данные с определением по морфологическим признакам. За аутгруппу была взята *Themisto abyssorum* (OR211370.1 в GenBank, табл. 2).

После чего выравнивание, полученное при помощи MAFFT, было переведено с помощью программы MEGA в формат NEXUS для работы с программой PopArt. В программе PopArt был построен еще один график — сеть гаплотипов. Этот график визуализирует отношения между отдельными уникальными последовательностями исследуемого гена. На нём каждый из видов получил свой цвет, цвета отображены в легенде графика.

5. Результаты

Было получено 11 последовательностей гена COI различных особей из рода *Scina*. В полученном множественном выравнивании все полиморфизмы были валидированы. На полученном филогенетическом дереве (рис. 3) можно видеть, что вид *Scina curvidactyla* не монофилетичен, а остальные виды, представленные более, чем одной последовательностью, образуют монофилетические группы. Образец XZ7063 не был найден в данных экспедиции, но, судя по топологии дерева, принадлежит роду *Scina*.

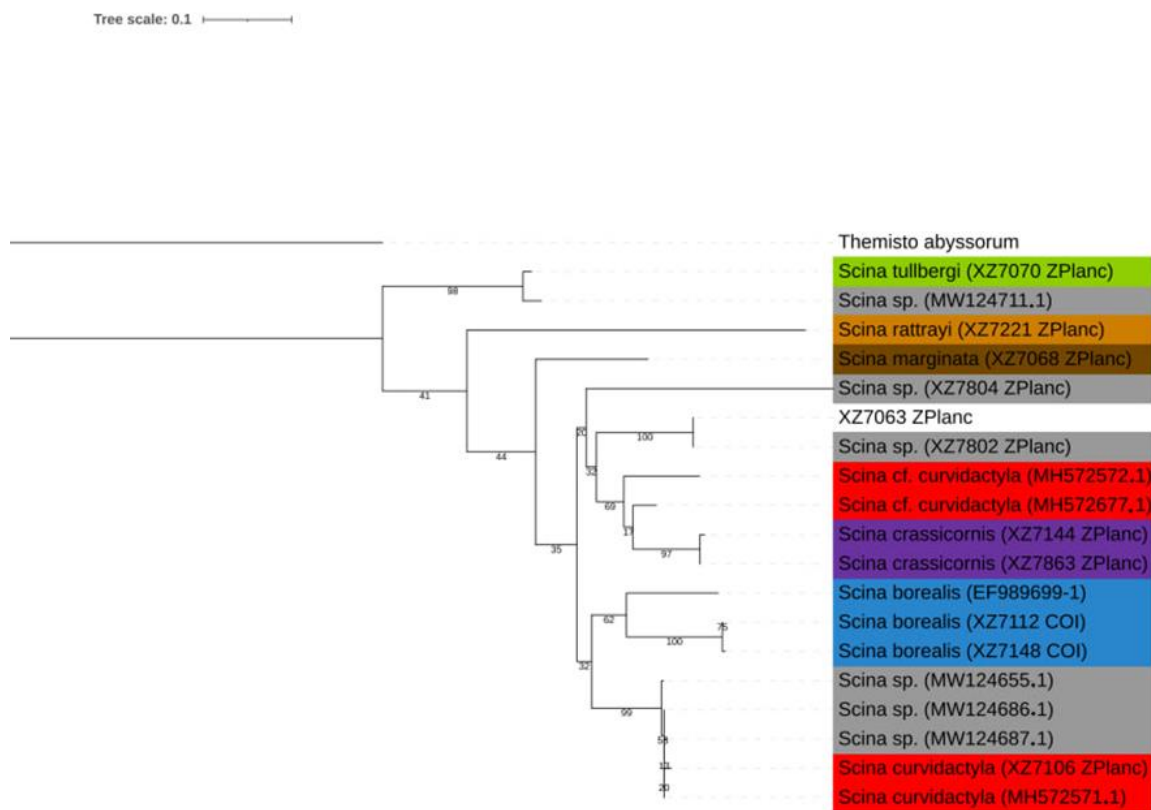


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное по последовательности участка COI особей различных видов рода *Scina*. Различные цвета соответствуют различным видам *Scina*. Надписи «COI» и «ZPlanc» обозначают использованные праймеры: jgLCO1490/jgHCO2198 или ZplankF1_t1/ZplankR1_t1 соответственно.

Была получена сеть гаплотипов (рис. 4), характеризующая распределение гаплотипов в роде *Scina*. Конструкция сети позволила выявить структуру генетического разнообразия и установить взаимосвязи между различными гаплотипами.

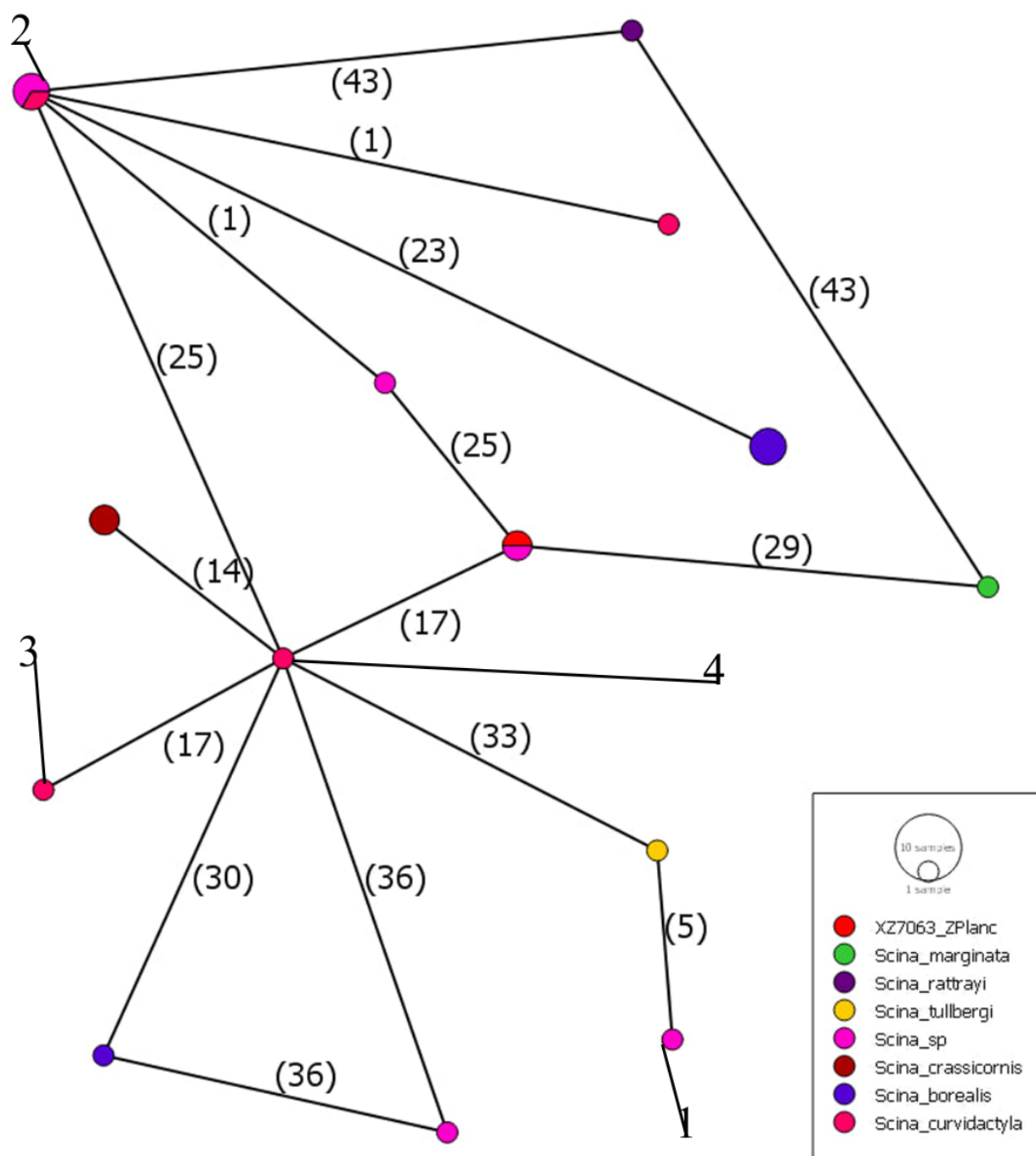


Рис. 4. Сеть гаплотипов. Один круг обозначает один гаплотип, цвета обозначают принадлежность к тому или иному виду, числа в скобках обозначают число нуклеотидов, на которые отличается этот гаплотип от соседнего с ним. Числами отмечены четыре гаплотипа, упомянутые в тексте статьи.

На построенной сети гаплотипов (рис. 4) можно видеть, что *Scina curvidactyla* не образует одну группу, а представлена тремя сильно отличающимися гаплотипами и еще четвертым, который отличается от одного из них только одной заменой.

Scina borealis представлена тремя последовательностями, две из которых одинаковые, а одна значительно отличается от остальных.

Помимо этого, три образца *Scina sp.* так и не были определены. Один из них, скорее всего, *Scina curvidactyla* (рис. 4, отметка 2), другой — *Scina tullbergi* (рис. 4, отметка 1).

6. Обсуждение

Обнаружение четырех гаплотипов у *Scina curvidactyla*, скорее всего, объясняется неправильным определением образцов МН572572-1 (рис. 4, отметка 3) и МН572677-1 (рис. 4, отметка 4), так как в GenBank в их названии было отмечено, что в их определении нельзя быть уверенными («cf» в латинском названии вида). Но также, теоретически, это может отражать сложную популяционную структуру, значительную географическую или экологическую изоляцию, исторические процессы, способствовавшие дивергенции внутри вида, или возможное присутствие криптических видов, которые не были обнаружены до этого. Для однозначной оценки необходимы дополнительные исследования по географии и генетике, включающие анализ ядерных маркеров.

Наличие двух гаплотипов у *Scina borealis* также может быть объяснено неверным определением, либо же внутренним разнообразием внутри вида, так как на филогенетическом дереве (рис. 3) *Scina borealis* образует монофилетическую кладу. Хотя существует вероятность неправильного определения вида, построенное филогенетическое древо ставит эту гипотезу под сомнение.

Многие исследуемые представители рода *Scina* не были определены до вида, что затрудняет анализ данных. Из особей, собранных в рейсе судна «Академик Мстислав Келдыш», не было определено 2 особи *Scina*, из последовательностей, взятых из GenBank, до вида не были определены 4 особи.

Но филогенетический анализ в случае не определенных до вида образцов, видимо, позволяет их определить до вида (*Scina curvidactyla* в случае образцов MW124686-1 и MW124686-1 и *Scina tullbergi* для образца MW124711-1) (рис. 3 и 4).

Результаты подчеркивают важность комплексного подхода к изучению биоразнообразия рода *Scina*, включая расширение географического и маркерного охвата для более глубокого понимания эволюционной истории и генетической структуры популяций.

7. Выводы

1. В результате секвенирования маркерного гена COI у представителей рода *Scina*, собранных в ходе 87-го рейса НИС «Академик Мстислав Келдыш», было получено 11 последовательностей.

2. Биоинформатический анализ этих последовательностей показал, что виды *Scina curvidactyla* и *Scina borealis* имеют по несколько сильно отличающихся гаплотипов, что может быть связано с ошибками определения видов или сложной популяционной структурой, включая возможное наличие криптических видов.

Филогенетический анализ позволил уточнить или подтвердить видовую принадлежность ряда образцов, в том числе не полностью идентифицированных ранее.

Результаты подчеркивают необходимость увеличения размера выборки, расширения географического охвата и применение дополнительных генетических маркеров (например, ядерных).

8. Благодарности

Благодарю Татьяну Владимировну Неретину и Нину Алексеевну Тутубалину за научное руководство, Николая Юрьевича Неретина — за сбор и определение образцов, Степана Бахмарина за помощь в обработке хроматограмм, экипаж НИС «Академик Мстислав Келдыш» — за проведение рейса. Также отдельно благодарю Сергея Менделивича

Глаголева за организацию лабораторной практики и Владимира Вениаминовича Алёшина за написание рецензии на эту работу.

9. Вклад авторов

Сбор образцов, каталогизацию и определение проводил Николай Юрьевич Неретин, выделение ДНК, подготовку библиотек и секвенирование — Татьяна Владимировна Неретина, обработкой хроматограмм занимались я, Никита Абрамков, Нина Алексеевна Тутубалина и Степан Бахмарин, написанием текста, построением филогенетического дерева и сети гаплотипов — я.

10. Приложения

Исходные и промежуточные данные, использованные в работе, доступны по следующей ссылке:

https://drive.google.com/drive/folders/17D7DQjQ1bRQj11kfjPqwnf6Fp3atLDU?usp=drive_link

По ней доступны следующие файлы:

«Scina_table» — таблица из экспедиции, где хранятся данные о собранных образцах *Scina* из экспедиции;

«SCINA.fasta» — выравнивание в формате fasta, в котором хранятся выравненные последовательности образцов рода *Scina* из GenBank и из экспедиции, а также аутгруппа *Themisto abyssorum*;

«SCINA.nex» — выравнивание в формате NEXUS для сети гаплотипов, в котором находятся образцы из GenBank и из экспедиции без аутгруппы;

«Scina_reads.rar» — это исходные хроматограммы, полученные нами;

«Scina_PhyML_newick_tree.nhx» — филогенетическое дерево в формате newick.

11. Список литературы

1. Browne W.E., Haddock S.H.D., Martindale M.Q. Phylogenetic analysis of lineage relationships among hyperiid amphipods as revealed by examination of the mitochondrial gene, cytochrome oxidase I (COI). Integrative and Comparative Biology, 2007, v.47, №6, p. 815–830
2. Carew M.E., Coleman R.A., Hoffmann A.A. Can non-destructive DNA extraction of bulk invertebrate samples be used for metabarcoding? Metabarcoding and Metagenomics, 2018, v.2 №e26810, p. 1-22
3. Cariou M., Duret L., Charlat S. Is RAD-seq suitable for phylogenetic inference? An in silico assessment and optimization. Ecology and Evolution, 2013, v.3, №4, pp. 846–852
4. Clarke J., Wu H.-C., Jayasinghe L., Patel A., Reid S., Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. Nature Nanotechnology, 2009, v.4, №4, p. 265–270
5. De Broyer C., Koubbi P., Griffiths H.J., Raymond B., Udekem d'Acoz C. d', Van de Putte A.P., Danis B., David B., Grant S., Gutt J., Held C., Hosie G., Huettmann F., Post A., Ropert-Coudert Y. (eds.). Biogeographic Atlas of the Southern Ocean. Scientific Committee on Antarctic Research (SCAR), Cambridge, 2014.- 498 p.

6. Evans N., Paulay G. DNA Barcoding Methods for Invertebrates. *Methods in Molecular Biology*, 2012, v.858, №6, p. 47-77
7. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, v.3, №5, p. 294–299
8. Gasca R., Haddock S.H.D. Associations between gelatinous zooplankton and hyperiid amphipods (Crustacea: Peracarida) in the Gulf of California. *Hydrobiologia*, 2004, v.530/531, №1, p. 529–535
9. Gasca R. Hyperiid Amphipods (Crustacea: Peracarida) and Spring Mesoscale Features in the Gulf of Mexico. *Marine Ecology*, 2003, v.24, №4, p. 303–317
10. Gasca R. Hyperiid Amphipods (Crustacea: Peracarida) in Mexican Waters of the Pacific Ocean. *Pacific Science*, 2009, v.63, №1, p. 83–95
11. Gasca R. The male of the deep-living hyperiid *Hyperoche shihi* Gasca, 2005 (Peracarida: Amphipoda) and a new symbiotic association in the Gulf of California. *Crustaceana*, 2005, v.86, №13, p. 1539-1549
12. Geller J., Meyer C., Parker M., Hawk H. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, 2013, v.13, №5, p. 1-11
13. Gupta R.S. Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *Microbiological Molecular Biology Reviews*, 1998, v.62, №4, p. 1435–1491
14. Hurt C., Haddock S.H.D., Browne W.E. Molecular phylogenetic evidence for the reorganization of the Hyperiid amphipods, a diverse group of pelagic crustaceans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, v.67, №1, p. 28–37
15. Laval P. Hyperiid amphipods as crustacean parasitoids associated with gelatinous zooplankton. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 1980, v.18, p. 11–56
16. Liu M. H., Costa B. M., Bianchini E. C., Choi U., Bandler R. C., Lassen E., Grońska-Pęski M., Schwing A., Murphy Z. R., Rosenkjær D., Picciotto S., Bianchi V., Stengs L., Edwards M., Nunes N. M., Loh C. A., Truong T. K., Brand R. E., Pastinen T., Wagner J. R., Skytte A.-B., Tabori U., Shoag J. E., Evrony G. D. DNA mismatch and damage patterns revealed by single molecule sequencing. *Nature*, 2024, v.630, №8017, p. 752–761
17. Lobo J., Snokrala S., Costa P.M., Hajibabaei M., Costa M.H. Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. *Frontiers in Zoology*, 2013, v.10, article 34
18. Logacheva M.D., Valiejo-Roman C.M., Degtjareva G.V., Stratton J.M., Downie S.R., Samigullin T.H., Pimenov M.G. A comparison of nrDNA ITS and ETS loci for phylogenetic inference in the Umbelliferae: an example from tribe Tordylieae. *Plant Systematics and Evolution*, 2010, v.288, №3–4, p. 161–176
19. López-García P., Philippe H., Gail F., Moreira D. Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2010, v.100, №2, pp. 697–702
20. Maddison W. P., Donoghue M. J., Maddison, D. R. Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology*, 1984, v.33, №1, p. 83–103
21. Mardis, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2008, v.9, p. 387–402.
22. Murray A., Præbel K., Desiderato A., Auel H., Havermans C. Phylogeography and molecular diversity of two highly abundant Themisto amphipod species in a rapidly changing Arctic Ocean. *Ecology and Evolution*, 2023, v.13, №8, p. 1-15

23. Nugent C.M., Elliott T.A., Ratnasingham S., Adamowicz S.J. A package for cytochrome c oxidase I (COI) DNA barcode data cleaning, translation, and error evaluation. *Methods in Ecology and Evolution*, 2020, v.11, №3, p. 332–339
24. Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarszewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 2018, v.36, №10, p. 996-1004
25. Patwardhan A., Ray S., Roy A. Molecular Markers in Phylogenetic Studies - A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2014, v.2, №2, article 131
26. Prosser S., Martinez-Arce A., Elías-Gutiérrez, M. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources*, 2013, v.13, №6, p. 1103-1113
27. Tamang S., Aryal S. PacBio Sequencing: Principle, Steps, Types, Uses, Diagram. *MicrobeNotes*, 2024
28. Tempestini A., Fortier L., Pinchuk A., Dufresne F. Molecular phylogeny of the genus *Themisto* (Guérin, 1925) (Amphipoda: Hyperiidae) in the Northern Hemisphere. *Journal of Crustacean Biology*, 2017, v.37, №6, p. 732-742
29. Vinogradov M.E., Volkov A.F., Semenova T.N. *Hyperiid Amphipods (Amphipoda, Hyperiidea) of the World Oceans*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1982. – 632 p.
30. Wang Y., Li J., Wang, Z., Zhang, M., Zhang, Y. The research progress of single-molecule sequencing and its significance in nucleic acid metrology. *Biosensors (Basel)*, 2025, v.15, №4, p. 1-18
31. Zeidler W. A review of the hyperiidean amphipod families Mimonectidae and Proscinidae (Crustacea: Amphipoda: Hyperiidea: Scinoidea). *Zootaxa*, 2012, №3533, p. 1-74
32. Zeidler W. A review of the families and genera of the hyperiidean amphipod superfamily *Lycaeopsoidea* Bowman & Gruner, 1973 (Crustacea: Amphipoda: Hyperiidea). *Zootaxa*, 2004, №520, p. 1–18
33. Zou Z., Zhang H., Zeng Y., Hu S., Hao B., Huang Y., Li W. Common Methods for Phylogenetic Tree Construction and Their Implementation in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 2023, v.14, №1, p. 1–14.
34. Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Черкасов А.В. Современные методы секвенирования ДНК (обзор). *Микробиология*, 2014. v.86, №1, p.71–84
35. Наумов Д.Г., Дедыш С.Н. Гликозил-гидролазы облигатного метанотрофа *Methyloferula stellata*: необычная эволюционная стратегия без дальних горизонтальных переносов. *Микробиология*. 2023. v. 92, №3. p. 243–249