

Санкт-Петербургский государственный университет  
Кафедра генетики и биотехнологии

Потапенко Евгений Викторович

Молекулярно-цитогенетическая характеристика байкальской амфиподы  
*Gmelinoides fasciatus* из разных популяций

Выпускная квалификационная работа бакалавра  
по направлению подготовки «биология»

Работа выполнена на кафедре генетики и биотехнологии  
Санкт-Петербургского государственного университета

и.о. зав. д.б.н., проф. Журавлева Г.А.

Научный руководитель:

к.б.н., доц. Барабанова Лариса Владимировна

Санкт-Петербург

2018

## Оглавление

|  |    |
|--|----|
| Введение.....  | 2  |
| Глава 1. Обзор литературы.....   | 4  |
| 1.1 Амфиподы.....  | 4  |
| 1.2 Амфиподы озера Байкал.....   | 4  |
| 1.3 Эволюция амфипод в озере Байкал.....   | 5  |
| 1.4 Биология <i>Gmelinoides fasciatus</i> озера Байкал.....  | 6  |
| 1.5 Популяции <i>Gmelinoides fasciatus</i> озера Байкал.....   | 7  |
| 1.6 Цитогенетика амфипод.....  | 12 |
| Глава 2. Материал и методы.....  | 18 |
| 2.1 Материал.....  | 18 |
| 2.2 Метод экстракции ДНК.....  | 18 |
| 2.3 Электрофорез ДНК.....  | 19 |
| 2.4 Амплификация ДНК фрагмента гена цитохромоксидазы I(COI) и гена 18S рРНК.....   | 20 |
| 2.5 Секвенирование ДНК.....  | 21 |
| 2.6 Приготовление цитологических препаратов митотически делящихся клеток.....  | 22 |
| 2.7 Подготовка зондов для флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).....  | 23 |
| 2.8 Проведение FISH.....   | 23 |
| 2.9 Микроскопия и обработка изображений.....   | 25 |
| Глава 3. Результаты и обсуждение.....  | 26 |
| 3.1 Анализ последовательностей фрагмента гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы(COI) митохондриальной ДНК.....//.....   | 26 |
| 3.2 Сравнение последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы I(COI) у амфипод из инвазивных популяции Ладожского озера и автохтонных популяций озера Байкал..... | 28 |
| 3.3 Цитогенетический анализ <i>Gmelinoides fasciatus</i> .....   | 31 |
| 3.3.1 Ацетоорсеиновое окрашивание.....   | 31 |
| 3.3.2 Окрашивание хромосом интеркалирующим красителем DAPI.....  | 33 |
| 3.3.3 Флуоресцентная гибридизации in situ (FISH) с теломерными повторами (TTAGG) <sub>n</sub> и локализация их на хромосомах <i>G. fasciatus</i> .....               | 34 |
| 3.3.3 Анализ ядрышковых организаторов(NOR) в кариотипе <i>G. fasciatus</i> методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).....                                   | 35 |
| 3.4 Анализ нуклеотидных последовательностей гена 18S рДНК <i>Gmelinoides fasciatus</i> .....   | 38 |
| Выводы.....  | 40 |
| Список литературы.....   | 41 |
| Благодарности.....   | 50 |

## Введение

Байкальская амфипода *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) представляет большой научный интерес в связи с ее широкими адаптационными способностями. В середине прошлого века этот вид из автохтонной популяции озера Байкал претерпел успешную акклиматизацию в целом ряде водоемов центральных и северо-западных областей России. Его направленная интродукция была связана с попыткой расширения кормовой базы промысловых рыб (Задоев, 1985; Иоффе, 1968, 1974). Итогом этого явилось то, что в настоящее время представители этого вида встречаются в целом ряде водоемов Карельского перешейка, Ладожском и Онежском озерах, а также Финском заливе Балтийского моря. Занимая одно из первых мест среди беспозвоночных по числу успешных вселений и последующему широкому распространению в новых условиях среды, амфипода *G. fasciatus* может служить модельным объектом для изучения различных механизмов биологической адаптации. Расселение *G. fasciatus* под влиянием антропогенных факторов за пределы своего естественного ареала может коренным образом менять биоразнообразие в экосистемах (Березина, 2003, 2005). Одним из подходов в раскрытии механизмов, лежащих в основе процесса адаптации, может служить изучение геномов видов-вселенцев из автохтонных и инвазивных популяций. С другой стороны, эколого-генетический подход к изучению динамики расселения вида представляется чрезвычайно важным для выявления характеристик, определяющих успех инвазии.

Оставаясь одним из наиболее многочисленных представителей эндемичной фауны пресноводного озера Байкал, *G. fasciatus* предоставляют уникальную возможность для выяснения механизмов, лежащих в основе эволюции отдельных видов, в том числе и в пределах клады амфипод, а также поиске их филогенетических связей. Использование современных молекулярных методов анализа намного повышает разрешающую способность традиционных популяционно-генетических подходов.

Амфипода *G. fasciatus* в последнее время представляет особый интерес в прикладных исследованиях, связанных с проблемами биоиндикации и биомониторинга состояния окружающей среды. Благодаря особенностям жизненного цикла и являясь представителем группы гидробионтов этот объект был успешно апробирован в качестве природного вида-индикатора оценки экологической напряженности водной среды с использованием цитогенетических показателей (Даев и др., 2014). Проведение такого рода генетического мониторинга намного повышает эффективность экологического мониторинга среды в целом, поскольку может входить в комплексную оценку наряду с выявлением нарушений эмбрионального развития у одного и того же вида.

Наконец, использование цитогенетических и молекулярно-цитогенетических характеристик генома *G. fasciatus* позволяет изучать возможные изменения генетического материала на разных уровнях его организации, что может пролить свет как на процесс адаптаций, так на эволюционные преобразования.

В этой связи целью настоящей работы явилась молекулярно-цитогенетическая характеристика генома *Gmelinoides fasciatus*. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) отработка методики приготовления цитологических препаратов из делящихся клеток эмбрионов *Gmelinoides fasciatus*;
- 2) освоение метода ПЦР и анализ секвенированных последовательностей фрагментов ДНК;
- 3) конструирование молекулярных зондов и освоение методики флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Амфиподы

Бокоплавцы или Amphipoda (Latreille, 1817) – это один из наиболее богатых таксонами отрядов высших ракообразных Malacostraca (Latreille, 1802), Crustacea (Brünnich, 1772).

В начале 90-х годов XX века численность отряда составляла около 6300 видов, из них 5750 видов относится к подотряду Gammaridea (Latreille, 1802)). Пресноводных видов и подвидов Gammaridea насчитывается около 1870 (Vainola et al., 2007). Распределение пресноводных видов бокоплавцов по водоёмам нашей планеты очень неравномерно. Одни территории имеют небольшое разнообразие амфипод, например, озера большей части Сибири населяет всего один вид *Gammarus lacustris* Sars. В других же ареалах можно найти центры таксономического разнообразия этой группы животных. Наибольшее разнообразие фауны амфипод наблюдается в озере Байкал, которое является глубочайшим и древнейшим пресным водоемом мира.

### 1.2 Амфиподы озера Байкал

Озеро Байкал – уникальный водоем нашей планеты по многим характеристикам: древний возраст, большие глубины, низкие температуры, огромные объемы пресной воды, толщина донных осадков, уровень эндемизма и высокое разнообразие флоры и фауны (Кожов, 1947, 1962, 1970, 1973; Тимошкин и др., 1995, 2001, Brooks, 1950 цит. по Петунина, 2008). Амфиподы озера Байкал смогли приспособиться к обитанию в весьма необычной экосистеме древнего озера и дали обширнейшую видовую радиацию. Эта группа животных демонстрирует высокое разнообразие экологических адаптаций и населяет все биотопы озера.

Бокоплавцы – один из интереснейших элементов байкальской фауны ввиду того, что они относятся к группам байкальских обитателей с наиболее глубоко выраженным эндемизмом: число их насчитывает более 347 видов из 71 рода (Камалтынов, 2001, Рожкова, 2001, Lowry 2013 цит. по Петунина, 2008). Объяснение механизма возникновения и поддержания такого большого количества видов является одной из основных задач исследования озера Байкал. В частности, большое количество работ посвящено изучению роли амфипод в экосистемах. Известно, что амфиподы представляют более 20% биомассы донных сообществ, а также являются одним из главных компонентов пелагической экосистемы озера Байкал. Бокоплавцы населяют все водные уровни озера, от интерстициальных вод пляжей выше уреза воды до

максимальных глубин (Камалтынов, 2001). Бокоплавы находятся на 2-4-ом трофических уровнях. Среди них встречаются: фитофаги, хищники I-го и II-го порядка, всеядные со смешанным типом питания. Но все же большинство амфипод имеют смешанное питание.

Амфиподы играют огромную роль в трансформации веществ и энергии в экосистемах. Некоторые виды являются основой кормовой базы рыб, другие же участвуют в утилизации органических остатков. Также стоит отметить роль амфипод в паразитарных системах. Бокоплавы являются промежуточными хозяевами ряда таксономических групп паразитов (Левашкевич, 2007, Пронин, 1986, Ринчино, 1991 цит. по Петунина, 2008)

### 1.3 Эволюция амфипод в озере Байкал

Уникальная фауна и огромное разнообразие амфипод в озере Байкал позволяют использовать его как модель для изучения вопросов, связанных с происхождением и эволюцией отдельных групп беспозвоночных животных. Ныне существующие молекулярные методы могут служить инструментом для решения этих важных эволюционных вопросов.

Данные по митохондриальной ДНК различных видов и популяций могут быть очень полезны в воспроизведении филогенетических отношений между видами и популяциями. Использование мтДНК становится все более популярным в филогенетике и популяционной генетике, так как постоянно идет совершенствование методик выделения ДНК, использования рестрикционных ферментов для выявления нуклеотидных различий, метода ПЦР; разработка универсальных праймеров для амплификации ДНК у множества таксонов (Patwardhan et al., 2014).

Фермент цитохром С оксидаза - очень известный белок электрон-транспортной цепи, который найден в бактериях и митохондриях. Митохондриальные гены цитохромоксидаза 1 (COI) и цитохромоксидаза 2 (COII) кодируют 2 субъединицы из 7 этого белка. Оба этих гена активно используются для решения филогенетических проблем на уровне популяций, видов, родов, семейств. Ген COI в среднем состоит примерно из 894 п.н, фрагмент этого гена около 600 п.н. активно используется в исследованиях, связанных с ДНК-баркодингом - определением принадлежности организма к определенному таксону на основе коротких маркеров в его ДНК (Patwardhan et al., 2014).

Рибосомальная ДНК, в частности, ген 18S рРНК, также считается удобным маркером для изучения филогенетических отношений. Гены рРНК эволюционируют очень медленно по сравнению с генами, кодирующими белки, и это очень важно для филогенетических исследований отдаленных видов (Moritz et al., 1987).

На сегодняшний день имеются работы, в которых с помощью молекулярно-филогенетических методов показаны основные тенденции эволюционной истории байкальских амфипод (Огарков и др., 1997, 1999; Щербаков и др., 1997, 1998, 1999; Macdonald et al., 2005; Protopopova et al., 2011). С целью расширения и уточнения информации о возможных филогенетических связях в пределах этой многочисленной группы ракообразных наряду с представителями байкальской фауны в исследования были включены два вида рода *Gammarus*, не встречающиеся в озере Байкал. В работах удалось показать полифилитическое происхождение фауны байкальских амфипод. Для построения филогенетических связей были использованы последовательности ядерного гена 18S рибосомальной РНК (рРНК) и митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (COI).

Так, как отсутствуют палеонтологические данные, то затруднительно сделать калибровку молекулярных часов для амфипод озера Байкал. Но авторами были сделаны приблизительные оценки, используя скорости замен для ближайших таксонов. Предварительная оценка показала, что минимальный возраст клады байкальских амфипод составляет 20 млн. лет.

Опираясь на данные полученные Макдональдом с соавторами, байкальская амфипода *G. fasciatus* располагается на древе ближе к роду *Gammarus*, чем к остальным байкальским амфиподам, что указывает на древнее происхождение этого вида (Macdonald, et al., 2005).

#### **1.4 Биология *Gmelinoides fasciatus* озера Байкал**

Байкальская амфипода *Gmelinoides fasciatus* Stebbing, 1899 (Amphipoda, Crustacea) обособилась, как вид, около 13 млн. лет назад (Мац и др., 2011). Этот вид, скорее всего, сохранился как реликтовый с теплого третичного периода (23,7 – 6,5 млн. лет назад) (Тахтеев, 2009). *G. fasciatus* принадлежит к прибрежно-соровому комплексу байкальских видов и относится к “амфиподам с переменным образом жизни” по классификации Тахтеева В.В (2000).

Данный вид в основном заселяет мелководную зону до 5 м, но в ряде случаев встречается и на глубине до 192 м. *G. fasciatus* является эврибионтным и эвритопным видом. Обитает в мелководной зоне среди растительности и на заиленных грунтах, камнях, а также на песках и илах с детритом. Рачок переносит низкие концентрации кислорода порядка 0,16 мг/л, однако при более высоких концентрациях (0,47 мг/л) быстро погибает (Бекман, 1951). Проведенные опыты показывают, что данная амфипода способна расселяться в солоноватых водоемах, имеющих соленость до 5 ‰, формирование

устойчивых популяций возможно при 1-2‰ (Вербицкий, 2011). Соотношение полов у *G. fasciatus* в Байкале составляет примерно 1:1.

*G. fasciatus* характеризуется эврифагией (Barkov, Kurashov, 2009a, 2009b, 2011). В естественных условиях потребляет водоросли, макрофиты, детрит растительного и животного происхождения, мелких животных. Показано также, что в искусственных условиях при острой нехватке пищи рачок способен поедать собственную молодь и ослабленных особей (Механикова, 2000). Наличие в рационе кормов как растительного, так и животного происхождения, является необходимым условием для нормальной жизнедеятельности этого организма. *G. fasciatus* может питаться большим числом разных видов животных, а также растениями, которые принадлежат к различным систематическим группам. *G. fasciatus* предпочитает из растительных кормов зеленую водоросль *U. zonata*, которая формирует обрастания камней. Также отмечен высокий уровень потребления водного мха *Fontinalis antipyretica*. Другой растительный корм *G. fasciatus* потреблял гораздо меньше (кубышка желтая, элодея, сфероносток, ряска трехдольная). Из животных остатков в кишечниках бокоплавов чаще всего встречаются личинки хирономид, которые играют в их питании огромную роль. Чуть менее часто в их кишечниках встречаются олигохеты и ветвистоусые ракообразные (Barkov, Kurashov, 2009a; 2009b).

В работе Березиной и Панова, изучавших популяцию *G. fasciatus* Финского залива, было отмечено, что во время репродуктивного периода с мая по октябрь большая часть популяции *G. fasciatus* концентрируется на мелководье на глубинах менее 3 м. Средняя численность и биомасса рачков пресноводной части Невской губы больше, чем в солоноватой части. Также на данной популяции показано, что рачок имеет одногодичный жизненный цикл с двумя популяционными пиками в конце июня и в начале августа. Плодовитые самки регистрируются до конца сентября, а их плодовитость варьирует от 8 до 36 эмбрионов в сумке и зависит от размера самки (Berezina, Panov, 2004).

### **1.5 Популяции *Gmelinoides fasciatus* озера Байкал**

В работах Петуниной Ж.В. с помощью анализа последовательностей фрагментов гена цитохромоксидазы 1 (COI) удалось выделить 4 изолированных популяции *G. fasciatus* в озере Байкал: Юго-Западную, Юго-Восточную, Северную и Центральную. По линии западного берега озера от бухты Половинная до пролива Малое Море обитает юго-западная популяция *G. fasciatus*, ареал юго-восточной популяции ограничен поселком Култук и губой Таланка, на среднем Байкале по восточному берегу от губы Таланка до Чивыркуйского залива находится центральная популяция бокоплава. На всем протяжении

северного Байкала, как по западному, так и по восточному берегу, обитает северная популяция *G. fasciatus* (Рис. 1).



Рис. 1. Карта-схема популяций *G. fasciatus* на озере Байкал. Цветом выделены популяции: юго-западная (желтым), северная (красным), центральная (синим) и юго-восточная (зеленым) (по Петуниной, 2008).

Несмотря на отсутствие географических барьеров, показано, что наблюдается лишь незначительный обмен генами. Одной из основных преград может служить экологическая репродуктивная изоляция на основе различий в видовом составе и частоте встречаемости паразитирующих на *G. fasciatus* микроспоридий. Также, возможно, что дифференциальное заражение микроспоридиями может быть вторичным эффектом подразделенности вида (Петунина, 2008). В ряде работ уже показано, что микроспоридии способны вызывать смещение полов в популяциях хозяина, что может приводить к формированию репродуктивных барьеров (Duron et al., 2008; Terry et al., 2004). Байкальские популяции *G. fasciatus* заражены, по крайней мере, 6 видами микроспоридий, которые, скорее всего, являются эндемичными для о. Байкал. Юго-восточная популяция, скорее всего, является исходной для всех остальных популяций (Петунина, 2008).

Популяции *G. fasciatus* очень неоднородны генетически и морфологически (Гоманенко, 2005). Рачки, обитающие на галечных грунтах в местах с сильным течением,

более плотные, коренастые, с укороченными конечностями и сильными шипами. В тёплых водоёмах с мягкими грунтами, с относительно спокойным течением или в стоячих водах, тело рачков более нежное, конечности длинные, щетинки на теле и конечностях гуще. Также популяции этого вида отличаются по таким важным показателям, как продолжительность жизни, количество генераций, различные сроки размножения, плодовитость самок, количество помета в течение жизненного цикла, коэффициент P/B (продукция/биомасса) (Механикова, 2000). Стоит отметить, что виды, обладающие высоким внутривидовым разнообразием, являются наиболее стабильными (Северцов, 1990).

Во множестве работ отмечено, что *G. fasciatus* обладает высокой экологической пластичностью (Алимов, 2004; Ербаева и др., 1991; Рожкова, 2001). Кроме того, что он является всеядным видом с коротким жизненным циклом и высокой продуктивностью, он также устойчив к большинству антропогенных загрязнителей (Сидорова, 2012) и способен выживать при температуре до 31°C (Takhteev, 2009). В связи с его большой численностью, *G. fasciatus*, очевидно, играет огромную роль в трофических взаимодействиях, потоках вещества и энергии в биогеоценозах. Им активно питаются рыбы, такие как плотва, лещ, елец, сиг, окунь и др. (Алимов, 2004).

### **1.5 Направленная интродукция *Gmelinoides fasciatus***

Инвазия видов представляет серьезную экологическую проблему, поскольку приводит к существенным и часто нежелательным изменениям в экосистемах. Наибольшие изменения привносят инвазии мелких беспозвоночных животных, которые в благоприятных условиях размножаются очень быстро. К примеру, в середине 80-х годов XX века из водоёмов Европы в Великие Озера Северной Америки с балластными водами судов были занесены двустворчатый моллюск *Drissena polymorpha* (Pallas, 1771) и хищный планктонный рачок *Bythotrephes cederstroemi* (Schoedler, 1877). Они сумели распространиться по всем Великим озерам и начали проникать в другие водоёмы данного водосборного бассейна (Griffiths et al., 1991; Lehman, 1987; Yan, 1992). Дрейссена оказала негативное влияние на популяции местных двустворчатых моллюсков. *Bythotrephes cederstroemi*, являясь планктонным хищником, может быть серьезным конкурентом для молоди рыб.

В России с начала 60-х годов проводили активную деятельность, связанную с обогащением пресноводных сообществ видами беспозвоночных животных байкальского и каспийского происхождения в рамках государственной политики вмешательства в водные экосистемы с целью их преобразования в интересах человека (Грезе, 1951). Более, чем в

200 внутренних водоемах СССР была произведена интродукция видов беспозвоночных животных. В некоторые годы количество перевозимого материала достигало 150-200 миллионов экземпляров, причем байкальские гаммариды *G. fasciatus* и *Micrurus possolskii* составляли более 40%.

В 1960 году начали направленную интродукцию байкальских гаммарид. В частности, сотрудниками ГОСНИОРХ были перевезены из озера Байкал и выпущены в Горьковское водохранилище 42,5 тысячи экземпляров *M. possolskii* и *G. fasciatus*. С 1962 года эти работы проводились уже в производственных масштабах. В период с 1960 года по 1985 год было направленно интродуцировано около 360 млн. экз. гаммарид в 43 водоема. С этой целью рачков отлавливали в мае-июне в Посольском соре озера Байкал в период их массового хода к берегу для размножения (Задоев и др., 1985).

Данные об акклиматизации *M. possolskii* свидетельствуют о том, что этот вид слабо приживается в новых водоемах. Имеются работы о встречаемости данного вида в двух водохранилищах - Горьковском (Иоффе, 1968) и Бухтарминском (Тютеньков, Козляткин, 1980), но даже там он был отмечен в незначительных количествах. *G. fasciatus* же, напротив, оказался весьма пластичным видом. Об этом говорит его способность к самостоятельному расселению и быстрой натурализации в новых условиях. *G. fasciatus* занимает одно из первых мест среди беспозвоночных по числу успешных вселений - 58% и натурализаций - 51% (Задоев и др., 1985). Уже к началу 21 века рачок смог расселиться по Ладожскому и Онежскому озерам (Березина, 2003), Новосибирскому (Визер, 2006), Рыбинскому и Верхневолжскому водохранилищам (Иоффе, 1974), а также по водоемам Карельского перешейка (Berezina, Panov, 2004) и Чудскому озеру (Мельник, Михайлов, 2001). На сегодняшний день продолжается активное расселение *G. fasciatus* уже в Финском заливе Балтийского моря. Установлено, что вид находится на стадии экологического прогресса (Базова, 2002). По данным на 2006 год *G. fasciatus* успешно акклиматизировался в 44 водоемах европейской части России, Средней Азии, Урала, Казахстана и Сибири (Визер, 2006). *G. fasciatus* успешно адаптировался во всех местах вселения. Ни одна работа по акклиматизации данного вида не закончилась неудачей. Благодаря высокой пластичности и способности к активным миграциям, вселенец успешно проникал из мест вселения в соседние водоёмы (Panov, 1996). Следствием процесса расселения явилось то, что границы его естественного ареала, ограниченные некогда озером Байкал и некоторыми его притоками, а также реками Ангара и Енисей (до Красноярского водохранилища), существенно расширились. На сегодняшний день границы ареала на западе связаны с Невской губой Финского залива Балтийского моря, на востоке – с озером Кенон (бассейн реки Амур), на юге – рекой Гант, источником которой

является озеро Яшилкул, расположенное на южном Памире Таджикистана (Sidorov, 2013).

Так, как интродукция *G. fasciatus* была направленной, то очень подробно фиксировалось расширение ареала этого рачка во множестве водоемов Севера-Запада России, что является большим преимуществом для изучения роли видов-вселенцев в водных экосистемах. Так, например, известно, что в 1970-х, *G. fasciatus* преднамеренно был интродуцирован в несколько озер Карельского перешейка бассейна Балтийского моря с целью увеличения кормовой базы рыб (Нилова, 1976; Архипцева и др., 1977). Из этих озер *G. fasciatus* вселился в Ладожское озеро (Панов, 1996), а затем по реке Неве достиг её устья и вторгся в Финский залив. В пресноводной части устья реки Невы он был впервые зарегистрирован в 1996 году (Alimov et al., 1998). И, наконец, в 1999 году *G. fasciatus* был впервые зарегистрирован в солоновато-водной части устья реки Невы (Панов и др., 1999).

Направленная интродукция байкальской амфиподы *G. fasciatus* в ряд водоёмов европейской части России повлекла за собой множество непредвиденных последствий для биоразнообразия крупных экосистем (Панов, 2001). Важно изучать последствия инвазий и использовать полученные знания для предотвращения катастрофического снижения биоразнообразия, в результате будущих случайных или направленных интродукций видов в новые экосистемы. Известно, что *G. fasciatus* в Ладожском озере впервые был обнаружен в 1988 году в прибрежных зарослях рдеста и тростника у мыса Осиновец в губе Петрокрепость во время исследований литорали озера, проводившихся совместной экспедицией Института озероведения РАН и Зоологического института РАН. В Ладожском озере эта амфипода встречается в основном на глубинах до 1 м в зарослях высшей водной растительности или в каменистой прибойной литорали. В некоторых сообществах Ладожского озера *G. fasciatus* стал доминирующей группой, достигнув наибольшей биомассы 120 г/м<sup>3</sup> - 160 г/м<sup>3</sup>, при среднем показателе биомассы макробентоса для Ладожского озера 20-30 г/м<sup>3</sup>. Отмечены высокие плотности *G. fasciatus*, как в сильнозагрязненных местообитаниях, так и в относительно чистых биотопах (Панов, 1994). На западном побережье Ладожского озера эта байкальская амфипода, по-видимому, полностью вытеснила из литоральных сообществ аборигенных озерных бокоплавов *Gammarus lacustris* Sars, характерных для этих мест обитаний в 60-х годах (Кузьменко, 1964). Ранее типичные для этих районов сообщества макробентоса были обнаружены лишь на литорали острова Валаам (Панов, 1994). Установлено, что вселение *G. fasciatus* в Ладожское озеро привело к усложнению пищевых сетей экосистемы водоема и повышению кормовой базы рыб (Барков, 2006).

Вытеснение *Gammarus lacustris* также отмечалось в Новосибирском водохранилище и других водоемах Сибири (Дшер, 1986). В Горьковском водохранилище

*G. fasciatus* вытеснил ранее обитавших здесь каспийских амфипод (Бородин, 1979). По наблюдениям гидробиологов вытеснение других видов может происходить, как за счет конкуренции, так и в результате прямого выедания мелких беспозвоночных (Панов, 1994).

Несмотря на столь широкое распространение этого вида и большое внимание со стороны гидробиологов в отношении его биологии и роли этой амфиподы в экосистемах больших озер, *G. fasciatus* остается до сих пор малоизученным в генетическом отношении. Поскольку системы организации генома эволюционирует также, как и морфофизиологические характеристики организма, то подробное изучение генома *G. fasciatus* из инвазивных и автохтонных популяций может помочь в раскрытии механизмов биологической адаптации и понимании эволюционных преобразований генома, что является очень важным для понимания пластичности генома в таких процессах. Цитогенетические исследования *G. fasciatus* могут дать новые данные, которые, дополнив результаты молекулярных исследований, смогут показать сложные эволюционные пути развития амфипод.

## 1.6 Цитогенетика амфипод

Анализ цитогенетических особенностей вида состоит из: анализа числа хромосом в кариотипе, общей характеристики кариотипа, поиска районов ядрышковых организаторов в кариотипе, описания теломерных последовательностей и измерения количества ядерной ДНК.

Главная проблема в изучении хромосом ракообразных заключается в том, что у амфипод большинства таксонов имеется большое количество хромосом, при этом их хромосомы имеют меньшие размеры в сравнении с хромосомами насекомых и позвоночных. Поэтому крайне тяжело описать кариотип и особенности отдельных хромосом у таких видов. В то же время особенности жизненного цикла ракообразных позволяют вычленять эмбриональные стадии развития, которые характеризуются большим количеством активно делящихся клеток. Их наличие предоставляет возможность использования молекулярно-цитогенетических методов для анализа кариотипа конкретного вида *G. fasciatus*.

Существует несколько методов приготовления препаратов хромосом. Приготовление тонких срезов тканей гонад (Niiyama, 1959), приготовление давленных препаратов с последующей окраской ацетоорсеином (Orlan, Callan, 1957) и техника приготовления суспензии клеток с последующим раскапаванием с определенной высоты на стекло для увеличения разброса хромосом (Salemaa, 1979) или использование "hot plate method" (Klingerman, Bloom, 1977).

Что касается числа хромосом в диплоидном наборе у амфипод в различных семействах, то оно сильно варьирует. Так, в сем. Aoridae отмечено варьирование числа хромосом от 8 до 36, в сем. Ischyroceridae - от 10 до 20, в сем. Gammaridae – от 18 до 54. В то же время, в некоторых семействах число хромосом фиксировано. У амфипод в сем. Talitridae  $2n=50$ , в сем. Niphargidae  $2n=50$ . Наименьшее число хромосом зафиксировано у амфипод в сем. Aoridae, где  $2n=8$ , и в сем. Ischyroceridae -  $2n=10$ . Наибольшее же число хромосом в диплоидном наборе, равное 126, было обнаружено у вида *Hyperia galba* из подотряда Hyperiidea. Ввиду сильной вариабельности числа хромосом, некоторые авторы предполагают участие полиплоидизации в процессе эволюции таких таксонов, как сем. Pontoporeidae, сем. Gammaridae в реке Охрид и сем. Hyperiidae (Rampin, 2011). Большинство видов сем. Gammariidae все же характеризуется диплоидным числом хромосом от 50 до 54.

Чаще всего встречаются описания механизмов эволюционных преобразований кариотипов, связанные с увеличением числа хромосом в результате их деления или уменьшением числа хромосом, как следствие слияния пары хромосом (Traut, Clarke, 1997), а также увеличением числа хромосом за счет полиплоидизации (Salemaa, 1984) или уменьшением числа за счет потери отдельных хромосом (Traut, 1991).

Сравнение кариотипов близкородственных видов амфипод по наличию метацентрических, телоцентрических и акроцентрических хромосом позволяет проследить эволюцию кариотипов в пределах более высоких таксонов. Например, в исследовании, проведенном на двух амфиподах *Pontoporeia femorata* Krieyer и *Pontoporeia affinis* Lindstrom, авторы, анализируя кариотипы этих видов, смогли доказать, что вид *P. affinis* эволюционировал из вида *P. femorata* за счет полиплоидизации и последующего слияния нескольких пар хромосом (Salemaa, 1984).

Размер генома сильно варьирует среди амфипод, что указывает на то, что этот параметр играл большую роль в эволюции данной клады. Метод проточной флуориметрии позволил оценить размеры геномов амфипод. Средние значения для размера генома для подотряда Gammaridea: он варьирует от 0.80 pg до 64.62 pg, при среднем значении 8.48 pg и количестве хромосом от 18 до 68 (Rampin, 2011). Размер генома *G. fasciatus* также известен, он составляет 3.68 pg (Jeffery, 2016). Подотряд Sorophiidea имеет размер генома от 0.68 pg до 16.09 pg при среднем значении 2.85pg и количестве хромосом от 8 до 36. Таким образом, размер генома сильно варьирует внутри каждого семейства, причем у амфипод было показано отсутствие корреляции между количеством хромосом и размером генома. Дифференциальная окраска на выявление С-дисков демонстрирует, что различия в размерах генома в основном затрагивают

некодирующую ДНК (Rampin, 2011).

Для характеристики кариотипа большое значение имеет оценка числа ядрышковых организаторов. Районы ядрышковых организаторов связаны с локализацией генов рибосомальной ДНК. Рибосомальная ДНК (рДНК) включает в свой состав четыре основных гена рибосом: 5S, 5.8S, 18S и 28S рРНК. Они были всесторонне изучены на цитогенетическом и молекулярном уровнях у представителей многих таксонов. Создание метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) (Pinkel et al., 1986) и его широкое применение в цитогенетических исследованиях позволили картировать ядрышковые организаторы на хромосомах множества видов и подробнее изучить кариотип, используя зонды к теломерным последовательностям, а также использовать различные цитологические маркеры для изучения отдельных пар гомологичных хромосом.

Анализ кластера генов 18S-5.8S-28S рДНК даёт важную информацию об особенностях кариотипа определенного вида. В литературе существуют серьезные дебаты о “случайности” расположения рДНК на хромосомах (Roa, Guegга 2015; Garcia et al., 2017). рДНК может занимать любое положение на хромосоме, но прослеживаются эволюционные тренды в отдельных таксонах. Дистальное расположение локуса 45S предпочтительнее у млекопитающих, рыб и моллюсков, тогда, как распределение у членистоногих более сбалансировано между 3 вариантами. Они имеют соотношение 42% дистально, 34% прицентромерно, 24% интерстициально. В то время, как локусы гена 5S рРНК у животных более равномерно расположены вдоль хромосом (Sochorova et al., 2018). У амфипод кластер 45S генов чаще всего располагается в терминальной области короткого плеча хромосомы (Rampin, 2011). У большинства видов одна пара хромосом несет ядрышковый организатор (NOR), но встречаются виды с большим количеством ядрышко-образующих хромосом, вплоть до 6-7 пар. Количество NOR не всегда коррелирует с числом хромосом. Например, у амфипод из сем. Gammaridae и сем. Talitridae при одинаковом числе хромосом в кариотипе количество NORs может сильно различаться (Rampin, 2011).

Полиморфизм ядрышковых организаторов показан у многих животных. В обзоре Сохоровой был проведен анализ данных о числе NORs у 1342 видов животных. Было показано, что около 12% видов характеризуются вариабельностью по числу локусов 45S. Автор объясняет это разными причинами: присутствием локусов рДНК на половых хромосомах или на В хромосомах (оба варианта часто встречаются у насекомых), полиплоидизацией (рыбы), межпопуляционными различиями (Sochorova et al., 2018).

У амфипод встречаются различные уровни полиморфизма ядрышковых организаторов. Это может быть связано с разными причинами. Во-первых, к этому могут

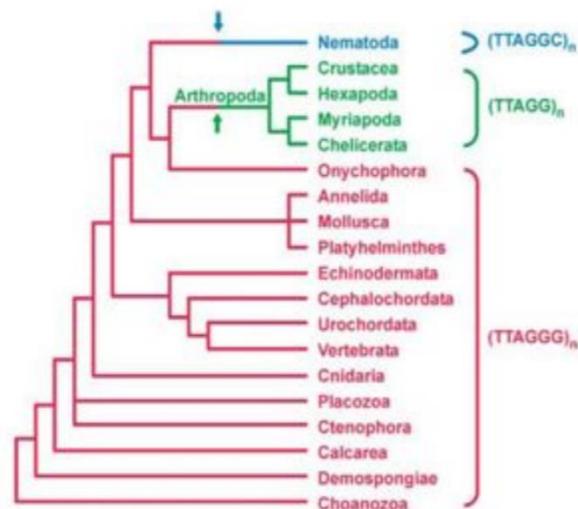
приводить сигналы различного размера на одинаковых парах хромосом при проведении гибридизации *in situ*. Во-вторых, ядрышко-образующей может являться только одна из гомологичных хромосом (Rampin, 2011). Автором были предположены механизмы, которые могли привести к полиморфизму по данному признаку, в частности, - неравный кроссинговер и наличие транспозонов, ассоциированных с NOR.

В качестве еще одного цитологического маркера для описания особенностей кариотипа используют ген 5S рРНК. Он имеет длину около 120 нуклеотидов. 5S рРНК встречается практически во всех рибосомах, за исключением митохондрий некоторых грибов, высших животных и большинства простейших (Gray et al., 1999). Рибосомальные кластеры 5S представлены повторами, состоящими из кодирующего и не кодирующего районов (Patwardhan et al., 2014). Показано интерстициальное расположение локусов 5S на 2 парах хромосом у нескольких амфибод, при этом локусы 45S и 5S находятся на разных хромосомах (Krapp et al., 2008). В то время, как у некоторых представителей изопод показано расположение локусов 5S в субтеломерных районах на 2 парах хромосом (Pelliccia et al., 1997).

На большом количестве животных показано отсутствие корреляции между числом локусов 5S и 45S. Следовательно, их распределение и амплификация идет независимыми эволюционными путями (Sochorova et al., 2018), в то время, как у растений отмечена корреляция между числом локусов 5S и 45S. Это может быть связано с частой полиплоидизацией у растений, в результате которой происходит умножение обоих локусов одновременно (Garcia et al., 2017).

В работах Сохоровой с соавторами из всех исследуемых животных около 75% видов имели 5S локус и 45S локус на разных хромосомах (Sochorova et al., 2018). У растений показана колокализация локусов в 58% исследуемых видов (Roa, Guerra, 2015). Колокализация может также увеличивать частоту рекомбинации между обоим локусами, что может приводить к формированию блоков 45S-5S. Блоки 45S-5S относительно распространены в растениях (Garcia et al., 2009; Wicke et al., 2011; Garcia, Kovarik, 2013). У животных такие блоки описаны у некоторых членистоногих (Drouin et al., 1992) и ракообразных (Drouin, de Sá, 1995).

Важной характеристикой кариотипа также служат теломерные последовательности ДНК. Теломерные повторы специфичны для различных таксонов. Артроподы характеризуются пентамерными повторами (TTAGG)<sub>n</sub> (Traut et al., 2007) (Рис. 2). Однако имеются исключения, например, изопода *Asellus aquaticus* имеет гексамерные повторы (TTAGGG)<sub>n</sub> (Pelliccia, 1994). Использование зондов к теломерным последовательностям позволяет охарактеризовать отдельные пары хромосом в кариотипе изучаемого вида.



From Traut *et al.*, 2007

Рис. 2. Теломерные повторы характерные для различных таксонов

Как было отмечено, диплоидный набор хромосом у представителей семейства Gammaridae представлен преимущественно 50-54 хромосомами. Однако существуют исключения, относящиеся к гаммаридам из Охридского озера. Диплоидный набор хромосом у *Gammarus salemaai* составляет 24, у *Gammarus macedonicus* – 42 и у *Gammarus lychnidensis* - 68. Салемаа и Камалтынов в 1994 году показали, что амфипода *G. salemaai*, имеющая наименьшее число хромосом, является самой древней гаммаридой в этом регионе (Salemaa, Kamaltinov, 1994). В данной работе авторами была выдвинута гипотеза о том, что возникновение других гаммарид могло быть следствием полиплоидизации. Хотя для животных организмов не характерно явление полиплоидизации в отличие от высших растений, так как это связано с нарушением регулярного полового размножения, в то же время показано, что симбиотические организмы обуславливают появление нерегулярного полового размножения, за счет чего эти полиплоидные формы могут поддерживаться (Захаров, 1999). Однако данной гипотезе противоречат данные о числе и локализации NORs, а также отсутствие корреляции между числом хромосом и размерами генома (Rampin, 2011). Стоит отметить, что на сегодняшний момент имеются работы, показывающие взаимосвязь этих двух показателей на множестве видов. Например, Прокопович с соавторами в своей работе в 2003 году, используя для анализа 162 вида растений и животных, показали корреляцию между размером генома и количеством рДНК локусов (Prokovich *et al.*, 2003).

Цитогенетические исследования очень важны для филогенетических исследований. Методы классической и молекулярной цитогенетики необходимы при изучении некоторых аспектов эволюции генома. Амфиподы ввиду их разнообразия являются

хорошей моделью для изучения механизмов эволюции геномов и видообразования. Группой под руководством Либертини и Рампина был проведен сравнительный цитогенетический анализ большого числа близкородственных видов амфипод (Libertini et al., 2008, 2009; Rampin, 2011), однако вид *Gmelinoides fasciatus* в числе исследуемых видов отсутствует. С целью восполнения существующего пробела знаний о цитогенетических параметрах генома *Gmelinoides fasciatus*, а также учитывая важность данного объекта в решении целого ряда общебиологических проблем, нами была предпринята попытка апробации ряда молекулярно-цитогенетических методов в отношении данного вида.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования в данной работе служила амфипода *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) Crustacea, класс Malacostraca, отряд Amphipoda, семейство Micropodidae. Материалом исследования служила геномная ДНК, выделенная из целых рачков с предварительно снятым хитиновым панцирем, и препараты митотических хромосом, полученные из эмбриональных клеток рачков.

### 2.1 Материал

Сбор образцов амфипод *G. fasciatus* проводили на побережье Ладожского озера в районе поселка имени Морозова 17 июня и 30 июля 2017 года. Вторым водоемом на территории Ленинградской области был Финский залив, где было обследовано два места обитания данных гидробионтов. Побережье Финского залива в районе парка Дубки в Сестрорецке является реперной точкой для проводимых на кафедре генетики и биотехнологии исследований по генетическому мониторингу. Материал в данной точке был собран 17 мая 2017 года. Еще одним местом обследования побережья Финского залива, которое проводили 4 июня 2017 года, была прибрежная зона вблизи поселка Ольгино.

Сбор амфипод осуществляли путем промывки водорослей в емкостях с водой, взятой непосредственно из места их обитания, а также сбором гидробионтов с поверхности камней. Часть собранных рачков помещали в пластиковые бутылки с водой объемом 400 мл для транспортировки в лабораторию. Далее живой материал переносили в стеклянные аквариумы и поддерживали при комнатной температуре. Другую часть амфипод непосредственно в местах сбора фиксировали: самок с эмбрионами - в растворе 3:1 (спирт и ледяная уксусная кислота), амфипод независимо от пола - в растворе 70<sup>0</sup> этилового спирта. Через сутки использованные фиксаторы заменяли на свежеприготовленные.

Собранный материал использовали для выделения ДНК и приготовления препаратов митотических хромосом.

### 2.2. Метод экстракции ДНК

Экстракцию ДНК проводили фенольным методом в соответствии со стандартным протоколом на базе ресурсного центра ЦКП “Хромас” Научного парка СПбГУ. Для выделения ДНК были использованы 32 рачка *G. fasciatus* из популяции Ладожского озера, Финского залива и озера Байкал.

Для подготовки материала рачков с помощью пинцета освобождали от хитинового панциря. Данную манипуляцию осуществляли в чашке Петри с небольшим количеством озерной воды. Затем каждый образец растирали в 450 мкл лизирующего раствора (25 мМ ЭДТА, 75 мМ NaCl, 10 мМ Tris, pH =7,5) в эппендорфе, объемом 1,5 мл. В каждый эппендорф добавляли 50 мкл 10% SDS и 25 мкл протеиназы К (20 мг/мл). Смесь перемешивали и оставляли на водяной бане при температуре 55°-60°С на 2 часа, периодически помешивая образцы путем переворачивания эппендорфов. К полученному лизату добавляли смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1. Содержимое интенсивно перемешивали и далее центрифугировали 2 минуты на максимальной скорости 13 000 об/мин (11 000g, центрифуга MicroCen 13 A, Herolab, Германия). Отбирали верхнюю часть надосадочной жидкости, стараясь не задеть промежуточный слой. Повторяли последние этапы, заменив смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт на хлороформ. В полученный раствор добавляли 0,1 объём NaCl (до конечной концентрации 0,3М) и 1 объём изопропанола. Смесь центрифугировали в течение 15 минут при 13 000 об/мин (11 000g). Из пробирки отбирали изопропанол, стараясь не задеть осадок. К осадку добавляли 500 мкл 70° охлажденного этилового спирта и центрифугировали 5 минут при 13000 об/мин (11 000g). Затем полностью удаляли из пробирки этанол, следя за тем, чтобы осадок не оторвался. Полученные пробы высушивали при комнатной температуре в открытом эппендорфе. В высушенную пробу в зависимости от размера осадка добавляли от 50 до 100 мкл автоклавированной дистиллированной воды. Готовые пробы хранили в холодильнике при -20°С.

### 2.3. Электрофорез ДНК

Для оценки количества выделенной ДНК, а также для определения ее качества и концентрации ПЦР-продукта, использовали метод электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле. С целью проведения электрофореза ДНК готовили 1% агарозный гель.

Навеску агарозы в 1г добавляли в 100мл буфера TAE x1(40мМ Трис, 20мМ уксусная кислота, 1мМ ЭДТА) и нагревали в микроволновой печи до полного растворения. В остывший до температуры 50°-55°С раствор добавляли этидиум бромид в концентрации 0,5 мкг/мл. Готовый 1% агарозный гель заливали в формы, куда вставляли гребенки для формирования лунок. После застывания геля гребенки аккуратно удаляли. В камеру аппарата для проведения фореа добавляли 1x TAE буфер. Предварительно размороженные и центрифугированные образцы ДНК смешивали в лунках с автоклавированной дистиллированной водой и красителем на основе метиленового-синего в соотношении 2 мкл ДНК : 6,4 мкл H<sub>2</sub>O : 1,6 мкл бх красителя (Thermo Scientific), так что

общий объем вносимого в гель образца составлял 10 мкл. Гели помещали в камеру с буфером и добавляли подготовленные образцы ДНК. В первую лунку каждого геля помещали маркер длин ДНК-фрагментов GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Гели выравнивали по боковым стенкам и проводили электрофорез в течение 1 часа при напряжении 6 В/см. По завершении электрофореза из камеры аккуратно доставали гели и анализировали их в системе документации гелей GDS-800 (UVP Biomaging Systems, США).

#### 2.4 Амплификация ДНК фрагмента гена цитохромоксидазы I(COI) и гена 18S рРНК.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием праймеров LCO-1490F и HCO-2198R (Folmer et al. 1994), синтезированных на базе фирмы Beagle Biotechnology. Данные праймеры являются универсальными для проведения ПЦР гена цитохромоксидазы I (COI) большинства представителей группы Amphipoda. Так же использовались подобранные нами 3 пары праймеров для получения последовательностей трех участков гена 18S рРНК и создания меченых зондов. Все манипуляции по подготовке образцов ДНК к амплификации осуществляли в ПЦР-боксе (BioSan, Латвия).

Синтезированные праймеры в концентрации 100 пкмоль/мкл 10-кратно разводили для получения аликвот. Реакционная смесь включала 2,5 е.а. Taq полимеразы (Sileks, Россия или ThermoScientific, Великобритания) и одну десятую объема 10xTaq буфера, 2мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2мМ каждого из dNTPs, 0,4 мкМ каждого праймера, 100нг геномной ДНК. Общий объем каждой пробы составлял 20 мкл. Подготовленные образцы помещали в термоциклер MJ Mini (BioRad, США) с нагревающейся крышкой с программами температурного режима, указанными в таблицах 1 и 2. Полученные ПЦР-продукты хранили в холодильнике на -20°C.

Таблица 1. Температурные и временные параметры проведения ПЦР с праймерами LCO-1490F и HCO-2198R.

| Температура | Время  | Количество циклов |
|-------------|--------|-------------------|
| 94°C        | 4 мин  | 1                 |
| 94°C        | 45с    | 34                |
| 53°C        | 45с    |                   |
| 72°C        | 45с    |                   |
| 72°C        | 10 мин | 1                 |

Таблица 2. Температурные и временные параметры проведения ПЦР с 3 парами праймеров к гену 18S.

| Температура  | Время  | Количество циклов |
|--|--------|-------------------|
| 94°C   | 4 мин  | 1                 |
| 94°C   | 45с    | 34                |
| 18S(6 – 755bp) - 61°C<br>18S(600 – 1600bp) - 60°C<br>18S(1500 – 2280) - 59°C | 45с    |                   |
| 72°C   | 45с    |                   |
| 72°C   | 10 мин | 1                 |

## 2.5 Секвенирование ДНК

Секвенирование по методу Сэнгера последовательностей ДНК было выполнено на базе ресурсного центра "Развитие молекулярных и клеточных технологий" Научного парка СПбГУ с использованием секвенатора ABI Prism 310. Далее последовательности, синтезированные с прямого и обратного праймеров, были выровнены друг относительно друга и проанализированы при помощи программы BioEdit версии 7.1.9.

## 2.6 Приготовление цитологических препаратов митотически делящихся клеток

Фиксацию самок с эмбрионами и приготовление препаратов с помощью спредирования осуществляли в нескольких вариантах методики. В частности, самок перед фиксацией обрабатывали митостатиком кальцемидом 10 мкг/мл (CaruоMax), и гипотоническим раствором 0,56% KCl. Было выяснено, что для эмбрионов *G. fasciatus* оптимальное время обработки кальцемидом для получения достаточного количества метафаз составляет 2,5 - 3 часа. Для проведения гипотонии время нахождения в растворе 0,56% KCl составляет 15 минут, что дает наибольшее "раскрытие" хромосом.

Также экспериментально определяли стадию эмбрионального развития для осуществления фиксации материала. С этой целью использовали самок с эмбрионами, находящимися на различных стадиях развития. Эксперимент сводился к следующим этапам:

1). Самок с эмбрионами, находящихся на различных этапах развития, помещали в отдельную емкость.

2). Брали по одной самке и помещали на несколько секунд на фильтровальную бумагу, чтобы избежать разбавления раствора кальцемида при выделении эмбрионов. Выделение эмбрионов из сумки самки проводили в 30 мкл 10 мг/мл раствора кальцемида (Ca<sub>2</sub>yoMax).

3). После выделения эмбрионов раствор кальцемида обновляли для сохранения точной концентрации.

4). Эмбрионов в растворе кальцемида накрывали часовым стеклом, помещали образец в темное место и оставляли на 2,5-3 часа.

5). Через 3 часа убрали кальцемида, и помещали эмбрионов в 100 мкл 0,56% раствора KCl, в котором материал выдерживали в течение 15 минут. Для сохранения исходной концентрации раствор KCl обновляли каждые 5 минут.

6). Далее эмбрионов помещали в отдельную емкость, убрали оставшийся KCl и фиксировали в растворе этилового спирта и уксусной кислоты в соотношении 3:1.

7). Через сутки фиксатор обновляли и хранили пробы при температуре -20°C.

Важным моментом приготовления препаратов для анализа метафазных хромосом является процедура спредирования. Для ее осуществления были предприняты следующие этапы.

1). Фиксированных эмбрионов помещали на стекло и оттягивали фильтровальной бумагой оставшийся на них фиксатор. После этого разделяли эмбрион на 2-3 части, добавляли 5 мкл 96% уксусной кислоты и с помощью препаровальной иглы готовили суспензию эмбриональных клеток.

2). К полученной суспензии добавляли 25 мкл 96% уксусной кислоты, прокачивая несколько раз поршнем пипетки, и отбирали весь объем суспензии клеток.

3). На подогретый столик для спредирования с температурой 55°C помещали 2 стекла, предназначенных для дальнейшей FISH-гибридизации и рутинной окраски ацетоорсеином.

4). Раствор с клетками распределяли по стеклу в процессе раскапывания всего объема суспензии клеток на стекло и последующего забора обратно в пипетку. Для приготовления одного препарата данная процедура была повторена 10-15 раз.

5). После высыхания стекла снимали со столика. Один из препаратов окрашивали ацетоорсеином (1% орсеин в 45% уксусной кислоте) и клеивали покровным стеклом с помощью лака. Второй препарат готовили для последующей FISH-гибридизации.

## 2.7 Подготовка зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Для определения количества и локализации районов ядрышковых организаторов на хромосомах в качестве зонда для FISH был использован биотинилированный фрагмент гена 18s рРНК 6-755 п.н. Последовательность была амплифицирована с матрицы, которой служила изолированная геномная ДНК выделенная из целых рачков. Для проведения ПЦР были использованы специфические праймеры F\_6 (5' – TGATCCTGCCAGTAGTCATATGC – 3') и R\_755 (5'-GCGCTCGATACAGACATTCAACT- 3'). Реакционная смесь включала 0,2 мМ каждого из dNTPs, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 0,4 мкМ каждого праймера, 100 нг геномной ДНК, 2,5 е.а. Taq полимеразы (Sileks, Россия) и одна десятая объема 10x Taq буфера. Программа ПЦР задавалась следующей: 4-х минутная денатурация 95°C, после которой следовали 35 циклов, включающих денатурацию ДНК при 95°C в течение 40 секунд, отжиг праймеров при 61 °C, в течение 40 секунд и синтез ДНК при 72°C в течение 50 секунд. После окончания 35 циклов проходил последний этап синтеза с температурой 72°C в течение 10 минут.

Результаты ПЦР оценивали с помощью ДНК-электрофореза в агарозном геле. Считали результат удовлетворительным, если наблюдали одиночный фрагмент размером 749 п.н. Для получения зонда ПЦР-фрагменты метили биотином. Для этого готовили реакционную смесь: 2мМ MgCl<sub>2</sub>, по 0,2 мМ дАТФ, дГТФ, дЦТФ; 0,16 мМ дТТФ; 0,04 мМ biotin-16-dUTP (Sileks, Россия); 10xTaq-буфер, по 0,4 мкМ праймеры F\_6 и R\_755, 2,5 е.а. ДНК полимеразы Taq (Sileks, Россия), 100нг ДНК-матрицы. Программа ПЦР была такой же как и для “холодной” ПЦР.

## 2.8 Проведение FISH

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* на препаратах хромосом, приготовленных из эмбрионов рачков, проводили с использованием биотинилированных зондов.

Предобработку препаратов проводили сначала раствором РНКазы А концентрации 10 мг\л (Fermentas) разведенной в 2xSSC. Далее отмывали препараты в 2xSSC 3 раза по 5 минут при комнатной температуре. Затем обрабатывали препараты 0,005% пепсином, с добавлением 0,01М HCl и инкубировали при 37°C в течение 10 минут. После производили отмывки 2 раза по 5 минут в 1x PBS и 5 минут в 1xPBS с добавлением 50мМ MgCl<sub>2</sub> при комнатной температуре. Затем производили постфиксацию используя 1%

парафармальдегид на 1x PBS с добавлением 50мМ MgCl<sub>2</sub> в течение 10 минут при комнатной температуре и отмывали 5 минут в 1xPBS. Фиксированные препараты проводили по спиртам 70%, 96%.

Денатурацию ДНК хромосом и зонда проводили как отдельно, так и совместно. Сначала готовили гибридизационную смесь, состоящую из 50% формамида, 10% декстрансульфата, 2x SSC, меченного ДНК-зонда (конечная концентрация 20нг\мкл), ДНК-носитель (тРНК) в 50-кратном избытке по отношению к количеству зонда. При совместной денатурации наносили 10 мкл гибридизационной смеси на препарат, закрывали покровным стеклом 18x18 мм или 22x22 мм и заклеивали резиновым клеем. Затем препараты помещали в термоциклер "Genius" (Techne Ltd, Великобритания), денатурировали в течение 5 минут при температуре 82°C, и оставляли во влажной камере на 48 часов при 37°C. Раздельную денатурацию проводили, погружая препараты на 2 минуты в раствор 70% деионизированного формамида на 0,6 SSC, нагретом до 72°C, затем осуществляли дегидратацию, проводя препарат по ледяным спиртам (этанол) восходящей концентрации 70%, 80%, 90% (по 3 минуты в каждом) и высушивали на воздухе. Зонд денатурировали кипячением на водяной бане в течение 5 минут, после чего помещали в лед на 5 минут. Затем денатурированный зонд наносили на препарат, накрывали покровным стеклом, заклеивали резиновым клеем и оставляли гибридизоваться на 48 часов во влажной камере в термостате при температуре +37°C. При проведении FISH с теломерными последовательностями влажную камеру с препаратами оставляли при комнатной температуре на одну ночь.

После гибридизации с теломерным зондом, удаляли резиновый клей. Постгибридизационные отмывки неспецифически связавшегося зонда проводили в растворе 2xSSC при комнатной температуре до отпадения покровных стёкол. После этого препараты гибридизированные с зондами к теломерным последовательностям, отмывали в течение 10-20 секунд в 2xSSC при комнатной температуре и затем сразу проводили по спиртам 70%, 96%. После высыхания заключали в среду с DAPI. Препараты с гибридизованные с зондами к гену 18S, отмывали в двух сменах 0,2xSSC и двух сменах 2xSSC по 5 минут при 62-64°C в бане-качалке (Wisd, DaihanScientific, Южная Корея). Детекция проводилась с использованием 1% блокирующего раствора (Boehringer Mannheim, Германия) на 4xSSC с 0,1% Tween-20 в течение 45 минут во влажной камере при 37°C. Далее проводили трехэтапную детекцию. На первом этапе препараты инкубировали с авидином, конъюгированным с флуорохромом Alexa488( 1:200, Thermo Scientific, США). На втором этапе производилась инкубация с козьими биотинилированными антителами к авидину. И на завершающем 3 этапе, вновь инкубация

авидином-Alexa488(1:200). После каждой инкубации проводились отмывки препаратов в трех сменах 4xSSC с 0,1% Tween-20 по 5 минут при 44°C в бане-качалке.

В завершении препараты проводили по спиртам 70%, затем 96%, высушивали и заключали в антивыгорающую среду с DAPI. В состав среды, наносимой на стекло, входили краситель в концентрации 50 нг в мл, фотопротектор DABCO (1,2%) и 50% глицерин. Наносили по 10мкл под покровное стекло 18x18мм или 22x22мм. Хранили препараты в холодильнике при +4°C.

## **2.9 Микроскопия и обработка изображений**

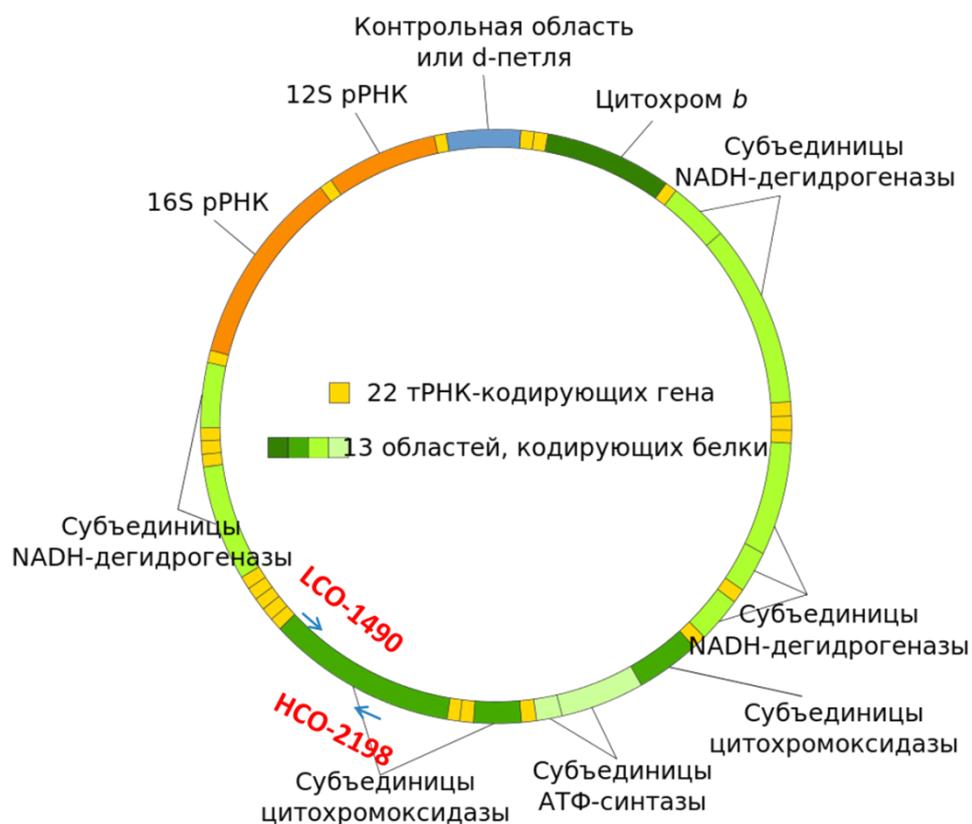
Анализ препаратов проводили с помощью полуавтоматизированного флуоресцентного микроскопа DM4000B (Leica Wetzlar GmbH, Германия), оснащенного объективами Leica 10x/0.3, 20x/0.5, 40x/1, 100x/1.30, оптикой для фазового контраста и CCD камерой накопления сигнала DFC 350 FX. Флуоресцентный сигнал наблюдали с помощью фильтров A (DAPI), I3 (Alexa488). Для получения изображений использовали программное обеспечение LAS AF (Leica Cambridge Ltd.).

### Глава 3. Результаты и обсуждение.

Для решения вопроса о возможных изменениях генома на разных уровнях его организации у представителей инвазивных популяций амфиподы *Gmelinoides fasciatus* по сравнению с амфиподами из автохтонной популяции озера Байкал мы провели их изучение с использованием молекулярно-биологических и цитогенетических методов.

#### 3.1 Анализ последовательностей фрагмента гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы(CO1) митохондриальной ДНК.

В качестве молекулярной характеристики генома *G. fasciatus* был использован фрагмент митохондриального гена CO1. Несмотря на эволюционную консервативность этого гена, количество синонимичных замен в нем обычно является достаточным для проведения исследований на популяционном уровне (Patwardhan et. al., 2014). Для получения указанного фрагмента (Рис.3) были использованы универсальные праймеры для амфипод (Folmer et al., 1994).



**Рисунок 3.** Схема митохондриальной ДНК с указанием позиций прямого и обратного праймеров к фрагменту гена CO1 (<https://ru.wikipedia.org/wiki/>)

С использованием данного молекулярного маркера ранее было проведено исследование генетической изоляции амфипод *G. fasciatus*, населяющих различные участки побережья Байкала (Петунина, 2008). Показано, что в этом фрагменте, несмотря на его консервативность, количество синонимичных замен достаточно для проведения исследований на межвидовом и на популяционном уровнях (Folmer et al., 1994). Данный фрагмент был успешно использован в молекулярно-филогенетических исследованиях амфипод озера Байкал (McDonald et al., 2005; Sherbakov et al., 1999). В результате проведенных нами ПЦР реакций с использованием в качестве матрицы образцов ДНК, выделенной из амфипод популяции Ладожского озера, нами получены последовательности размером 710 п.н. Последующее секвенирование 12 образцов позволило получить 8 последовательностей. Выравнивание и анализ этих последовательностей позволили однозначно установить их принадлежность целевому фрагменту гена COI, а также убедиться в отсутствии изменчивости внутри изученной Ладожской популяции (Рис. 4). Полученные данные могут свидетельствовать об отборе, действующем в данной популяции, либо о прохождении популяцией этапа «бутылочного горлышка» (Nei et.al., 1975).



**Рисунок 4.** Последовательности фрагмента гена COI у представителей *G. fasciatus* Ладожского озера.

Полученный результат также подтвердил, что изучаемые нами рачки Ладожской популяции однозначно принадлежат виду *G. fasciatus*.

### **3.2 Сравнение последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы 1(COI) у амфипод из инвазивных популяции Ладожского озера и автохтонных популяций озера Байкал.**

При сравнении полученной последовательности гена COI Ладужской популяции *G. fasciatus* с депонированными в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), установлено, что последовательность гена COI мтДНК рачков из Ладужской популяции и у некоторых представителей юго-восточной Байкальской популяции идентичны. Максимальное сходство было установлено с последовательностями гена COI мтДНК рачков, отловленных в Муринской банке озера Байкал (Рис.5).

Gmelinoides fasciatus isolate 246Muri cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds;  
Sequence ID: [FJ715849.1](#) Length: 565 Number of Matches: 1

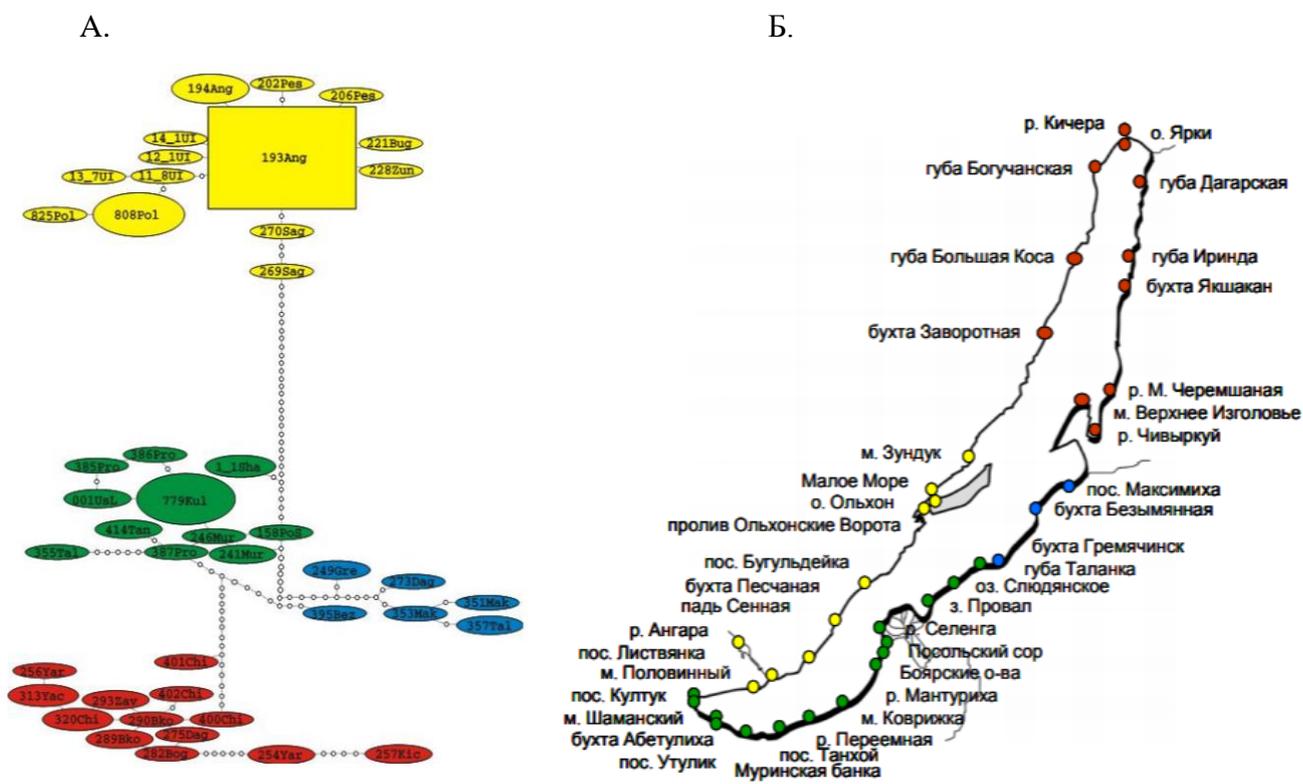
Range 1: 1 to 562 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score          | Expect   | Identities    | Gaps      | Strand    |
|----------------|--|---------------|-----------|-----------|
| 1038 bits(562) | 0.0  | 562/562(100%) | 0/562(0%) | Plus/Plus |
| Query 24       | GGTCTGAACTGAGATCCCCAGGTAATCTAATAGGAGATGACCAACTCTATAATGTTATAG |               |           | 83        |
| Sbjct 1        | GGTCTGAACTGAGATCCCCAGGTAATCTAATAGGAGATGACCAACTCTATAATGTTATAG |               |           | 60        |
| Query 84       | TCACAGCACACGCTTTTATTATAATTTTCTTCATAGTGATACCAATCATAATTGGAGGTT |               |           | 143       |
| Sbjct 61       | TCACAGCACACGCTTTTATTATAATTTTCTTCATAGTGATACCAATCATAATTGGAGGTT |               |           | 120       |
| Query 144      | TTGGTAATTGACTCACCCCTTTAATACTCGGAGCTCCTGATATAGCCTTCCCCGGATAA  |               |           | 203       |
| Sbjct 121      | TTGGTAATTGACTCACCCCTTTAATACTCGGAGCTCCTGATATAGCCTTCCCCGGATAA  |               |           | 180       |
| Query 204      | ACAATATGAGATTTTGATTACTACCTCCCTCACTAGCTCTTCTTGCTTAAGAGGTGTAG  |               |           | 263       |
| Sbjct 181      | ACAATATGAGATTTTGATTACTACCTCCCTCACTAGCTCTTCTTGCTTAAGAGGTGTAG  |               |           | 240       |
| Query 264      | TTGAAAGAGGAGTTGGGACAGGTTGAACGTGTGTACCCCTTTGGCTAGAAATGTGGCTC  |               |           | 323       |
| Sbjct 241      | TTGAAAGAGGAGTTGGGACAGGTTGAACGTGTGTACCCCTTTGGCTAGAAATGTGGCTC  |               |           | 300       |
| Query 324      | ATAGGGGACCAGCAGTCGATTTAGCTATTTTTCCTTACATCTAGCTGGGGCCTCTTCTA  |               |           | 383       |
| Sbjct 301      | ATAGGGGACCAGCAGTCGATTTAGCTATTTTTCCTTACATCTAGCTGGGGCCTCTTCTA  |               |           | 360       |
| Query 384      | TTTTAGGCGGATTAATTTTATCTCCACTATTTTAAATATACAAAGCCCGGAATAAATA   |               |           | 443       |
| Sbjct 361      | TTTTAGGCGGATTAATTTTATCTCCACTATTTTAAATATACAAAGCCCGGAATAAATA   |               |           | 420       |
| Query 444      | TAGAACAACACCTTTATTTGTGTGGTCTATTTTAGTCACAACAATCTACTTTTGC      |               |           | 503       |
| Sbjct 421      | TAGAACAACACCTTTATTTGTGTGGTCTATTTTAGTCACAACAATCTACTTTTGC      |               |           | 480       |
| Query 504      | CTTTACCGGTTCTAGCAGGAGCCTTAACCATGCTTCTCACAGACCGAAACACCAACACGT |               |           | 563       |
| Sbjct 481      | CTTTACCGGTTCTAGCAGGAGCCTTAACCATGCTTCTCACAGACCGAAACACCAACACGT |               |           | 540       |
| Query 564      | CATTTTTTGACCCTAGCGGGGG                                       | 585           |           |           |
| Sbjct 541      | CATTTTTTGACCCTAGCGGGGG                                       | 562           |           |           |

**Рисунок 5.** Фрагменты гена первой субъединицы цитохромоксидазы (COI) *Gmelinoides fasciatus* из Ладужской популяции и последовательность из GenBank полученной из рачков юго-восточной популяции озера Байкал в Муринской банке.

Древо гаплотипов, построенное методом максимальной экономии на основе последовательностей фрагмента митохондриального гена COI (Рис.6А), позволило показать наличие четырех репродуктивно изолированных популяций *G. fasciatus* в озере Байкал (Рис. 6Б; Петунина, 2008). При этом было показано, что юго-восточная популяция является предковой для 3 остальных изолированных популяций и наиболее разнообразной

генетически. В данной работе также были проанализированы последовательности рачков из инвазивных популяций Финского залива и озера Арахлей, которые показали наибольшее сходство с последовательностями фрагмента этого гена у особей юго-восточной популяции.



**Рисунок 6.** Древо гаплотипов (А) и карта расположения мест сбора (Б) (по Петуниной, 2008).

А- Древо, построенное методом максимальной экономии на основе 108 последовательностей фрагмента митохондриального гена COI. Цветом выделены разные клады, соответствующие юго-западной (выделено желтым цветом), северной (красным), центральной (синим) и юго-восточной (выделено зеленым цветом). Площадь пропорциональна числу наблюдающихся гаплотипов;

Б - Карта-схема популяций *G.fasciatus* на Байкале. Цветом выделены популяции: юго-западная (желтым), северная (красным), центральная (синим) и юго-восточная (зеленым).

Проведенный нами анализ нуклеотидных последовательностей гена COI мтДНК для популяции *G. fasciatus* Ладожского озера полностью согласуются с литературными данными (Петунина, 2008), которые свидетельствуют в пользу интродукции бокоплава в 60-х годах XX в. из района Посольского Сора озера Байкал в другие водоемы (Задоевко,

1985). Иными словами, юго-восточная популяция бокоплава стала источником для *G. fasciatus*, колонизировавшего 44 водоема Урала, Сибири, Казахстана, Средней Азии, и Европейской части России (Задоевко, 1995; Карпевич, Горелов, 1995), в том числе, озеро Ладога и Финский залив.

### 3.3. Цитогенетический анализ *Gmelinoides fasciatus*

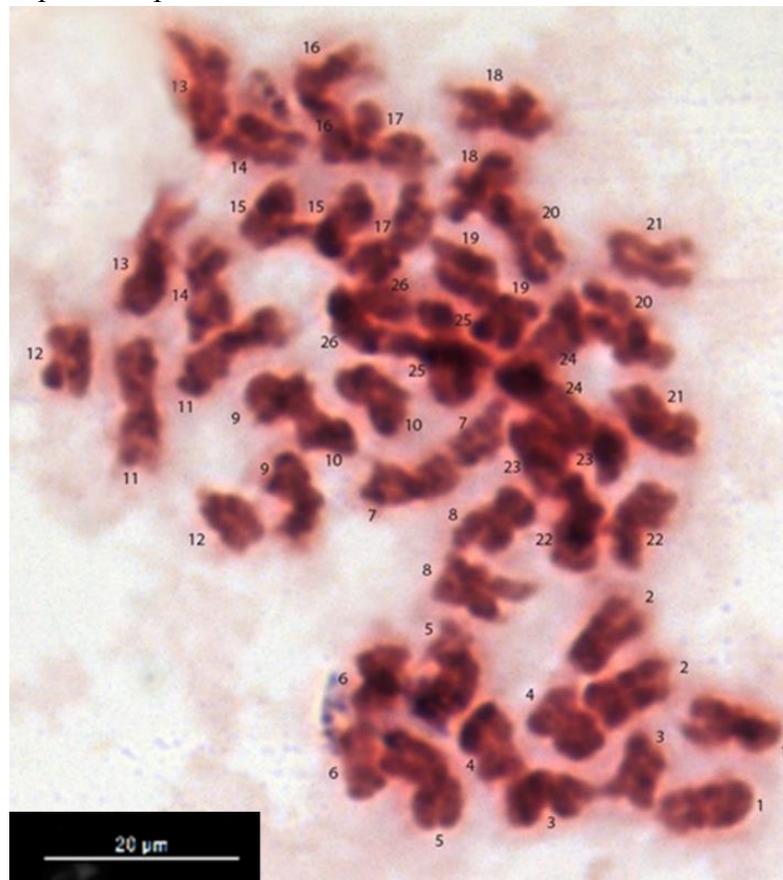
Проведение цитогенетического анализа дает возможность выявлять изменчивость по характеристикам хромосом в пределах вида, устанавливать сходство и различия по этим признакам между популяциями, на основании анализа кариотипов делать предположения относительно генетических механизмов, лежащих в основе высокой степени адаптации видов к изменившимся условиям среды обитания.

Отработка методики приготовления цитологических препаратов хромосом является решающим этапом для проведения цитогенетического анализа. На этом этапе были сопоставлены стадии эмбрионального развития, которые мы определяли в соответствии с информацией, имеющейся в литературе (Sundelin, Eriksson, 1998; Mann, Nyne, 2008), с характеристиками цитологических препаратов, приготовленных из находящихся на этих стадиях эмбрионов. Нам необходимо было определить, на какой стадии эмбрионы характеризуются достаточным количеством делящихся клеток. С этой целью самки с эмбрионами была разделены по группам в зависимости от временного интервала по отношению к моменту копуляции. Мы установили, что оптимальными для дальнейшей работы были эмбрионы у самок на третий день после конца копуляции. Стадии развития таких эмбрионов мы определили как 2 и 3 (Sundelin, Eriksson, 1998; Mann, Nyne, 2008). Эмбрионы на этих стадиях визуально характеризуются отсутствием ярко-выраженной дифференцировки органов. Начальные стадии эмбриогенеза позволяют анализировать крупные делящиеся клетки, которые не имеют тесных межклеточных соединений, что обуславливает легкость приготовления препарата с однослойным расположением клеток. Дополнительно для увеличения числа клеток, находящихся на стадии метафазы, нами была выбрана предобработка митостатиком кальцемидом и гипотония. Отработка методики подразумевала определение оптимального времени всех предобработок (см. Материал и методы). Препараты приготавливали методом спредирования на нагретой до 50<sup>0</sup>С металлической поверхности термостоллика. Получены десятки препаратов с клетками эмбрионов на стадии метафазы.

### 3.3.1 Ацетоорсеиновое окрашивание

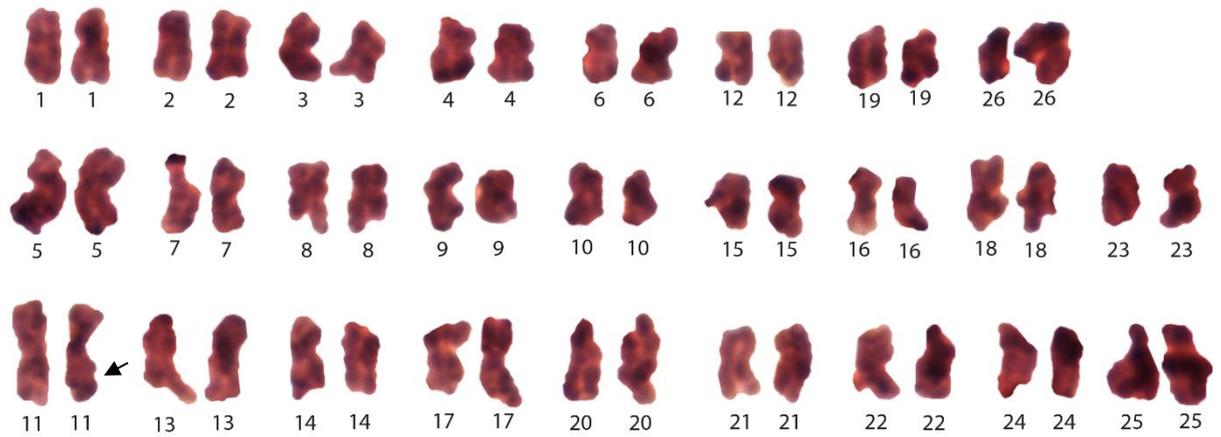
Первым этапом анализа препаратов эмбриональных клеток амфиоды *G. fasciatus* явилось окрашивание 4% ацетоорсеином. Оно позволило установить число хромосом в диплоидном наборе, как  $2n = 52$ . Ацетоорсеиновое окрашивание позволило выявить определенную неоднородность структуры хромосом по длине, а, именно, чередование светлых и более темных по окраске дисков, последние в некоторых случаях имели теломерное расположение, как в случае хромосом 4, 12, 15 (Рис.7,8), хотя можно также отметить и их интерстециальное расположение (например, хромосомы 1, 3, 11).

Представленная на Рис.7 метафазная пластинка была использована для составления кариограммы, которая отображена на Рис. 8.



**Рисунок 7.** Метафазная пластинка эмбриональной клетки *G. fasciatus* из Ладожской популяции. Пластинка получена методом спредирования после предобработки эмбриона кальцемином с последующей гипотонией и фиксацией.

В качестве диагностических признаков при поиске пар гомологов нами было использовано: 1) расположение хромосом на метафазной пластинке: более близкое расположение мы считали доводом в пользу пары, 2) сходство дискового рисунка, хотя и не в абсолютной мере, так как требуется выяснить природу этого рисунка, а также изучить изменчивость по этому показателю.



**Рисунок 8.** Раскладка хромосом *Gmelinoides fasciatus*  $2n=52$  или 26 пар хромосом.

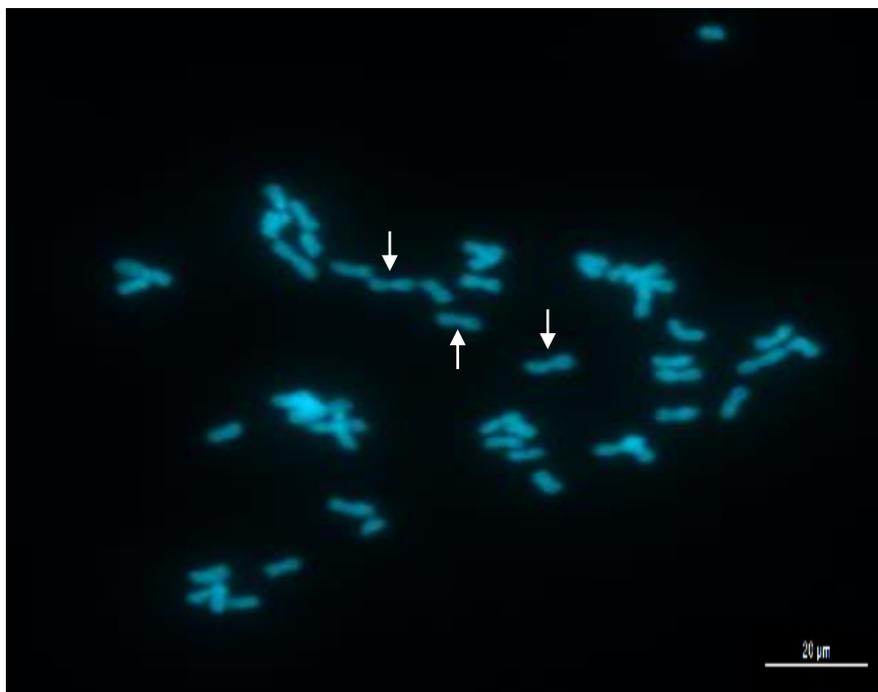
Стрелкой отмечен предполагаемый район ядрышкового организатора.

Обращает на себя внимание пара хромосом 11, которая, по всей видимости, является спутничной и содержит вторичную преретяжку или район ядрышкового организатора.

Анализ хромосом показал, что большинство из них имеют сходный размер, хотя, с учетом степени конденсации, можно выделить группы более крупных хромосом (5, 11, 13), хромосом среднего размера (1, 2, 7, 14, 17, 20) и мелких (6, 10, 12 и др.). Все хромосомы можно отнести к категории метацентрических и субметацентрических. Для точной идентификации гомологов очевидно не хватает чётких цитологических маркеров, поиск которых был произведен с помощью методов молекулярной цитогенетики.

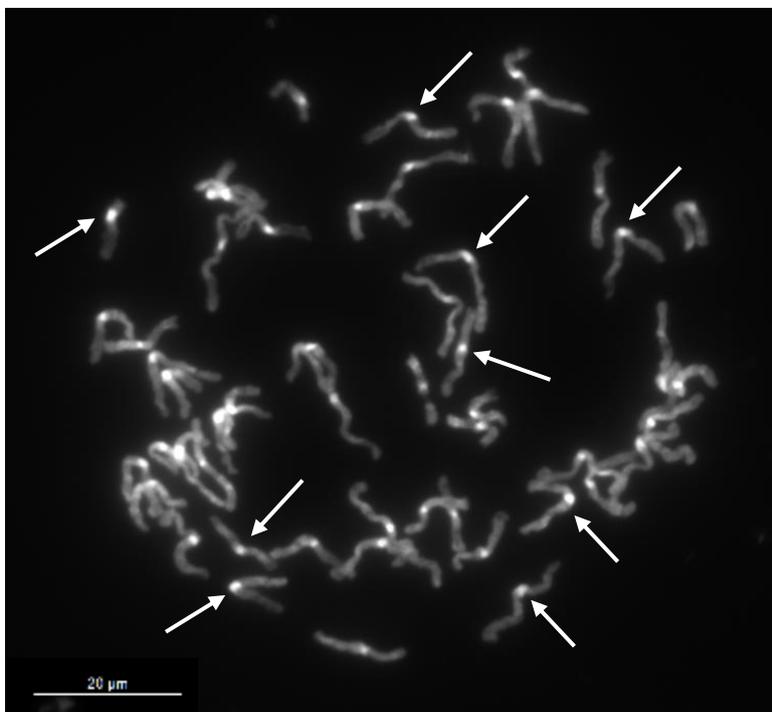
### 3.3.2. Окрашивание хромосом интеркалирующим красителем DAPI

Наряду с рутинной окраской с использованием 4% ацетоорсеина нами было предпринято окрашивание с использованием интеркалирующего красителя DAPI (Рис. 9).



**Рисунок 9.** Метафазная пластинка эмбриональной клетки *G. fasciatus* Ладожской популяции, полученная при помощи окраски DAPI после предобработки эмбриона митостатиком кальцемидом с последующей гипотонией и фиксацией. Стрелки указывают на первичные перетяжки метацентрических и субметацентрических хромосом. Обособления сестринских хроматид ещё не произошло.

Данное окрашивание позволило еще раз определить число хромосом в диплоидном наборе, как равное 52. Так, как известно, что краситель DAPI специфически связывается с А-Т-богатыми районами хромосом, то данный метод позволил получить дополнительную характеристику кариотипа, что иллюстрирует Рис. 10. В частности, для большинства отдельно лежащих хромосом отмечена центромерная локализация А-Т-богатых повторов, что согласуется с ранее полученными данными для амфипод (Libertini, Rampin, 2009). Важно отметить тот факт, что яркое свечение DAPI положительных блоков на хромосомах *G. fasciatus* не совпадает с рисунком дифференциальной исчерченности, получаемой в результате окраски ацетоорсеином, что по всей видимости свидетельствует в пользу выявления в последнем случае факультативного гетерохроматина.



**Рисунок 10.** Прометафазная пластинка эмбриональной клетки *G. fasciatus*, полученная при помощи окраски DAPI после предобработки эмбриона митостатиком кальцемином с последующей гипотонией и фиксацией. Стрелками указаны блоки А-Т богатого гетерохроматина, для которых характерна прицентромерная локализация. Блоки отсутствуют в области теломеров.

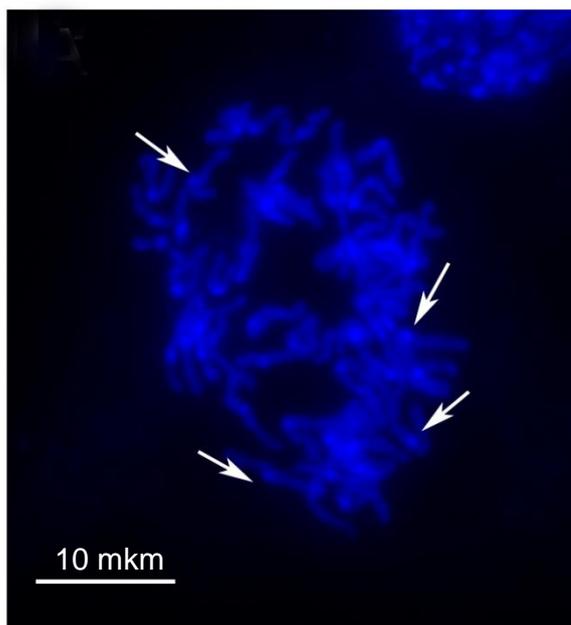
Следующим этапом было использование молекулярных маркеров для дальнейшей характеристики кариотипа *G. fasciatus*.

### **3.3.3. Флуоресцентная гибридизации *in situ* (FISH) с теломерными повторами (TTAGG)<sub>n</sub> и локализация их на хромосомах *G. fasciatus*.**

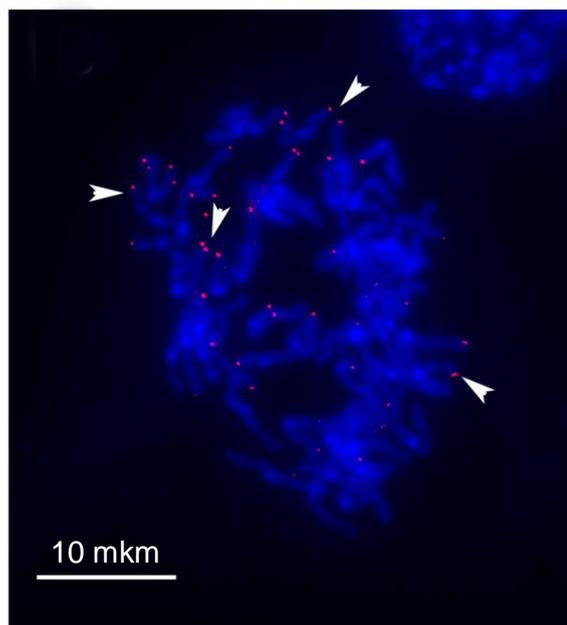
Молекулярно-цитогенетическую характеристику генома и кариотипа представителей исследуемых популяций *G. fasciatus* мы начали с проведения гибридизации ДНК-ДНК *in situ* на хромосомах амфипод теломерных повторов (TTAGG)<sub>n</sub>. Полученные результаты продемонстрировали, что эти повторы гибридизуются преимущественно на концах хромосом, а также были выявлены отдельные районы интерстициальной локализации сайтов гибридизации с зондом (Рис. 11). Последнее требует дальнейшего более детального исследования, поскольку такая особенность локализации может быть использована, во-первых, в качестве дополнительного цитологического маркера для сравнительной характеристики кариотипов исследуемых популяций амфипод, а, кроме того, может свидетельствовать о возникновении слияний хромосом в процессе эволюции

(Lee et al., 1993) или в процессе адаптации инвазивных популяций к новым условиям обитания.

А



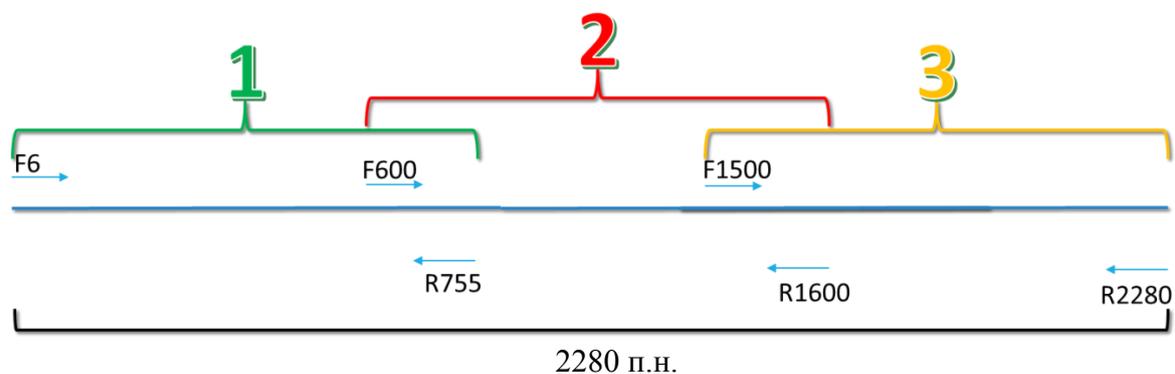
Б



**Рисунок 11.** Флуоресцентная гибридизация *in situ* с зондом (TTAGG)<sub>n</sub> на метафазных хромосомах *G. fasciatus*. Окраска DAPI (синий цвет). Стрелками указаны блоки А-Т богатого прицентромерного гетерохроматина, которые отсутствуют в области теломеров (А). Головками стрелок отмечены сайты гибридизации с теломерным повтором (красный сигнал, Б).

### 3.3.4 Анализ ядрышковых организаторов(NOR) в кариотипе *G. fasciatus* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

В качестве одного из молекулярных маркеров нами был использован зонд к последовательности гена 18S рибосомальной ДНК (рДНК). Для получения полной последовательности гена размером 2280 п.н. ген был разбит на 3 участка, к каждому участку на основании последовательностей, имеющих в GenBank (FJ756232.1, FJ752397.1, AY926852.1, AY926791.1), были подобраны прямой и обратный праймеры (Бондарева, 2016, неопубликованное) (Рис. 12). Затем полученные перекрывающиеся последовательности были выровнены с использованием программы BioEdit версии 7.1.9. Последовательность центрального участка данного гена была амплифицирована и секвенирована нами впервые.

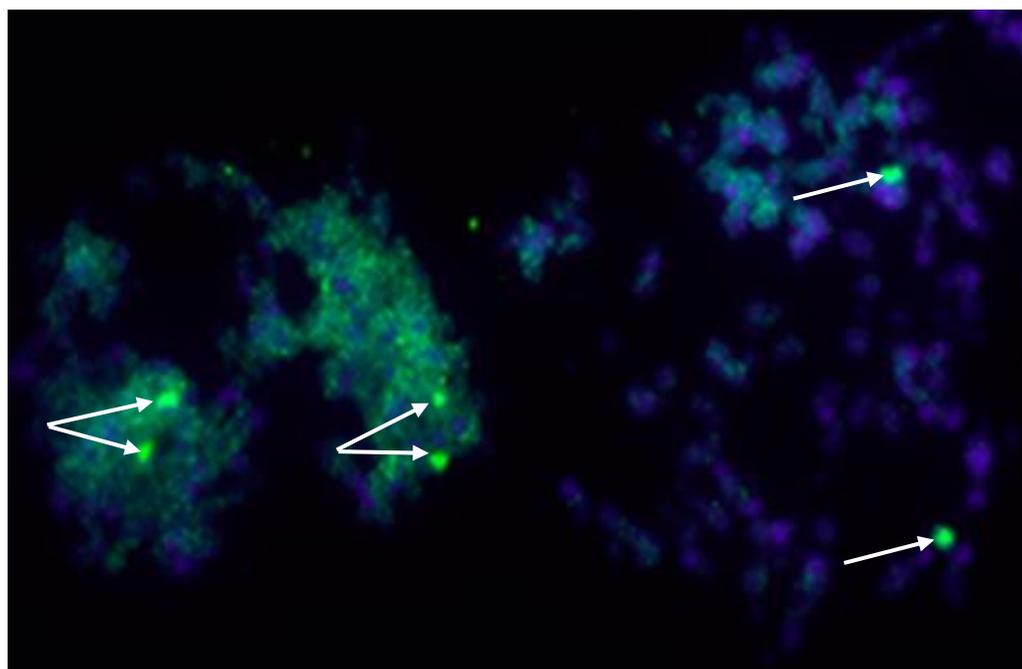


**Рисунок 12.** Схема расположения праймеров для амплификации трёх фрагментов гена 18S рДНК с помощью ПЦР.

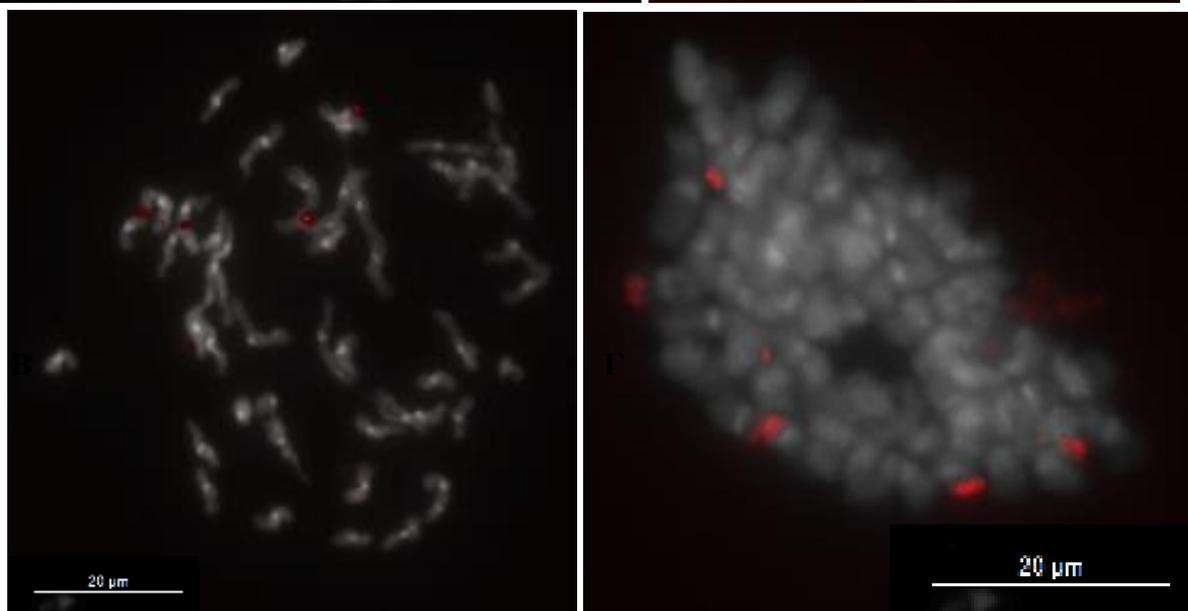
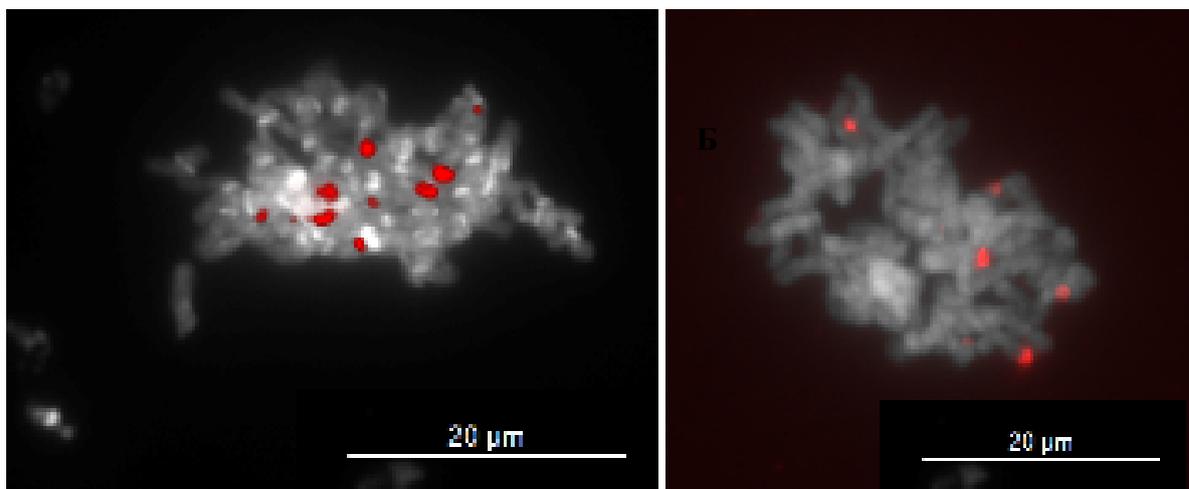
Полученные данные были использованы для синтеза 3 молекулярных зондов, соответствующих выделенным участкам:

- 1) 18S\_6-755bp; 2) 18S\_600-1600bp; 3) 18S\_1500-2280 bp.

Сравнение гибридизаций с 3 молекулярными зондами продемонстрировало максимальную эффективность зонда, комплементарного началу гена (зонд 18S\_6-755bp). Он и был использован в дальнейшей работе для выявления районов ядрышковых организаторов (NOR) в кариотипе *G. fasciatus*. Гибридизация молекулярного зонда 18S рДНК с хромосомами *G. fasciatus* позволила выявить 2 четких сигнала в профазных ядрах на одной паре хромосом на стадии метафазы (Рис. 13) у рачков популяции Ольгино в Финском Заливе, а у рачков из Ладоги – 4-10 сигналов (Рис.14) на стадиях (про)метафазы.



**Рисунок 13.** Флуоресцентная гибридизация *in situ* с зондом 18S rDNA 6-755bp на метафазных хромосомах *G. fasciatus*. Окраска DAPI (синий цвет). Стрелками отмечены сайты гибридизации.



**Рисунок 14.** Флуоресцентная гибридизация *in situ* с зондом 18S rDNA 6-755bp на прометфазных (В) и метафазных (А, Б, Г) хромосомах *G. fasciatus* популяции озера Ладога, позволила выявить варьирование числа сигналов (красная метка). Окраска DAPI (серый цвет). А – 10 сигналов; Б, Г – 5 крупных, 2 мелких; В – 4 сигнала.

Выявленная изменчивость по числу рибосомальных локусов на хромосомах представляет интерес и нуждается в более детальном изучении. Это явление может быть связано с интенсификацией системы синтеза белка в процессе адаптации инвазивных популяций амфипод к обитанию в более теплых условиях мелководья водоемов Северо-Запада. Такое предположение может иметь под собой основание, поскольку одним из замечательных свойств ядрышек является их высокая пластичность, которая проявляется в изменении размеров, морфологии и локализации в ядре при реакции на многие внешние

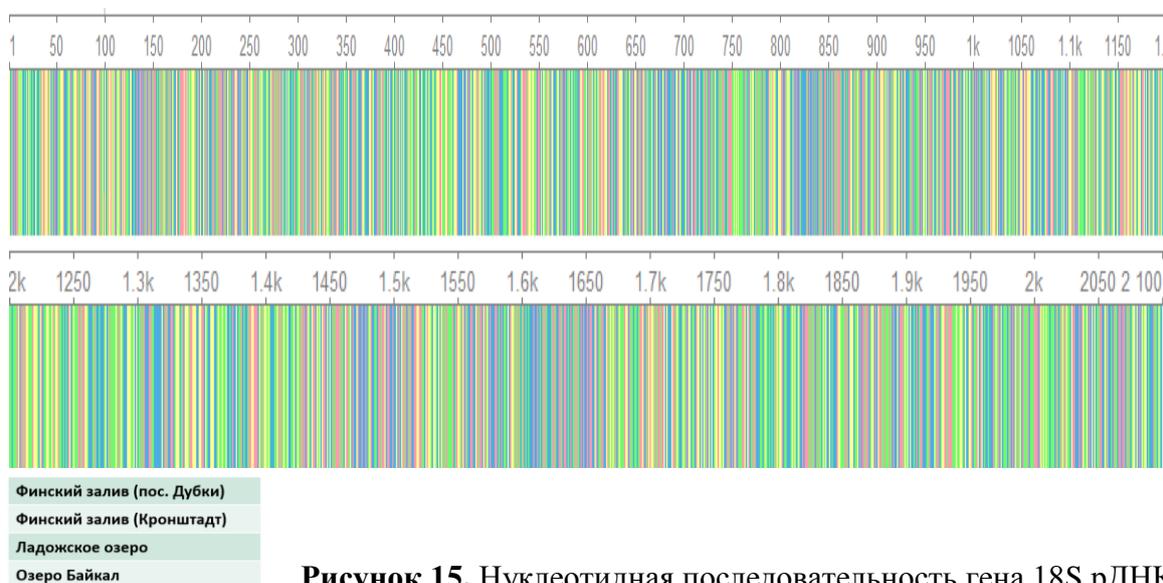
стрессовые воздействия, а также при адаптации к неблагоприятным факторам (Бобров и др., 2018). По данным некоторых авторов, ядрышко можно рассматривать в качестве центральной фигуры, координирующей клеточный ответ на стрессовые воздействия. Было показано, что при адаптации к длительному стрессу, вызванному ограничением движения, в клетках печени крыс наблюдалось возрастание количества ядрышек. С другой стороны, под влиянием низкой температуры (2 часа при 0-4 °С) в печени крыс происходила дегрануляция ядрышек, а через 10 часов после помещения животных снова в нормальные температурные условия ультраструктура ядрышек восстанавливалась (Бобров и др., 2018). Изучение эмбрионов рачков автохтонной Байкальской популяции позволит получить доводы в пользу или против данного предположения.

Следует отметить, что полученные нами данные согласуются с информацией, имеющейся в литературных источниках о встречающемся варьировании числа сигналов на хромосомах у амфипод (Rampin, 2011).

Если метод FISH гибридизации позволяет оценить число NOR, то метод секвенирования последовательностей позволяет охарактеризовать межпопуляционную изменчивость данного молекулярного маркера.

### 3.4 Анализ нуклеотидных последовательностей гена 18S рДНК *Gmelinoides fasciatus*

Сбор материала в Финском заливе, Ладожском озере и озере Байкал позволил осуществить молекулярно-генетический анализ на основе сравнения последовательностей гена 18S рДНК у амфипод из разных мест обитания. Нами показана полная идентичность полученных последовательностей гена 18S рДНК у трёх изученных популяций (Рис. 15).



**Рисунок 15.** Нуклеотидная последовательность гена 18S рДНК у амфипод из разных популяций.

Отсутствие различий по данному консервативному гену, а также имеющиеся сведения о направленной интродукции байкальской амфиподы в водоемы Северо-Запада России позволяют утверждать, что в данной работе был представлен один и тот же вид амфипод – *G. fasciatus*. Этот вывод имеет важное самостоятельное значение в силу большой сложности определения видовой принадлежности амфипод по принятым в зоологии морфофизиологическим признакам. В ходе работы полные последовательности гена 18S рРНК были получены нами впервые, однако стоит отметить, что в GenBank уже имелись последовательности, соответствующие начальному и конечному участкам этого гена (GenBank: AY926852.1; AY926791.1; FJ756232.1; FJ752397.1). Существующие в GenBank последовательности, во-первых, помогли нам подобрать праймеры, а также получить последовательность, соответствующую центральной части гена. Во-вторых, известные последовательности были использованы в качестве образца для выравнивания и последующего сравнения полученных нами последовательностей нуклеотидов. Таким образом, получив полную нуклеотидную последовательность функционально важного и консервативного гена удалось расширить информацию о геноме *G. fasciatus*.

## Выводы

- 1) В результате освоение молекулярно-цитогенетических методов дана первичная характеристика генома *Gmelinoides fasciatus*:
  - кариотип амфиподы представлен 26 парами преимущественно метацентрических хромосом схожего размера;
  - выявлено варьирование числа ядрышковых организаторов от 2 до 10, а также интенсивности сигнала FISH с зондом 18S рДНК на хромосомах амфиподы;
  - локализация сигнала FISH зонда (TTAGG)<sub>n</sub> продемонстрирована в теломерных районах на большинстве хромосом, в ряде случаев отмечена интерстициальное расположение сигнала.
- 2) Отсутствие варибельности последовательностей нуклеотидов гена 18S рДНК у амфипод из популяций Ладожского озера, Финского залива и озера Байкал указывает на их принадлежность к одному виду - *G. fasciatus*.
- 3) Идентичность последовательности нуклеотидов фрагмента митохондриального гена COI у амфипод Ладожской популяции и юго-восточной части озера Байкал подтвердила источник происхождения вида-вселенца.

### Список литературы:

1. Алимов А.Ф. (2004). Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах / А.Ф. Алимов, Н.Г. Богущкая (ред.). – М.; СПб.: Товарищество научных изданий КМК – 436 с
2. Базова Н.В. (2002). Байкальский бокоплав *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.) в озере Гусиное (Бурятия) и его распространение в водоемах Восточной Сибири / Н.В. Базова // Сборник научных трудов. Экологические, физиологические и паразитологические исследования пресноводных амфипод. – Иркутск: Иркут. Ун-т – С. 18–26
3. Барков Д.В. (2005). Значение байкальской амфиподы *G. fasciatus* в структуре микрозообентоса литорали оз. Валаам (Ладожское озеро) / Д.В. Барков, Е.А. Курашов // Исследовано в России. – №... – С. 820–833.
4. Барков Д.В. (2006). Экология и биология байкальского вселенца *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing 1899) и его роль в экосистеме Ладожского озера: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 03.00.16 / Д.В. Барков. – СПб. – 26 с
5. Бекман М.Ю. (1951). Биология и продукционные возможности некоторых байкальских и сибирских бокоплавов / М.Ю. Бекман, А.Я. Базикалова // Тр. Проблемных и тематических совещаний ЗИН. – Вып. 1. – С. 61–67.
6. Березина Н.А. (2003). Вселение байкальской амфиподы *G. fasciatus* (Amphipoda, Crustacea) в Онежское озеро / Н.А. Березина, В.Е. Панов // Зоологический журнал. – Т. 82. – № 6. – С. 731–734.
7. Березина, Н. А. (2005). Сезонная динамика структуры и плодовитость популяции байкальского бокоплава (*Gmelinoides fasciatus*, Amphipoda, Crustacea) в зарослевой зоне Невской губы. *Зоологический журнал*, 84(4), 411-419.
8. Бобров И.П., Лычева Н.А., Крючкова Н.Г., Лепилов А.В., Шахматов И.И., Долгатов А.Ю., Осипова А.В., Красова А.А. (2018). Морфофункциональная характеристика ядрышковых организаторов клеток печени при экстремальном холодовом стрессе и в постгипотермическом периоде // *Современные проблемы науки и образования* – № 1. DOI 10.17513/spno.27366
9. Бородин Н. Д. (1979). Байкальский бокоплав *Gmelinoides fasciatus* в Куйбышевском водохранилище.— *Зоол. журн.*, 58, 6.
10. Вербицкий В.Б., Березина Н.А. (2001). Возможности распространения байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.) в связи с особенностями ее температурной и соленостной толерантности. Тез. докл. VIII съезда ГБО РАН. – Калининград, – Т. II. – С. 72.

11. Визер А.М. (1981). Результаты вселения байкальских гаммарид в Новосибирское водохранилище // Рыбное хоз-во. – № 4. – С. 47–48
12. Визер А.М. (2006). Акклиматизация байкальских гаммарид и дальневосточных мизид в Новосибирском водохранилище: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.М. Визер. – Томск. – 21 с
13. Гоманенко Г.В. (2005). Популяционная структура байкальского бокоплава *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) // Генетика. – Т. 41. – № 7. – С. 1–6.]
14. Грезе В.Н. (1951). Байкальские элементы фауны как акклиматизационный фонд / В.Н. Грезе // Труды Всесоюзного гидробиологического общества. – Т. 3. – С. 221–226
  
15. Даев Е. В., Барабанова Л. В., Бондаренко Л. В., Си-моненко В. Д. (2002). Ракообразные отряда Isopoda как тест-объект для оценки экологического состояния водной среды. Вестн. Санкт-Петербургского государственного университета, Сер.3. Вып. 4 (№ 27). С. 60-64.  
Даев Е. В., Дукельская А. В., Казарова В. Э. (2009). Подход к оценке мутагенности загрязненной воды цитогенетическими методами с использованием биоиндикаторного вида *Asellus acuaticus* (Isopoda). Экологическая генетика. Т. VII (3): С. 10-16.
16. Даев, Е. В., Дукельская, А. В., Барабанова, Л. В. (2014). Цитогенетические методы индикации экологической напряженности в водных и наземных биосистемах. *Ecological genetics*, 12(2).
17. Ербаева Э.А. (1991). Распространение байкальской эндемичной фауны в водохранилищах Ангарского каскада // Тез. докл. VI съезда ВГБО. – Мурманск – Т. 2. – С. 164–165.
18. Задоев И.Н. (1985). Результаты и перспективы акклиматизации байкальских гаммарид в водоемах СССР / И.Н. Задоев, О.А. Лейс, В.Ф. Григорьев // Сб. науч. трудов ГосНИОРХ. – Т. 232. – С. 30–34.
19. Задоев И. Н. (1995). Результаты и перспективы акклиматизации беспозвоночных в водоемах бывшего СССР. *Результаты работ по акклиматизации водных организмов. СПб*, 146-154.
20. Захаров И.А.(1999). Бактерии управляют половым размножением насекомых, ПРИРОДА №5 стр 28-34.

21. Иоффе Ц.И. (1968). Биология некоторых ракообразных, перспективных для акклиматизации в водохранилищах / Ц.И. Иоффе, Л.П. Максимова // Изв. ГосНИОРХ. – Т. 67. – С. 81–104.
22. Иоффе Ц.И. (1968). Обзор выполненных работ по акклиматизации кормовых беспозвоночных для рыб в водохранилищах / Ц.И. Иоффе // Известия – Т. 67. – С. 7
23. Иоффе Ц.И. (1974). Обогащение кормовой базы для рыб в водохранилищах СССР путем акклиматизации беспозвоночных / Ц.И. Иоффе // Изв. ГосНИОРХ. – Т. 100. – С. 3–206.
24. Камалтынов Р.М. (2001). Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Озеро Байкал / Р.М. Камалтынов. – Новосибирск: Наука – Т. 1, кн. 1. – С. 572 – 831.
25. Карпевич, А. Ф., & Горелов, В. К. (1995). Некоторые теоретические аспекты и результаты акклиматизации гидробионтов. In *Результаты работ по акклиматизации водных организмов. СПб* (р. 5).
26. Мац В.Д. (2011). Позднемеловая кайнозойская история Байкальской впадины и формирование уникального биоразнообразия Байкала / В.Д. Мац, Д.Ю. Щербаков, И.М. Ефимова // Стратиграфия. Геологическая корреляция. – Т. 19. – № 4. – С. 40–61
27. Мельник, М. М., Михайлов, А. Е. (2001). Особенности биологии бокоплава *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.) в Псковско-Чудском озере. In *VIII съезд Гидробиологического общества РАН. Т. II: Тез. докл. Калининград: КГГУ* (р. 85).
28. Механикова И.В. (2000). Морфо-экологические адаптации байкальского бокоплава *Gmelinoides fasciatus* к условиям существования в водоемах различного типа // Труды Биолого-почвенного факультета ИГУ – Вып. 3. – С. 104–114.
29. Огарков О.Б. (1997). Анализ филогенетических взаимоотношений байкальских эндемичных амфипод (Crustacea, Amphipoda) на основании сравнения нуклеотидных последовательностей участка митохондриального гена III субъединицы цитохромоксидазы // Молекулярная биология – Т. 31. – № 1. – С. 32–37.
30. Огарков О.Б. (1999). Молекулярно-биологическое исследование эволюции байкальских амфипод (Crustacea, Amphipoda): автореф. дис. ... канд. биол. Наук / О.Б. Огарков. – Новосибирск: ИЦиГ. – 16 с.
31. Панов В.Е. (1994). Байкальская эндемичная амфипода *Gmelinoides fasciatus* Stebb. В Ладожском озере Доклады академии наук, том 336, № 2, с. 279-282.

32. Панов В.Е. (2001). Последствия намеренных интродукций водных организмов в водоемы европейской части России (на примере байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.) / В.Е. Панов, Н.А. Березина // Тез. докл. VIII съезда ГБО РАН. – Калининград. – Т. II. – С. 90.
33. Петунина Ж. В. (2008). Сравнительный анализ генетического разнообразия байкальских амфипод *gmelinoides fasciatus* и их паразитов, микроспоридий, в озере Байкал // Диссертация. Лимнологический Институт Со РАН.
34. Рожкова Н.А. (2001). Зообентос Иркутского водохранилища / Н.А. Рожкова, И.В. Механикова // Исследования фауны водоемов Восточной Сибири: Сб. науч. тр. – Иркутск: Иркут. ун-т. – С. 147–159
35. Северцов А.С. (1990). Внутривидовое разнообразие как причина эволюционной стабильности / А.С. Северцов // Журн. общ. биол. – Т. 51. – № 5. – С. 579–599
36. Сидорова А.И. (2012). Реакция байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* Stebbing на действие ливневых стоков города Петрозаводска / А.И. Сидорова, Н.М. Калинин, И.В. Дыдик // Труды Карельского научного центра РАН. – № 2. – С. 125–130
37. Тахтеев В.В. (2000). Очерки о бокоплавах озера Байкал (систематика, сравнительная экология, эволюция) / В.В. Тахтеев. – Иркутск: Изд-во Иркутского ун-та. – 355 с
38. Тахтеев В.В. (2009). Байкальские родники / В.В. Тахтеев, А.В. Галимзянова // Экология и жизнь. – Т. 3. – № 88. – С. 40–45.
39. Тимофеев М.А. (2000). Сравнительная оценка отношения байкальских гаммарид и голарктического *Gammarus lacustris* Sars к абиотическим факторам: Дис. ... канд. биол. наук. / М.А. Тимофеев; Иркутск – ... с.
40. Тютеньков С. К., Козляткин А. Л. (1980). Итоги работ по вселению бентических беспозвоночных в Бухтарминское водохранилище. *Итоги и перспективы акклиматизации рыб и беспозвоночных в водоемах СССР. Тез. докл. М.*
41. Щербаков Д.Ю. (1997). Эволюция байкальских гаммарид по данным последовательностей гена 18S рРНК. // Международный симпозиум «Экологические эквивалентные виды гидробионтов в великих озерах мира»: Тез. докл. (Улан-Удэ, 2–4 сентября г.). – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 1997. – С. 96–97.
42. Alimov A. F., V. E. Panov, P. I. Krylov, I. V. Telesh, D. E. Bychenkov, V. L. Zimin, A. A. Maximov & L. A. Filatova, (1998). Problema antropogennoy introdukcii chugerochnikh organizmov v basseine Finskogo zaliva. In Frolov, A. K. (ed.),

- Ekologicheskaya situatsiya v Sankt-Peterburge i Leningradskoy oblasti v 1997 godu. (The problem of anthropogenic introductions of non-indigenous organisms in the Gulf of Finland basin, in Russian). Analiticheskiy obzor. Sankt-Petersburg: 243–248.
43. Arkhiptseva, N. T., I. V. Baranov, G. M. Zabelina, V. V. Pokrovsky, S. A. Serebrova, I. I. Tereshenkov & G. A. Tsybaleva, (1977). Oзера basseina severnogo rukava reki Vuoksi. In Pokrovsky, V. V. (ed.), Kadastr malykh ozer Leningradskoy oblasti. Part 1: Oзера Karelskogo peresheika. (Lakes of the Vuoksa Basin, in Russian). Trudy GosNIORKh 124: 83–134.
  44. Barkov D.V., Kurashov E.A. (2009a). Food Composition and Feeding Rate of the Lake Baikal Invader *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) in Lake Ladoga \ Institute of Limnology, Russian Academy of Sciences, ul. Sevast'yanova 9, St. Petersburg, 196105 Russia email: evgeny\_kurashov@mail.ru Received November 18.
  45. Barkov D.V., Kurashov E.A. (2009b). Feeding Selectivity, Food Assimilability and Demand of the Baikal Invader *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) in Lake Ladoga \ Institute of Limnology, Russian Academy of Sciences, ul. Sevast'yanova 9, St. Petersburg, 196105 Russia email: evgeny\_kurashov@mail.ru Received November 19.
  46. Barkov D. V., Kurashov E. A. (2011). Food Composition and Feeding Rate of the Lake Baikal Invader *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) in Lake Ladoga, *Biologiya Vnutrennikh Vod*, No. 3, pp. 51–61
  47. Berezina N.A., Panov V.E. (2004). Distribution, population structure and salinity tolerance of the invasive amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) in the Neva Estuary (Gulf of Finland, Baltic Sea). *Hydrobiologia* 514, 199-206.
  48. Brooks J.L. (1950). Speciation in ancient lakes. *Quart. Rev. Biol.* – Vol. 25. – № 1 – P. 30–60.
  49. Daev E.V. and Dukelskaya A.V. (2011). The karyotype instability of wild nature inhabitants could serve as general sign of adverse environmental impact. *Journal of Environmental Indicators* 6, 33-40.
  50. Drouin G, Sevigny J., McLaren I., Hofman JD, Doolittle WF (1992). Variable arrangement of 5S ribosomal genes within the ribosomal DNA repeats of arthropods. *Mol Biol Evol* 9(5):826–835
  51. Drouin G, de Sá M., (1995). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol* 12(3):481–493
  52. Duron O. (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone / *BMC Biol.* – Vol.6. – № 27. – P.

53. Folmer O. (1994). DNA primer for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. – Vol. 3. – P. 294–299.
54. Garcia S., Lim K.Y., Chester M., Garnatje T., Pellicer J., Valles J., Leitch A.R., Kovařík A. (2009). Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma* 118(1):85–97.
55. Garcia S, Kovařík A. (2013). Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA genes (rDNA) organisation. *Heredity* 111(1):23–33.
56. Garcia S., Kovařík A., Leitch A.R., Garnatje T. (2017). Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the plant rDNA database. *Plant J* 89(5):1020–1030.
57. Gray M.W., Burger G., Lang B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476–1481
58. Jeffery N.W., Yampolsky Y., Gregory R., (2016). Nuclear DNA content correlates with depth, body size, and diversification rate in amphipod crustaceans from ancient Lake Baikal, Russia, *Genome* 60(4)
59. Klingerman A. D., Bloom S. E. (1977). Rapid chromosome preparation from solid tissue of fishes. – *Journal of Fishery Research Board of Canada* 34: 266–269
60. Krapp T., Rampin M., Libertini A. (2008). A cytogenetical study of Ischyroceridae (Amphipoda) allows the identification of a new species, *Jassa cadetta* sp. n., in the Lagoon of Venice. *Org Divers Evol* 8: 337-345
61. L
62. Libertini, A., Rampin M. (2009). A molecular cytogenetic study on some Icelandic amphipods (Crustacea) by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Open Zoology Journal*, 2, 109-116.
63. Lee C., Sasi R., Lin C. C. (1993). Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. *Cytogenetic and Genome Research*, 63(3), 156-159.
64. Macdonald, K. S., L. Yampolsky, J. E. Duffy (2005). Molecular and morphological evolution of the amphipod radiation of Lake Baikal. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 323–343
65. Mann, R. M., Hyne, R. V. (2008). Embryological development of the Australian amphipod, *Melita plumulosa* Zeidler, 1989 (Amphipoda, Gammaridea, Melitidae). *Crustaceana*, 81(1), 57-66.

66. McDonald I.R., Smith K., Lidstrom M.E. (2005). Methanotrophic populations in estuarine sediment from Newport Bay, California // *FEMS Microbiology Letters*. – № 250. – P. 287–293.
67. Moritz C., Dowling T.E., Brown W.M. (1987). Evolution of Animal mitochondrial DNA-relevance for population biology and systematic. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 269-292.
68. Nei M., Maruyama T., Chakraborty R., (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.
69. Nilova, O. I., (1976). Nekotorye cherty ekologii i biologii *Gmelinoides fasciatus* Stebb. akklimirovannogo v ozero Otradnoe Leningradskoy oblasti. (Some features of ecology and biology of *Gmelinoides fasciatus* acclimatized in Lake Otradnoe in Leningrad Region). *Trudy GosNIORKh* 110: 10–15 (in Russian)
70. Panov V.E. (1996). Establishment of the Baikalian endemic amphipod *Gmelinoides fasciatus* Stebb. in Lake Ladoga / V.E. Panov // *Hydrobiologia*. – № 322. – P. 187–192.
71. Panov, V. E., P. I. Krylov & I. V. Telesh, (1999). The St. Petersburg harbour profile. In Gollasch, S. & E. Leppäkoski (eds.), Initial risk assessment of alien species in Nordic coastal waters. Nord 1999: 8. Nordic Council of Ministers, Copenhagen: 225–244.
72. Patwardhan, A., Ray, S., Roy, A. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies—A Review. *Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2, 1-9.
73. Pelliccia E, Volpi E. V., Lanza V., Gaddini L., Baldini A., Rocchi A., 1994: Telomeric sequences of *Asellus aquaticus* (Crust. Isop.). - *Heredity* 72: 78-80.
74. Pelliccia, F., Barzotti, R., Volpi, E.V., Bucciarelli, E., and Rocchi, A. (1998). Nucleotide sequence and chromosomal mapping of the 5S rDNA repeat of the crustacean *Proasellus coxalis*. *Genome*, 41: 129–133
75. Pinkel D. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization // *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 83, pp. 2934-2938
76. Prokopowich C.D., Gregory T.R., Crease T.J. (2003). The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46, 48–50.
77. Protopopova M.V. (2011). Small HSPs molecular weights as new indication to the hypothesis of segregated status of thermophilic relict *Gmelinoides fasciatus* among Baikal and Palearctic amphipods // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. – Vol. 7. – № 2. – P. 175–182.
78. Rampin M. Amphipods genome evolution: a molecular cytogenetics approach // Conference paper: Monitoring European Biodiversity Conference: The role and importance of amphipod crustaceans 2011.

79. Roa F., Guerra M. (2015). Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 146(3):243–249
80. Salemaa H. (1979). The Chromosomes of *Asellus aquaticus* (L.): A Technique for Isopod Karyology / *Crustaceana* Vol. 36, No. 3, pp. 316-318
81. Salemaa H. (1984). Polyploidy in the evolution of the glacial relict *Pontoporeiu* spp. (Amphipoda, Crustacea) / *Hereditas* - 100: 5340.
82. Sherbakov D.Yu. (1998). Patterns of evolutionary change in Baikalian Gammaridae inferred from DNA sequences (Crustacea, Amphipoda) // *Molecular Phylogeny and Evolution*. – Vol. 10, № 2. – P. 160–167
83. Sherbakov D.Yu. (1999). On the phylogeny of Lake Baikal amphipods in the light of mitochondrial and nuclear DNA sequence data // *Crustaceana*. – Vol. 72. – № 8. – P. 911–919.
84. Sidorov D.A. (2013). Unexpected finding of the invasive Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* in a cold spring of the southern Pamir Mountains / D.A. Sidorov, Gontcharov A.A., Palatov D.M. // *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. – V. 411. – № 12. – P. 1–8
85. Sochorová, S. Garcia, F. Gálvez, R. Symonová, A. Kovařík. (2018). Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database Jana, *Chromosoma* 127: 141.
86. Sundelin B., Eriksson A.K. (1998). Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monorelia affinis* in the Baltic Sea// *Marine Ecology Progress Series*. – V.171. – P. 165-180.
87. Takhteev V.V. (2009). Amphipods (Amphipoda) of thermal and mineral springs of northern part Baikal region / V.V. Takhteev // *Biota of waterbodies of Baikal rift zone*. – Irkutsk: Publishers of Irkutsk state universit. – P. 123–130 (in Russian).].
88. Terry R.S. (2004). Widespread vertical transmission and associated host sex-ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora // *Proc. R. Soc. Lond. B*. – Vol. 271. – P. 1783–1789
89. Traut W. and Clarke C. A. (1997). Karyotype evolution by chromosome fusion in the moth genus *Urgyia*. - *Hereditas* 126: 77-84.
90. Traut W., Szczepanowski M., Vitkova M., Opitz C., Marec F., Zrzavy J.(2007). The telomere repeat motif of basal metazoa. *Chromosome Res* 15: 371–382.
91. Väinölä R. (2008). Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater // *Hydrobiologia*. – № 595. – P. 241–255.

92. Wicke S, Costa A, Muñoz J, Quandt D (2011). Restless 5S: The re arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Mol Phylogenet Evol* 61(2):321–332

### **Благодарности:**

Выражаю глубочайшую благодарность моему научному руководителю Ларисе Владимировне Барабановой за помощь в работе и неоценимую поддержку.

А также Елене Игоревне Михайловой и Светлане Анатольевне Галкиной за обучение методам, профессиональные советы и рекомендации.

Сотрудникам ресурсного центра Хромас за помощь в выполнении настоящей работы и приятную рабочую атмосферу, в частности Алсу Фаритовне Сайфитдиновой, Антону Владимировичу Радаеву и Марие Михайловной Кулак

Наталье Иосифовне Абрамсон и Ольге Бондаревой за предоставленную информацию о праймерах.

Андрею Румянцеву за помощь в работе.

И преподавателям кафедры генетики и биотехнологии за профессиональные знания и жизненный опыт.