-

# Том 83, номер 1, 2022

(Воспроизводится в журнале "Current Contents")	
Концепция современных молекулярных часов и опыт оценки времен дивергенции насекомоядных и грызунов <i>А. А. Банникова, В. С. Лебедев</i>	3
Изменения комплекса симбиотических дрожжей Drosophila melanogaster при адаптации мух к субстратам с повышенным содержанием NaCl А. С. Дмитриева, Е. Ю. Яковлева, И. А. Максимова, А. А. Белов, А. В. Марков	29
Характеристика клещей Varroa underwoodi (Acari: Varroidae) в популяции Apis cerana ussuriensis (Hymenoptera: Apidae) в Приморском крае, Россия Р. А. Ильясов, Д. И. Такахаши, М. Л. Ли, М. Ю. Прощалыкин, А. С. Лелей, Х. В. Квон, В. Н. Даниленко, А. Г. Николенко	38
Морфотипы мух-кровососок (Diptera, Hippoboscidae) по морфологии пульвилл и эмподиев в контексте широты круга хозяев <i>А. А. Яцук, А. Ф. Сафонкин, А. В. Матюхин, Т. А. Триселева</i>	51
Свет и <sup>13</sup> С: отличаются ли орхидеи от других сосудистых растений по реакции на затенение? В. Г. Онипченко, Дж. Х. Корнелиссен, М. Г. Вахрамеева, Л. Д. Захарова, А. А. Ахметжанова, М. И. Хомутовский, Р. ван Логтестин, Н. А. Судзиловская	62
Адаптивный потенциал амброзии полыннолистной ( <i>Ambrosia artemisiifolia</i> L., Asteraceae) в связи с ее продвижением на север: опыт биоклиматического и эколого-географического анализа и моделирования распространения инвазивного вида	
А. Н. Афонин, О. Г. Баранова, Ю. Ю. Кулакова, Ю. А. Федорова, Д. Р. Владимиров, А. В. Герус, Е. Ю. Герус, А. Я. Григорьевская, Т. Ю. Закота	71

На обложке воспроизведена гравюра из немецкой книги XV в. Якоба Мейденбаха "Большой сад здоровья" (Meidenbach. Hortus sanitalis, 1491). Подробнее см. № 1, 1992, стр. 141-ю.

# Contents

# Vol. 83, No. 1, 2022

#### (Indexed in "Current Contents") The concept of modern molecular clock and experience in estimating divergence times of Eulipotyphla and Rodentia A. A. Bannikova, V. S. Lebedev 3 Changes in the symbiotic yeasts of Drosophila melanogaster in course of adaptation to substrates with extra NaCl content A. S. Dmitrieva, E. Yu. Yakovleva, I. A. Maksimova, A. A. Belov, A. V. Markov 29 Characteristics of Varroa underwoodi mites (Acari: Varroidae) in the population of Apis cerana ussuriensis (Hymenoptera: Apidae) in the Primorsky Krai of Russia R. A. Ilyasov, J. I. Takahashi, M. L. Lee, M. Yu. Proshchalykin, A. S. Lelej, H. W. Kwon, V. N. Danilenko, A. G. Nikolenko 38 The morphotypes of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) based on the morphology of pulvillae and empodia in the context of host range A. A. Yatsuk, A. F. Safonkin, A. V. Matyukhin, T. A. Triseleva 51 Light and <sup>13</sup>C: Are orchids different from other vascular plants in their response to shade? V. G. Onipchenko, J. H. C. Cornelissen, M. G. Vakhrameeva, L. D. Zakharova, A. A. Akhmetzhanova, M. I. Khomutovskiy, R. van Logtestijn, N. A. Soudzilovskaia 62 Adaptive potential of ragweed (Ambrosia artemisiifolia L., Asteraceae) in connection with its movement to the north: The experience of bioclimatic and ecological niche analysis of the invasive species A. N. Afonin, O. G. Baranova, Yu. Yu. Kulakova, Yu. A. Fedorova, D. R. Vladimirov, A. V. Gerus, E. Yu. Gerus, A. Ya. Grigorjevskaja, T. Yu. Zakota 71

УДК 599.113

# КОНЦЕПЦИЯ СОВРЕМЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЧАСОВ И ОПЫТ ОЦЕНКИ ВРЕМЕН ДИВЕРГЕНЦИИ НАСЕКОМОЯДНЫХ И ГРЫЗУНОВ

© 2022 г. А. А. Банникова<sup>1, \*</sup>, В. С. Лебедев<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия <sup>2</sup>Зоологический музей МГУ им. М.В. Ломоносова ул. Большая Никитская, 2, Москва, 125009 Россия \*E-mail: hylomys@mail.ru \*\*E-mail: hylomys@mail.com Поступила в редакцию 19.07.2021 г. После доработки 07.10.2021 г. Принята к публикации 24.10.2021 г.

Почти 60 лет прошло с тех пор. как было обнаружено, что степень различия ДНК двух видов является функцией времени с момента их дивергенции. В дальнейшем стало ясно, что универсальных молекулярных часов не существует, скорость молекулярной эволюции широко варьирует в зависимости от гена и филогенетической линии, коррелируя с биологическими характеристиками (продолжительность поколения, размер тела, плодовитость) и особенностями генома. Развитие концепции молекулярных часов связано с прогрессом методов, позволяющих учитывать и измерять степень непостоянства скорости молекулярной эволюции. В настоящее время большинство датировок выполняется с помощью методов нестрогих часов (Relaxed clock), которые опираются на разнообразные модели скорости молекулярной эволюции (например, с автокорреляцией скоростей в соседних ветвях или без нее). Другой актуальный фактор, позволяющий уменьшить ошибки молекулярных датировок — увеличение объема данных вплоть до геномного уровня, что повышает требования к вычислительной эффективности алгоритмов и методам разложения данных на партиции. Отдельная проблема – нелинейная зависимость оценок скорости эволюции от времени (феномен rate decay), что особенно существенно для анализа недавней истории. В отсутствие адекватной модели эволюции последовательностей нуклеотидов оценки времен могут оказаться существенно смещенными, от чего часто страдают результаты, полученные по мтДНК. Одно из важнейших направлений – развитие методов получения калибровочной информации, прежде всего – более полное использование постоянно и быстро растущего объема палеонтологических данных, анализ палеоДНК и других вариантов гетерохронных данных. Несмотря на то, что точность оценок уровней молекулярных дивергенций продолжает расти, неопределенность датировок сохраняется во многом из-за неоднозначности калибровок и недостатков существующих моделей эволюции.

DOI: 10.31857/S0044459622010031

Начавшись с простой предпосылки, что эволюционные изменения на молекулярном уровне происходят с относительно постоянной скоростью (Zuckerkandl, Pauling, 1962), наши представления о молекулярных часах за прошедшие 60 лет претерпели существенную эволюцию. На протяжении этого времени значительные усилия были приложены к тому, чтобы понять причины изменения скорости эволюции на филогенетических древах и применить сам принцип молекулярных часов для оценки временных масштабов эволюции. Появился широкий спектр моделей молекулярных часов, которые допускают варьирование скорости эволюции и позволяют оценивать времена даже при их сильном различии в разных филогенетических линиях (Ho, Duchêne, 2014). Как результат, на основе молекулярного подхода возникла новая шкала времени. Причем в отличие от палеонтологических часов современные молекулярные часы предоставляют возможность датировать события дивергенции, относящиеся к широкому диапазону времен не только на филогенетическом, но и на популяционном уровне (Arbogast et al., 2002). В современной геномной эпохе откалиброванные по времени филогенетические древа — это фундаментальная отправная точка для исследования эволюции организмов.

# ИСТОРИЯ КОНЦЕПЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЧАСОВ

#### Открытие молекулярных часов

Гипотеза молекулярных часов заключается в том, что скорость накопления замен в нуклеотид-

ной или аминокислотной последовательности постоянна, из чего следует линейный характер зависимости между числом мутационных шагов (которые являются функцией числа различий в последовательностях) и временем дивергенции видов. Термин "молекулярные часы" (molecular evolutionary clock) был предложен Цукеркандлем и Полингом в 1965 г. (Zuckerkandl, Pauling, 1965). Сравнивая последовательности белков (гемоглобинов) у разных видов, они получили линейную зависимость числа аминокислотных замен от возраста видов, оцененного по ископаемым остаткам, и заявили о возможности использования этого свойства для оценки времени дивергенции между видами (Zuckerkandl, Pauling, 1962).

Изучая эволюцию гемоглобинов у приматов, Цукеркандль и Полинг оценили возраст дивергенции между гориллой и человеком в 11 млн лет (Zuckerkandl, Pauling, 1962), отметив, что это время соответствует минимальной (самой поздней) палеонтологической датировке (11–35 млн лет назад). Эти данные, так же как и другие молекулярные оценки времен дивергенции гоминоидов 60-х годов (Sarich, Wilson, 1967), оказались несовместимы с представлениями палеонтологов о большом эволюционном разрыве (масштабе фенотипической дивергенции) между человеком и человекообразными обезьянами (Wilson et al., 1977). В настоящее время относительно недавняя дивергенция человека и шимпанзе считается доказанной (Easteal, Herbert, 1997; Kumar et al., 2005). Вслед за работами Цукеркандля и Полинга по гемоглобинам появились сообщения о постоянстве скорости эволюции аминокислотой последовательности цитохрома С (Margoliash, 1963) и фибринопептидов (Doolittle, Blombäck, 1964), которые показали, что разные белки и гены отличаются по скорости эволюции и поддержали гипотезу молекулярных часов.

Цукеркандль и Полинг предвидели проблемы, которые могли затруднить применение молекулярных часов (Zuckerkandl, Pauling, 1962). Они указывали на повторяющиеся замены в одном и том же аминокислотном сайте (включая обратные мутации), воздействие естественного отбора и влияние размера популяции. Исходно их концепция включала важную роль естественного отбора, но позже они предположили, что "изменения, которые происходят с довольно регулярной общей скоростью, должны быть такими, которые относительно мало изменяют функциональные свойства молекулы" (Zuckerkandl, Pauling, 1965, р. 148). Эта цитата предвосхищает тесную связь гипотезы молекулярных часов Цукеркандля и Полинга с нейтральной теорией молекулярной эволюции Кимуры (Kimura, 1968, 1969), неотъемлемой частью которой они стали.

#### *Теория нейтральности молекулярной эволюции* (neutral theory of molecular evolution)

Мотоо Кимура и Томоко Ота объяснили постоянную скорость замен аминокислот в белках их нейтральностью в том смысле, что эти замены не влияют на приспособленность организма и, следовательно, не находятся под давлением отбоpa (Kimura, 1968; Kimura, Ohta, 1971). Предложенная модель отличалась от более ранних тем, что в прежних моделях (Fisher, 1936; Mayr, 1963) большинство замен предполагались благоприятными (попадают под положительный отбор), либо вредными (удаляются отбором). Важное следствие теории нейтральности состоит в том, что скорость, с которой нейтральные мутации фиксируются в популяции (substitution rate), примерно равна скорости. с которой мутации спонтанно возникают (Kimura, 1968). Решающий аргумент в пользу теории нейтральности – скорость несинонимичных (аминокислотных) замен в кодирующих последовательностях ниже, чем скорость синонимичных ("молчащих") замен, и скорость замещений в интронах и псевдогенах.

Развитием теории нейтральности молекулярной эволюции стала теория почти (эффективно) нейтральных мутаций (the nearly neutral theory of molecular evolution), разработанная Ота (Ohta, 1972а, 1973). Теория почти нейтральных мутаций предполагает, что часть нейтральных мутаций имеет небольшое влияние на приспособленность, являясь умеренно вредными или (реже) умеренно полезными. В малочисленной популяции, где отбор слаб по сравнению с дрейфом, такие мутации ведут себя практически как нейтральные (эффективно нейтральные). Таким образом, при низкой эффективной численности доля нейтральных мутаций относительно вредных оказывается выше и скорость эволюции увеличивается. Тем не менее это не противоречит постоянству скорости эволюции в единицу времени благодаря отрицательной корреляции между размером популяции и продолжительностью жизни поколения (Ohta, 1972b, 1974).

Концепция молекулярных часов вызвала резкую критику со стороны крупных биологов-эволюционистов своего времени (например, Stebbins, Lewontin, 1972; Easteal et al., 1995). Дальнейшее накопление эмпирических данных показало, что поведение молекулярных часов не соответствует в полной мере модели постоянной скорости – часы оказываются "небрежными" ("sloppy" clock), так как дисперсия числа генетических различий в конкретном временном периоде оказывается выше ожидаемой исходя из простого пуассоновского процесса (Gillespie, 1991). Теоретически на скорость молекулярной эволюции должны влиять скорость мутирования, соотношение сайтов различной селективной значимости и (в случае почти нейтральных мутаций) размер популяции (Ohta, 2002). Эти факторы различаются между видами, генами и временными периодами. Непостоянство часов есть следствие изменчивости скорости замен внутри одной линии и неравенства скоростей замен в разных линиях. Оба фактора порождают ошибки в молекулярных датировках (Bromham, Penny, 2003).

Таким образом, уже вскоре после появления концепции молекулярных часов стало ясно, что универсальных часов не существует. Все дальнейшее развитие методологии опиралось на допущение, что степень непостоянства скорости молекулярной эволюции можно измерить и учесть (Bromham, Penny, 2003). За последние два десятилетия было предпринято множество усилий по разработке методов работы с варьирующими скоростями, что привело к значительному прогрессу в методах молекулярного датирования.

# СКОРОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИИ

# Варьирование скорости молекулярной эволюции в зависимости от разных факторов

Скорость появления мутаций зависит от нескольких факторов и по современным представлениям определяется балансом между ожидаемым (в основном негативным) влиянием спонтанных мутаций на приспособленность с одной стороны и затратами на исправление ошибок репликации с другой (Lynch, 2010а). В рамках этой концепции скорость молекулярной эволюции не может быть меньше порога, определяемого эффективностью отбора в условиях той или иной величины дрейфа (drift-barrier hypothesis: Lynch. 2010b). Снижение скорости спонтанных мутаций организма может быть ограничено биохимическими и физиологическими затратами, связанными с улучшением точности репликации (Drake et al., 1998). Чтобы ограничить приток вредных мутаций, очищающий отбор может снижать частоту спонтанных мутаций за счет повышения точности репликации. Однако очищающий отбор подавляется генетическим дрейфом, если повышение приспособленности от дальнейшего снижения скорости спонтанных мутаций в диплоидном организме становится меньше, чем 1/2 Ne (где Ne – эффективная численность). Это объясняет тот факт, что виды с высокой Ne популяций (т.е. более эффективным отбором) обычно демонстрируют более низкую частоту спонтанных мутаций на поколение, чем виды с низкой Ne.

Скорость эволюции нуклеотидных и аминокислотных последовательностей меняется в зависимости от локуса, временного диапазона и конкретной филогенетической линии. Хорошо известно и многократно показано, что у многоклеточных животных частота мутаций в митохондриальном

геноме много выше, чем в ядерном (Brown et al., 1979; Wilson et al., 1985), например, у человека и мыши примерно в 40 раз (Fu et al., 2013; Hardouin, Tautz, 2013). Особенно велики эти различия для синонимичных замен (Pesole et al., 1992). У насекомых и паукообразных это различие между скоростью митохондриальной и ядерной эволюции значительно ниже, чем у позвоночных (Allio et al., 2017). Варьирование скорости в зависимости от локуса может быть связано с тем, в какой степени локусы находятся под давлением отбора, а также их различиями в скорости мутирования (Hodgkinson, Eyre-Walker, 2011). При анализе нуклеотидных последовательностей, как правило, принимается во внимание варьирование скоростей в трех позициях кодонов белок-кодирующих генов (Shapiro et al., 2006). Скорость мутаций может варыировать также в зависимости от конкретных нуклеотидов и их окружения, например, мутации в цитозин-гуаниновых динуклеотидах (CpG) происходят чаще, чем в других динуклеотидах, частично из-за склонности цитозина к дезаминированию (Bird, 1980). Скорость CpG  $\rightarrow$  TpG замен варьирует в широких пределах у разных видов, есть данные, что у человека эта скорость может быть в ~13-18 раз выше по сравнению с другим динуклеотидами (Nachman, Crowell, 2000; Kong et al., 2012). Известно, что частота мутаций повышена в тех частях генома, где присутствуют горячие точки рекомбинации (Duret, Arndt, 2008), что отчасти связано с увеличением доли цитозина и гуанина и количества СрG сайтов вследствие ассимметричной генной конверсии в процессе рекомбинации.

## Скорость молекулярной эволюции и эффект времени генерации (longevity effect)

В литературе упоминается два варианта скорости эволюции: (1) число замен на сайт в единицу времени и (2) число замен на сайт на поколение (Bromham, 2020; Pfeifer, 2020). Как обсуждалось выше, согласно теории нейтральности, эволюция в нейтральных сайтах происходит со скоростью мутаций и, в соответствии с гипотезой молекулярных часов, скорость мутаций должна быть одинакова в разных филетических линиях. Однако на самом деле скорость эволюции сильно различается между линиями. Уже в первых иммунологических работах по гемоглобинам приматов было показано, что линии с большей продолжительностью жизни поколения имеют меньшую скорость эволюции (Goodman, 1961, 1962). Реальность этой модели, известной как "эффект времени генерации", теперь подтверждена многочисленными исследованиями на разных животных (Allio et al., 2017), в том числе на птицах (Mooers, Harvey, 1994), беспозвоночных (Thomas et al., 2010), а также бактериях (Weller, Wu, 2015).

В настоящее время принято считать, что влияние продолжительности жизни поколения на скорость эволюции – наиболее очевидная причина различия скоростей молекулярной эволюции в разных линиях (Но, 2020). Однако исходные утверждения Кимуры (Кітига, 1969) противоречивы: с одной стороны, скорость эволюции белков у разных видов примерно одинакова, а с другой стороны, примерно одинаковы скорости мутирования белков в пересчете на поколение (а не на единицу времени), но продолжительность жизни поколения сильно отличается у разных животных. Сам Кимура сначала считал, что синонимичные замены происходят с постоянной скоростью в пересчете на год, что могло бы служить подтверждением теории нейтральности (Kimura, 1969). Но позже он признал, что нейтральная теория должна предсказывать постоянную скорость замещения не на год, а на поколение, так как скорость зависит от числа циклов репликации, и доказательство постоянства эволюционных изменений в единицу времени представляет собой "трудную проблему" в его теории (Kimura, 1983).

Для объяснения этого факта привлекалась теория почти (эффективно) нейтральных мутаций (Ohta, 1972a). Суть объяснения состояла в том, что виды с долгоживущими поколениями, как правило, имеют более низкую эффективную численность популяции (*Ne*) и, следовательно, для них выше доля условно нейтральных мутаций. Однако полностью адекватным это объяснение не является, реальная причина сложней и зависит от нескольких факторов.

Во-первых, молекулярная эволюция неравномерна и у животных с большим временем генерации скорость нуклеотидных замен меньше (например, Nabholz et al., 2008, 2013; Welch et al., 2008; Galtier et al., 2009), однако зависимость между скоростью эволюции и величиной, обратной времени генерации отнюдь не линейна. Время генерации отличается у человека и мыши примерно в 40–50 раз, а скорость эволюции менее чем в 10 раз (Bromham, 2011).

Во время работы Кимуры над книгой (Kimura, 1983) предполагалось, что мутации возникают прежде всего в момент репликации ДНК половых клеток или их предшественников (Haldane, 1947; Müller, 1954) и что число циклов деления в линии предшественников половых клеток примерно одинаково у организмов с различной длиной по-коления. Однако теперь ясно, что это допущение не верно; так, у человека в клетках-предшественниках сперматозоидов происходит в среднем 400 делений на поколение, а у самцов мыши — всего 62 деления (Bromham, 2011). Следовательно, строго обратной зависимости между временем генерации и скоростью эволюции, как ожидалось ранее, на самом деле быть не должно.

С другой стороны, если бы скорость репликации на единицу времени была постоянной, между временем генерации и скоростью эволюции вообще не было бы связи. На самом же деле число клеточных делений в единицу времени больше у короткоживущих видов, например, у мыши (самцы) более 100 делений в год, а у человека всего около 20 делений (Bromham, 2011). Отметим, что принимать во внимание число циклов деления и скорость мутаций нужно именно в сперматозоидах, а не в яйцеклетках. Кроме того, скорость спонтанных мутаций на одно деление у короткоживущих видов выше, чем у долгоживущих, например, у мыши этот показатель примерно в 3 раза выше, чем у человека (Milholland et al., 2017). Именно эти два фактора и определяют большую скорость мутирования у короткоживущих видов.

Есть и другой, осложняющий эту картину фактор: не все мутации вызываются ошибками репликации. Например, у многих организмов цитозин может химически модифицироваться путем метилирования (Suzuki, Bird, 2008). Основные мишени метилирования ДНК в геномах - это цитозины, за которыми следует гуанин ("СрG" мишени); по химическим причинам метилированные СрG сайты очень склонны к превращению в TpG сайты (Bird, 1980). Поскольку метилирование ДНК само по себе не зависит от репликации (например, Vandiver et al., 2015), на мутации, вызванные метилированием, продолжительность жизни поколения влиять не должна. Показано, что у разных видов приматов мутации в сайтах СрG происходят с одинаковой скоростью, в то время как скорости мутаций в других сайтах варыруют в зависимости от времени генерации (Kim et al., 2006; Moorjani et al., 2016). Итак, скорости эволюции в расчете на поколение и на единицу времени связаны между собой сложно и не линейно.

#### Причины вариабельности скоростей молекулярной эволюции

Одним из наиболее ярких примеров зависимости скорости мутирования ДНК от частоты репликации является феномен, который часто называют "male-driven evolution" или "male-biased mutation". Мужские гаметы обычно производятся в большем количестве, чем женские, и мужские гаметы обычно являются продуктом большего количества поколений клеток, чем женские гаметы того же вида. Таким образом, во многих таксонах последовательности ДНК, которые проводят больше времени у самцов, будут проходить больше репликаций в единицу времени, чем те, которые проводят больше времени у самок, и поэтому будут накапливать больше ошибок копирования. Это было отмечено у млекопитающих (более высокая частота мутаций в хромосоме Y, чем в X) и у птиц (более высокая частота мутаций в хромосоме Z, чем в хромосоме W) (Wilson Sayres, Makova, 2011). Таким образом, средняя частота мутаций для вида будет сильно зависеть от мутаций, происходящих у самцов во время производства гамет (Gao et al., 2016).

При использовании молекулярных часов наибольшее значение имеет варьирование скоростей в разных филогенетических линиях. Одним из возможных объяснений стойких видоспецифичных различий в скорости мутаций является то, что относительная "стоимость" мутации различается между видами. Если так, можно ожидать, что вклад в репарацию также будет различаться, и, следовательно, можно модулировать среднюю частоту мутаций (Bromham, 2002). Показано, что помимо эффективного размера популяции, со скоростью молекулярной эволюции могут быть тесно связаны размер генома, интенсивность метаболизма, размер тела, плодовитость и продолжительность жизни.

Размер генома. Ранее было высказано предположение, что число мутаций за поколение на геном — величина постоянная (эффект Дрейка; Drake et al., 1998), а частота мутирования обратно пропорциональна размеру генома. Позднее было показано, что это правило соблюдается для вирусов и бактерий, в то время как у многоклеточных зависимость противоположная, частота мутаций тем выше, чем больше размер генома (Pfeifer, 2020). Чтобы более тщательно оценить эту закономерность в филогенетических линиях необходимо включение в исследования более широкого набора видов.

Интенсивность метаболизма и размер тела. Обычно считается, что скорость эволюции непрямым образом, через время генерации и размеры тела, связана с интенсивностью метаболизма (например, Martin, Palumbi, 1993; Gillooly et al., 2005). Крупные животные и высокие растения обычно имеют относительно низкую скорость молекулярной эволюции (Martin, Palumbi, 1993; Bromham, 2002; Gillooly et al., 2005; Lanfear et al., 2013; Barrera-Redondo et al., 2018). Это может объясняться, например, тем, что более крупные животные имеют более низкий метаболизм. поэтому генерируют меньше свободных радикалов в единицу времени и потому их ДНК меньше повреждается. С другой стороны, более крупное животное имеет больше клеток и, следовательно, больше копий генома, каждая из которых подвержена мутированию. Риск опасной для жизни мутации должен увеличиваться с увеличением количества поколений клеток, необходимых для создания тела, и количества клеток, необходимых в течение репродуктивной жизни. Таким образом, вид с большим средним размером тела может потребовать больших вложений в контроль повреждений ДНК или точность репликации (Nunney, 1999).

Однако убедительных доказательств того, что скорость молекулярной эволюции объясняется, например, именно интенсивностью метаболизма, пока мало, если учесть ее связь и с другими чертами биологии организмов (Bromham et al., 1996; Lanfear et al., 2007; Galtier et al., 2009). Более того, влияние продолжительности жизни на молекулярную эволюцию было отмечено у таксонов, которые не проявляют признаков старения с возрастом (Hua et al., 2015). Возможно, уровень репарации ДНК регулируется до уровня риска, возникающего из-за клеточных метаболитов, и уравновешивается средней стоимостью мутации.

Продолжительность жизни. Показано, что скорость мутирования мтДНК у млекопитающих, птиц и рыб определенно связана с продолжительностью жизни, но этого нельзя с уверенностью утверждать про скорость эволюции ядерных генов (Nabholz et al., 2008; Welch et al., 2008; Galtier et al., 2009; Hua et al., 2015). Некоторые исследователи объясняют это наблюдение метаболическим повреждением ДНК. В результате аэробного метаболизма в митохондриях образуются свободные радикалы кислорода, которые могут повредить молекулы ДНК. Если удлинение жизни приводит к увеличению продолжительности и репродуктивной жизни, то риск мутации увеличивается (Bromham, 2020).

Плодовитость. Для млекопитающих известны исследования, указывающие на связь плодовитости как со скоростью синонимичных, так и несинонимичных замен (Welch et al., 2008), что может быть связано с большей эффективностью отбора при высокой численности потомства. В целом, определение конкретных особенностей биологии вида, влияющих на скорость молекулярной эволюции, — весьма сложная задача, так как все биологические факторы тесно скоррелированы.

#### Молекулярная эволюция и скорость диверсификации

С точки зрения Хо (Но, 2020), серьезные проблемы для использования методов молекулярного датирования могут создавать три формы изменения скорости нуклеотидных замен: взрыв генетических изменений при событиях видообразования (прерывистая эволюция); разная скорость эволюции в течение разных временных периодов (эффект эпох); снижение наблюдаемой скорости с течением времени (rate decay).

Теория прерывистого равновесия (punctuated equilibrium theory) была выдвинута в попытке объяснить пробелы в палеонтологической летописи, которые, по-видимому, характеризуются длительными периодами стагнации, сменяющи-

мися быстрыми всплесками морфологических изменений (Eldredge, Gould, 1972). Вдохновленные этой теорией, молекулярные эволюционисты искали доказательства прерывистой молекулярной эволюции (вспышек молекулярной изменчивости) в связи с эффектом основателя в событиях видообразования (Webster et al., 2003; Pagel et al., 2006). Теоретически доля генетических изменений должна коррелировать с числом событий видообразования в каждой ветви эволюционного древа. Однако простоте таких тестов препятствует проблема, известная как эффект плотности узлов (node-density effect), которая порождает паттерн, подобный ожидаемому при прерывистой молекулярной эволюции (Fitch, Beintema, 1990).

Возможные механизмы, связывающие видообразование со скоростью молекулярной эволюции, должны проявляться только в скорости несинонимичных замен (Bromham, 2020). К этим механизмам относятся отбор, влияющий на полезные замены, и ускорение эффективно нейтральных процессов при прохождении демографического кризиса. Тем не менее связь между скоростью диверсификации и скоростью молекулярной эволюции продемонстрирована и для синонимичных замещений (Lanfear et al., 2010; Duchêne, Bromham, 2013; Bromham et al., 2015). Одно из возможных объяснений связи скорости видообразования и скорости мутаций (в том числе и синонимичных) состоит в том, что уменьшение размера популяции может приводить к снижению эффективности репарации за счет частично вредных мутаций в генах, кодирующих ферменты, ответственные за репарацию и исправление ошибок (proofreading) в процессе репликации ДНК (Lynch et al., 2016). Однако корреляция межлу скоростью диверсификации и скоростью молекулярной эволюции может быть объяснена и без использования гипотезы прерывистой генетической эволюции если допустить, что повышенная скорость мутирования сама по себе, вне зависимости от ее причин, может быть предпосылкой для ускоренного видообразования (например, через увеличение скорости появления несовместимых замен в изолированных популяциях в рамках модели Добжанского-Меллера) (Hua, Bromham, 2017). Вторая гипотеза предпочтительнее, поскольку проще объясняет связь между видовым разнообразием и скоростью синонимичных замен.

# Обратная зависимость между оценкой скорости эволюции и временем (rate decay)

Среди перечисленных выше видимых форм изменения скорости эволюции наиболее распространенной является обратная зависимость между оценкой скорости эволюции и временем (rate decay). Этот феномен проявляется в отсутствии линейной связи между временем дивергенции и генетическим расстоянием, что вносит систематическую ошибку в оценку возраста дивергировавших групп. В результате скорости эволюции, измеряемые между видами (филогенетические) и в пределах вида (популяционные), оказываются различными. Эта проблема возникает, прежде всего, при работе с быстро эволюционирующей мтДНК, а сам феномен объясняется, как предполагалось, наличием горячих точек мутирования и условно нейтральных мутаций (Но et al., 2005, 2007; Henn et al., 2008). Влияние гаtе decay на медленно эволюционирующие сайты и локусы менее значительно.

На недавних временах оценки темпов эволюции могут быть завышены за счет включения вредных мутаций, которые, как правило, удаляются из популяции очищающим отбором в течение более длительных периодов времени (Но et al., 2011). Насыщение нуклеотидной последовательности (многократные замены в одном сайте), наоборот, вызывает недооценку количества генетических изменений на далеких эволюционных временах (Soubrier et al., 2012).

Поскольку скорость нуклеотидных замен для недавних событий значительно выше, чем для отдаленных, филогенетические скорости, полученные на основе древних калибровочных точек, могут оказаться непригодными для датирования внутривидовых межпопуляционных дивергенций. Следовательно, для надежной калибровки часов необходимо использовать не только отдаленные события дивергенции, но и относительно недавние, в том числе произошедшие в плейстоценеголоцене (<1-2 млн лет). Например, скорость формообразования для оценки возраста такого дихотомического события, как разделение Sorex araneus/S. granarius равна 13.6% за миллион лет, а для разделения S. daphaenodon и S. araneus – 8.6% (Bannikova et al., 2010b); для расчета времен дивергенции между географическими популяциями S. araneus s.str. использовали популяционную скорость нуклеотидных замещений  $2\mu = 21 - 37\%$ , в среднем 27.8% (Распопова и др., 2018; Raspopova et al., 2020).

Феномен гаte decay согласуется с разницей между высокой скоростью мутирования, оцениваемой по родословным (pedigree rate – сравнение родителей и потомков) и медленной филогенетической скоростью (сравнение видов) (Santos et al., 2005). Доказательства систематических ошибок, зависящих от времени дивергенций и связанных с перенесением времени популяционных дивергенций на филогенетические дивергенции и наоборот, получены для вирусов и бактерий (Aiewsakun, Katzourakis, 2016; Duchêne et al., 2016). Для ядерных геномов Metazoa такие данные ограничены, хотя показано, что частота спонтанных мутаций выше, чем скорость долгосрочной молекулярной эволюции, оцененная с помощью филогенетических методов (но современный человек — исключение из этого правила) (Scally, 2016; Chintalapati, Moorjani, 2020).

Феномен гаte decay получил подтверждение по результатам исследования палеоДНК (Но et al., 2007; Shapiro et al., 2011). Так, филогенетические скорости (мутирования) цитохрома *b* для серых полевок, оцениваемые по времени радиации рода, составляют около 10-11% (Ваппікоvа et al., 2010а). С другой стороны, скорости, полученные путем анализа гетерохронных сиквенсов (ископаемые голоценовые *Microtus arvalis*), значительно выше — 32.7% (Martínková et al., 2013). К этому близки скорости, рассчитанные на основе сценариев колонизации *M. agrestis* севера Европы (плейстоцен-голоценовая граница) — 45.7% (Herman et al., 2014).

#### Критика концепции rate decay

Концепция rate decay подвергалась активной критике (например, Emerson, Hickerson, 2015). Предполагалось, что увеличение оценок скорости отражает не реальный биологический феномен, а артефакт, связанный с недооценкой роли предкового полиморфизма (Emerson, 2007; Peterson, Masel, 2009; Tuffley et al., 2012), особенностей демографической истории и структурированности популяций (Navascues, Emerson, 2009). Было показано, что при использовании коротких последовательностей и недавних времен дивергенций (что часто бывает при использовании гетерохронных сиквенсов палеоДНК) оценки скорости могут быть завышены иногда в несколько раз (Debruyne, Poinar, 2009; Ho et al., 2011), т.е. смещенная оценка возникает именно вследствие низкой информативности данных. Кроме этого, эффективно нейтральные процессы вряд ли могут объяснить наблюдаемый масштаб rate decay, в силу нереалистичности требуемых для этого демографических сценариев (Woodhams, 2006).

Тем не менее вся вышеперечисленная критика скорее указывает на то, что феномен гаte decay обусловлен совокупностью разных причин, относительный вклад которых требует дополнительного изучения. Это не меняет того факта, что датировки, основанные на использовании прямолинейных подходов к анализу быстро мутирующих последовательностей ограниченной длины, часто оказываются существенно смещенными (Ho et al., 2015а). До сих пор недостаточно изучено значение ошибок в определении модели эволюции и распределения скоростей изменчивости сайтов (Soubrier et al., 2012). Так, не ясно в какой степени важен эффект присутствия в мтДНК горячих точек мутирования (Galtier et al., 2006), положение которых само по себе может достаточно быстро меняться.

Исходно предполагалось, что эффект rate decay проявляется на относительно недавних временах. Остается неясным, в какой степени это явление связано со сходным фактом зависимости оценок скоростей эволюции от времени дивергенции на временных шкалах эволюционного масштаба (Molak, Ho, 2015). Очевидно, что существующие модели эволюции не могут адекватно описать характер эволюции некодирующих последовательностей при высоком уровне ливергенции: по мере приближения к насыщению третьи позиции кодонов мтДНК будут все в большей степени недооценивать реальные уровни дивергенции. Отсутствие адекватных моделей для описания эволюции сайтов, находящихся под сильным очищающим отбором (1-е и 2-е позиции кодонов), вероятно, приводит к отсутствию линейной зависимости между степенью дивергенции по синонимичным и несинонимичным заменам на разных уровнях (рис. 1).

Возникает вопрос, каким способом использовать мтДНК для датировок? Вполне реалистично предположение, что уровень дивергенции по трансверсиям третьих положений кодона (tv3) мало подвержен влиянию rate decay (из-за медленного насыщения) и учитывая тот факт, что характер эволюции tv3 лучше соответствует строгим часам, чем в случае других типов замен (Irwin et al., 1991). Если в анализе используются данные по всем белок-кодирующим митохондриальным генам, рационально использовать трансверсии в четырехкратно вырожденных позициях, которые, в отличие от tv3, в целом демонстрируют большую выровненность скоростей в разных сайтах. Сравнение динамики дивергенции по разным группам замен может быть проведено с использованием нелинейной регрессии (например, Cosson et al., 2005; Bannikova et al., 2010a, b).

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЧАСЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДАТИРОВОК

#### Методы молекулярного датирования современный этап

Датирование событий дивергенции методом молекулярных часов, или просто "молекулярное датирование" подразумевает оценку времени расхождения филетических линий на основе анализа молекулярно-генетических данных. В настоящее время использование молекулярных часов для датирования эволюционных событий довольно быстро и значительно прогрессирует в связи с ростом вычислительной мощности филогенетических методов (Bromham, Penny, 2003; Kumar, 2005). Примечательно, что прогресс в использо-



**Рис. 1.** Соотношение уровней дивергенции митохондриального генома Soricinae по разным типам замен. a - по оси абсцисс отложены глубины узлов филогенетического дерева ML, модель CF +  $\Gamma$  ( $\Gamma = 0.43$ ; PAUP v. 4.0b10); по оси ординат – все замены 3-го положения, модель GTR +  $\Gamma$ .  $\delta$  – по оси абсцисс – то же, что на графике a, по оси ординат все замены 1-го и 2-го положения, модель GTR + I +  $\Gamma$ . В обоих случаях регрессия достоверно не линейная (Statistica v. 8.0, Nonlinear estimation).

вании методов молекулярного датирования во многом связан с усложнением моделей эволюции, что отличает современные исследования от их более раннего этапа и является магистральным направлением современной филогенетики. Исследования в этой области привели к разработке новых методов расчета времен дивергенции таксонов (Heath, Moore, 2014; Ho, Duchêne, 2014; Kumar, Hedges, 2016). Прежде всего, к ним относятся методы, позволяющие справиться с вариациями скорости эволюции не только между генами, но и между линиями, т.е. методы нестрогих часов (Hasegawa et al., 1989; Sanderson, 1997, 2002; Thorne et al., 1998).

Другой фактор — увеличение объема доступных для анализа данных, что в сочетании с адекватными моделями эволюции нуклеотидных последовательностей приводит к уменьшению доверительных интервалов и, следовательно, к более точным оценкам возраста узлов ветвления и скоростей эволюции (Tajima, 1993; Bromham et al., 2000; Kumar, 2005; Reis et al., 2015). Наконец, важную роль играет развитие разнообразных подходов к использованию калибровочной информации — более полное использование постоянно и быстро растущего объема палеонтологических данных (Kumar, 2005; Reis et al., 2015).

#### Основные принципы получения молекулярных датировок

Основные этапы процедуры получения молекулярных датировок представлены на схеме (рис. 2) и состоят в следующем: (1) разбиение данных на партиции и получение филогенетического древа по выбранным генам, (2) проверка часов: тест на равенство скоростей, (3) подбор модели часов для каждой партиции (гена или группы генов), (4) в случае обращения к свободным часам (Relaxed clock), выбор скоррелированных или нескоррелированных часов, (5) калибровка часов, (6) получение относительных и абсолютных времен, построение хронограммы. Рассмотрим более подробно наиболее сложные из этих этапов и обсудим возможные ошибки.

Процедуре датирования предшествует выбор и секвенирование генов, на основе которых будет проводиться датирование. Эти локусы должны быть достаточно информативны, но не насыщены. Например, мтДНК на высоких уровнях дивергенции часто дает смещенные оценки времен (Phillips et al., 2009; Brandley et al., 2011; Bannikova et al., 2014; Dornburg et al., 2014). Поэтому при уровне сходства митохондриальных последовательностей менее 85% мы не рекомендуем использовать мтДНК из-за очевидного сильного насыщения, которое не компенсируется существующими моделями эволюции.

После подбора моделей эволюции генов по имеющемуся набору данных строится филогенетическое древо. Хотя ряд методов (см. ниже) позволяет одновременно получить топологию и оценить времена дивергенций, но лучше сначала получить оценку топологии, независящую от допущений о характере изменения скорости эволюции. Важно выбрать правильную модель эволюции, а после этого правильно разбить набор данных на партиции (т.е. выделить группы последовательностей со сходным характером эволюции).

Далее проводят проверку молекулярных часов. Исходная гипотеза предполагает, что скорости молекулярной эволюции постоянны для всех филетических линий и во времени (модель строгих часов). Если это так, то все ветви филогенетиче-



Рис. 2. Схема получения молекулярных датировок.

ского древа можно охарактеризовать с помощью единой оценки. Для проверки соблюдения часов проводится тест относительных скоростей (Relative Rate Test, RRT; Wu, Li, 1985; Tajima, 1993) или тест отношения правдоподобия (Likelihood Relative Test, LRT; Felsenstein, 1981). Тест относительных скоростей Таджимы применим для сравнения двух конкретных групп и в настоящее время в значительной степени вытеснен методами, позволяющими проверять гетерогенность скоростей между линиями по всему филогенетическому древу, такими как LRT.

Перечисленные выше тесты равенства скоростей на древе ориентированы только на очень длинные последовательности, а в случае недостаточной длины выравнивания и/или генов с низкой изменчивостью, их использование может привести к недооценке варьирования скоростей и ошибке в определении датировок (Bromham et al., 2000). В рамках байесовского подхода проверку соответствия строгим часам можно проводить путем вычисления Байес-факторов, однако этот метод требует существенных временных затрат.

В простейшем случае, если постоянство скорости не отвергается, то не составляет труда вычислить время дивергенции таксонов по формуле  $T_{ij} = d_{ij}/2r$ , где d — ожидаемое число замещений (генетические дистанции). Для этого надо по палеонтологическим (или биогеографическим) данным определить время дивергенции хотя бы для одной пары таксонов ( $T_0$ ) и на основании это-

го получить оценку скорости  $r = d_0/2T_0$ . После этого можно вычислить оценки времен для остальных дивергенций. Используя эти простейшие формулы или равнозначную  $T_{ij} = T_0 d_{ij}/d_0$ , следует помнить, что получаемое отношение – это смещенная (завышенная) оценка, причем размер смещения тем больше, чем больше относительная ошибка (коэффициент вариации) для  $d_0$  (Nei et al., 2001; Rodríguez-Trelles et al., 2002). Поэтому, калибруя часы на основании последовательности с малым числом замен, мы рискуем получить завышенные оценки времен.

Если используются отдельные гены (или конкатенированные последовательности), то оценивается время дивергенции аллелей, а не таксонов, поэтому необходимо сделать поправку на предковый полиморфизм. Если датирование производится по конкатенированной последовательности, то временам узлов на древе соответствуют средние времена расхождения аллелей, а не собственно таксонов. В отсутствие гибридизации эти времена дивергенции аллелей старше, чем времена дивергенции таксонов. Этот фактор важно учитывать при анализе дивергенции близких видов.

Модели строгих часов. Эти модели обычно подходят для неглубоких филогений близкородственных видов и популяций в составе одного вида, где варьирование скорости молекулярной эволюции небольшое (Brown, Yang, 2011), например, если разница между последовательностями составляет менее 5% (Zhu, 2020). Но это предположение мало реалистично при сравнении далеких видов (Langley, Fitch, 1974; Yoder, Yang, 2000; Hasegawa et al., 2003). Тем не менее, если строгие часы выполняются, лучше использовать их, чем методы, допускающие варьирование скоростей, так как ошибка датировки в этом случае будет меньше (Brown, Yang, 2011).

Что делать, если модель строгих часов отвергнута? Если какой-либо таксон сильно отклоняется от остальных по скорости эволюции, простейший выход из положения - это исключить его из анализа (Takezaki et al., 1995; Hedges, Kumar, 2003). Наконец, для учета неоднородности скоростей (молекулярной эволюции) на филогенетическом древе предлагаются различные модели молекулярных часов. Эти модели примерно соответствуют двум типам: те, которые допускают всего несколько изменений скорости эволюции последовательностей, но различия между ними существенные, и те, которые предполагают множество разных скоростей, относительно мало отличающихся друг от друга (Welch, Bromham, 2005). В первом случае молекулярных скоростей обычно намного меньше, чем ветвей на древе.

Локальные часы. Методика, заключающаяся в использовании небольшого числа разных скоростей эволюции для разных участков древа, получила название "локальных часов" (Local Clock) и включает разнообразные алгоритмы многоскоростных часов ("multi-rate" clocks) (обзоры: Киmar, 2005; Welch, Bromham, 2005; Ho, Duchêne, 2014; Bromham et al., 2018). В таких моделях важной задачей является определение количества скоростей эволюции и участков на древе, к которым относятся эти скорости. Для этого в рамках метода максимального правдоподобия используются множественные тесты RRT и LRT. Эта процедура не всегда приводит к однозначным результатам (Bromham et al., 1998). Если участков дерева с разными "локальными часами" оказывается слишком много, метод становится неприменимым (Rannala, 2002; Felsenstein, 2004).

Тем не менее оказалось возможным успешно реализовать метод локальных часов в рамках байесовской статистики, где используются методы случайных локальных часов (random local clock, RLC; Drummond, Suchard, 2010, пакет BEAST) и процесс Дирихле (Dirichlet process prior, DPP-R; Heath et al., 2012, программа DPPDiv). Здесь результат соответствует не единственному оптимальному набору скоростей для ветвей, а апостериорному распределению числа локальных часов, их скоростей и положения событий смен одних часов другими на древе.

Свободные часы. Строгие часы для всего древа и независимые скорости для каждой ветви древа это две крайности, которые в реальном эволюционном процессе маловероятны. Более вероятно, что варьирование скорости молекулярной эволюции ограничено какой-либо закономерностью, например, скорости в линиях предков—потомков более сходны, чем в отдаленных ветвях (Gillespie, 1991). Поэтому более эффективный по сравнению с локальными часами подход состоит в том, чтобы моделировать изменение скорости на филогенетическом древе (Sanderson, 1997; Huelsenbeck et al., 2000; Kishino et al., 2001).

В настоящее время широко используется модель "свободных" часов (Relaxed clock; Drummond et al., 2006). Этот метод датировок допускает варьирование скорости эволюции для каждого гена общей последовательности и каждой ветви филогенетического древа. Применение этого метода особенно эффективно при использовании нескольких калибровок, так как при этом лучше оценивается изменение скорости между ветвями древа (Thorne et al., 1998; Sanderson, 2003). Выбор модели скорости – очень важный шаг перед тем, как приступить к оценке времен дивергенций. Две основные модели свободных часов – это часы автокорреляцией скоростей (autocorrelated с branch-rate, ABR) и часы без корреляции, т.е. с независимыми скоростями (independent branchrate, IBR) (Thorne et al., 1998; Kishino et al., 2001; Drummond et al., 2006; Lepage et al., 2006; Rannala, Yang, 2007; Ho, 2009; Ho, Duchêne, 2014).

В первом случае ожидается, что скорости в соседних ветвях древа относительно сходны; во втором – скорости всех ветвей древа распределены единообразно (экспоненциально, логнормально и т.д.), но корреляции скоростей в соседних ветвях нет. В обоих случаях моделируются либо средние скорости на ветвь, либо скорости в узлах древа. Наиболее принятый вариант модели с автокорреляцией (Thorne et al., 1998) эквивалентен модели геометрического броуновского движения, при этом логарифм скорости в узле-потомке  $R_1$  распределен нормально с математическим ожиданием log ( $R_0$ ) и дисперсией  $\sigma^2 \times t$ , где  $R_0$  – скорость в предковом узле, t – протяженность временного интервала между узлами 0 и 1, а  $\sigma^2$  – константа, отражающая относительную скорость изменения скорости.

Первой модели соответствует относительно медленная, но не ограниченная никакими пределами, эволюция скорости изменений в нуклеотидной последовательности. Этот принцип подходит для изучения близкородственных видов (Но, 2009). Нереалистичность этой модели – в отсутствии стационарного распределения, что приводит к тому, что скорость может достигать очень больших значений.

В модели нескоррелированных часов частоты выбираются из статистического распределения и не зависят от значений на соседних ветвях (Drummond et al., 2006; Rannala, Yang, 2007). Эта модель осмысленна, когда скорости нуклеотидных замен меняются относительно быстро, но имеют ограничения и/или варьируют вокруг некого оптимума. Нереалистичность этой модели заключается в том, что даже в соседних коротких ветвях скорость может быть столь же разной, что и в дальних. Отмечается также зависимость результата от числа таксонов в анализе (Guindon, 2020).

В качестве более реалистичных моделей предлагалось использовать процессы Орнштейна-Уленбека (Aris-Brosou, Yang, 2002; Reis et al., 2016) и Кокса–Ингерсолла–Росса (Lepage et al., 2006), которые с одной стороны предполагают существование значительной стохастической компоненты в эволюции скорости нуклеотидных замен, а с другой – существование некой "оптимальной" скорости, которая является математическим ожиданием стационарного распределения. Очевидно, что при небольших временах процесс будет сходен с автокорреляционной моделью, а при больших – с моделью независимых скоростей. Недавно была предложена еще одна, пока мало исследованная, модель нестрогих часов, согласно которой вариации скорости связаны исключительно с резкими ускорениями в момент диверсификации, что представляет собой эволюцию по типу прерывистого равновесия (Manceau et al., 2020).

Выбор модели и представляет собой сложную задачу, и заметно влияет на результат. Выбор можно осуществлять с помощью Байес-факторов (Bayesi factor, BF), но чувствительность этого метода невысока (Ho et al., 2015а). Тем не менее результаты тестов чаще согласуются с представлением, что доминирующим паттерном в молекулярной филогенетике различных групп видов является автокорреляция скоростей ветвлений (например, Tao et al., 2019).

Определение партиций для генов со сходными моделями часов. Предполагается, что существуют группы локусов, в пределах которых скорости эволюции изменяются сходным образом, и поэтому к ним применимы одни и те же модели нестрогих часов. Показано, что схема разбиения данных на партиции может сильно влиять на оценки времен (Angelis et al., 2018). Если один и тот же набор данных будет адекватно разделен на большее количество партиций, оценки времени станут более точными (Zhu, 2020). Чтобы избежать больших затрат на вычисления (через BF) можно использовать, например, алгоритмы для разделения на партиции, применяемые в ML (Maximum Likelihood) анализе: Partitionfinder (Lanfear et al., 2017), Modelfinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Другой (более быстрый и менее строгий) вариант — алгоритмы на основе кластеризации длин ветвей генных деревьев – ClockstaR и сходные методы (Duchêne et al., 2014, 2016).

# Использование байесовских подходов для получения молекулярных датировок

Методы байесовской статистики впервые были введены в обиход филогенетики в 1990-х годах и быстро набрали популярность. Они используются в филогенетике и филогеографии для определения видовых границ, измерения популяционных параметров (потока генов между видами) и оценки времени дивергенции.

Основная цель байесовской филогенетики оценить распределение тех эволюционных параметров, при которых с высокой вероятностью генерируется исследуемый набор данных. В число представляющих интерес параметров могут входить топология древа, а также глубины узлов, которым соответствуют времена дивергенции. Основное достоинство байесовских методов - возможность эффективной работы со сложными моделями с большим количеством параметров возможность гибко учитывать исходную неопределенность в значении параметров, например, калибровочную информацию в форме априорного распределения. Как результат, на выходе мы получаем апостериорную оценку параметров с учетом его разброса (в форме интервала области высокой плотности апостериорного распределения вероятности – high posterior density, HPD) (Drummond et al., 2006; Yang, Rannala, 2006; Ronquist et al., 2012).

Две основные модели свободных часов реализованы в пакетах, использующих алгоритмы: MCMCTree (Brown, Yang, 2011) и BEAST (Drummond et al., 2012). Априорные распределения задаются для калибровочных данных (см. ниже), параметров моделей эволюции последовательностей (возможно для нескольких партиций), параметров модели эволюции скорости (могут быть разными для разных генов), а также для формы древа (например, модели Юла, birth-death, либо модели коалесценции в стабильной или растущей популяции). Необходимость введения априорного распределения для формы древа – сложный момент в байесовском анализе, так как это может влиять на результат (Ritchie et al., 2017), а объективное обоснование выбора с помощью Байесфакторов требует значительного компьютерного времени. В более простом случае подразумевается, что топология древа едина для всех генов.

Роль анцестрального полиморфизма и метод видового древа. Получать молекулярные оценки времени дивергенции часто удобно на основе не комбинированной последовательности генов, а так называемого видового древа (species tree). Каждый ген может иметь свою собственную историю, а время дивергенции аллелей, как правило, старше времени дивергенции таксонов. Метод видового древа позволяет решить эти две проблемы путем включения в модель оценок полиморфизма для всех внутренних узлов (multispecies coalescent model), что дает более реалистичные оценки времен, но за счет возрастания временных затрат на вычисления (Species tree dating; Heled, Drummond, 2010). Однако анализировать этим методом большие мультигенные наборы данных, в том числе и геномные, невозможно (Ogilvie et al., 2016).

# Датирование филогеномных данных байесовскими методами

В последние два десятилетия вследствие развития высокопроизводительного секвенирования наблюдается стремительное накопление геномных данных. Это способствует углублению понимания эволюции на геномном уровне, но одновременно создает новые проблемы для получения молекулярных датировок из-за серьезных вычислительных проблем (Ho, 2014; Tong et al., 2016).

Тем не менее, несмотря на временные затраты, ведущим методом в филогеномном датировании остается байесовский подход (Reis et al., 2012, 2018; Springer et al., 2012; Jarvis et al., 2014; Zheng, Wiens, 2016). Значительные затраты компьютерного времени при использовании этого статистического подхода связаны с тем, что апостериорное распределение большого числа параметров генерируется с помощью метода Монте-Карло с марковскими цепями (MCMC) (Bromham et al., 2018). Повышение эффективности алгоритмов МСМС таким образом, чтобы они могли обрабатывать наборы данных в масштабе геномов, в настоящее время становится основной обсуждаемой методической темой в филогенетических исследованиях.

Например, теоретически получить топологию и времена дивергенций одновременно возможно (Drummond et al., 2006), но непрактично для очень больших филогеномных данных, потому что вычисления требуют слишком много времени и огромных вычислительных мощностей. Поэтому принято прибегать к упрощению модели, фиксируя топологию, или вводить ограничения на монофилию группировок (Drummond et al., 2006; Yang, Rannala, 2006). Наиболее важная стратегия ускорения вычислений в процессе молекулярного латирования по геномным данным — это, вероятно, использование аппроксимации правдоподобия (approximate-likelihood), что обеспечивает ускорение в 1000 раз и позволяет получить приближенную байесовскую оценку времен дивергенций по филогеномным данным (Alvarez-Carretero, Reis, 2020).

#### Датирование не байесовскими методами

Многие методы не байесовской статистики, использующие нестрогие часы, более приемлемы в отношении вычислительного времени и могут применяться к огромным массивам данных. Одним из широко используемых методов является метод на основе "оштрафованного правдоподобия" (penalized likelihood; Sanderson, 2002), реализованный в программах r8s (Sanderson, 2003) и treePL (Smith, O'Meara, 2012). На вход подается древо с длинами ветвей, полученными каким-либо методом, не предполагающим существование строгих часов. Алгоритм вычисляет набор скоростей нуклеотидных замен для ветвей и возрастов узлов таким образом, чтобы минимизировать величину penalized likelihood, которую образуют два слагаемых: первое из них соответствует правдоподобию длин ветвей (отклонение наблюдаемых длин ветвей от ожидаемых), второе минимизирует различия между эволюционными скоростями в ветвях предков и потомков (Sanderson, 1997, 2002), что соответствует модели автокорреляции скоростей (Thorne et al., 1998; Kishino et al., 2001). Например, с помощью программы r8s (Sanderson, 2003) при использовании 21 калибровочной точки из статьи Мередита с соавт. (Meredith et al., 2011), которые были заданы как максимальные и минимальные величины дивергенций, мы провели оценку времен дивергенции четырех ветвей Eulipotvphla по мультилокусным данным (433 гена, 235 тыс. п.о.) (Банникова, 2019).

Алгоритм RelTime, реализованный в программе MEGA-X, тоже сводит к минимуму различия между скоростью эволюции предков и потомков (Tamura et al., 2012, 2018). Скорость работы алгоритма велика благодаря дополнительным упрощениям — ошибки длин ветвей в расчет не принимаются. Существуют и другие совместимые с нестрогими часами алгоритмы, которые выигрывают в скорости за счет упрощения модели, что позволяет им работать с большими данными: датирование методом наименьших квадратов least-squares dating, LSD (To et al., 2016), treedater (Volz, Frost, 2017), TreeTime (Sagulenko et al., 2018), wLogDate (Mai, Mirarab, 2021).

# КАЛИБРОВКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЧАСОВ

Итак, идея молекулярных часов родилась из наблюдения того, что степень различия ДНК двух видов является функцией времени с момента их дивергенции. Это позволяет датировать эволюционные события и сильно упрощает процедуру восстановления генеалогических связей (Bromham, Penny, 2003). Однако молекулярные данные сами по себе способны предоставить информацию только об относительных временах. Для получения абсолютной шкалы времени молекулярные часы должны быть откалиброваны (Donoghue, Benton, 2007). Калибровка часов — это использование внешней информации для ограничения возраста узлов на филогенетическом древе. Эта необходимая, помимо топологии древа, информация включает данные о скоростях нуклеотидных замен по всему древу или оценку возраста хотя бы одного внутреннего узла. По существу, калибровка молекулярных часов — это определение их скорости и масштабирование филогенетического древа в соответствии с реальным временем.

Калибровка может применяться не только к конкретным узлам филогенетического древа, но и к демографическому событию. К важным популяшионным событиям относятся экспансия или сокращение эффективной численности. Изменения эффективной численности могут быть определены с помощью стандартных методов исследования демографической истории: построение скайлайнов — графического отображения динамики эффективной численности (skyline analysis; Hope et al., 2014); распределение числа замен нуклеотидов при попарном сравнении сиквенсов (mismatch distribution; Rogers, Harpending, 1992); сравнение различных демографических сценариев с использованием байесовского подхода (Bertorelle et al., 2010). В любом случае, так же, как и при датировании филогенетических событий, здесь необходимо учитывать неопределенность в сроках возникновения популяционного события.

#### Включение калибровок в анализ

Ранее в большинстве случаев калибровочная информация сводилась к фиксации возраста какого-либо узла на некотором определенном значении (точечная калибровка), что в настоящее время считается неоправданным упрощением (Nguven, Ho, 2020). В современном филогенетическом анализе, как правило, используются интервальные оценки датировок. В простейшем случае задается минимальная и максимальная граница интервала равномерного распределения, например, в таких методах, как penalized likelihood (Sanderson, 2002) и RelTime (Tamura et al., 2012). Более гибкий подход, реализованный в байесовских методах, позволяет использовать калибровочную информацию как априорное распределение возраста узлов, при этом функция распределения может быть любой (Ho, Phillips, 2009), главное, чтобы она отражала исходную неопределенность возраста дивергенции клад. Обычно используются логнормальное, экспоненциальное или гамма распределение. Распределение может быть жестко ограничено (жесткая граница снизу или и снизу, и сверху), или иметь мягкие границы (Yang, Rannala, 2006).

#### Палеонтологические калибровки

Задача калибровки молекулярных часов не решается в рамках одной молекулярной генетики. Калибровочные данные могут включать разную информацию (биогеографическую и палеогеографическую, молекулярные датировки, полученные из прежних исследований), но основной источник информации — это палеонтологические датировки ископаемых находок изучаемой таксономической группы (Hipsley, Müller, 2014).

Неправильная калибровка часов во многом связана с неопределенностью, происходящей со стороны палеонтологии. Источники серьезных ошибок включают неверное определение палеонтологического возраста и филогенетического положения фоссилий (Benton, Donoghue, 2007; Gandolfo et al., 2008). В некоторых группах использование палеонтологических датировок малоэффективно из-за бедности летописи или невозможности морфологической диагностики (Smith, Peterson, 2002). Нередко бывает сложно однозначно определить, какой именно узел на древе должен быть откалиброван с использованием данного ископаемого материала, потому что это зависит от того, относится ли материал к стволовой группе или к ветви потомков (Benton, Donoghue, 2007). Включение в анализ большого количества калибровочных точек повышает точность оценок времени (Lee, 1999; Lukoschek et al., 2012).

Если палеонтологический возраст и клада, к которой принадлежит фоссилия, известны, логично предположить, что возраст фоссилии ограничивает снизу время дивергенции содержащей ее клады от ближайшей сестринской группы (= минимальная нижняя граница). Остается еще один существенный источник неопределенности: не известно, сколько времени прошло между моментом обособления клады и возрастом самой ранней фоссилии, заведомо к ней принадлежащей (= время существования "линии-призрака", ghost lineage; Phillips, 2016; Springer et al., 2017). В свою очередь, время призрака включает два компонента – время от точки дивергенции до появления диагностических синапоморфий группы и интервал до первой обнаруженной фоссилии (рис. 3). Последняя величина зависит от вероятности фоссилизации с одной стороны и активности палеонтологов с другой (Gandolfo et al., 2008). Если возраст фоссилии известен с точностью до геологического диапазона, то приходится использовать его верхнюю (позднюю) границу в качестве минимального возраста узла, тогда разница между верхней границей диапазона и неизвестным истинным возрастом фоссилии оказывается третьим слагаемым оценки времени существования призрака.



**Рис. 3.** Использование палеонтологической калибровочной информации в качестве минимальной границы возраста узла. Красным кружком обозначен изучаемый узел дивергенции филогенетических линий A и B. Пунктирные линии разделяют геологические периоды. Вертикальная красная стрелка указывает на самые ранние находки, уверенно относимые к линии A. Синий крестик показывает время появления морфологических синапоморфий в линии A. Другие значки обозначают: † – ископаемые остатки, безусловно относящиеся к линии A; ‡ – ископаемые остатки, безусловно относящиеся к линии B; + – ископаемые остатки, имеющие плезиоморфную морфологию, соответствующие предку таксонов A и B.

Очевидно, что минимальных ограничений для датировки недостаточно, необходимо включить как минимум хотя бы одно максимальное ограничение. Однако максимальные возрастные ограничения установить трудно, потому что они эквивалентны постулированию отсутствия определенной клады в какой-то момент прошлого. Выбор максимальных возрастных ограничений оказывает значительное влияние на получаемые молекулярные датировки (Hug, Roger, 2007; Warnock et al., 2015). В качестве примера можно привести недавнюю дискуссию вокруг временной шкалы эволюции современных птиц (Jarvis et al., 2014; Cracraft et al., 2015; Mitchell et al., 2015). Часто максимальные границы выбираются наиболее консервативным образом (т.е. избыточно древними) (Ho, Phillips, 2009), что может приводить к смещенным и неточным оценкам времен. Очевидно, что максимальные ограничения правильней задавать в виде мягких границ (Yang, Rannala, 2006), например, границы 95%-го доверительного интервала.

Для того чтобы объективно оценить доверительный интервал возраста узла исходя из времен находок фоссилий, был предложен метод стратиграфического брэкетинга (Marshall, 2008), использовавший распределение относительных возрастов самых ранних фоссилий для нескольких (многих) клад древа. Метод исходно опирался на не всегда реалистичные допущения о распределении находок на временной шкале, однако в дальнейшем были предложены его модификации, в которых применялись более сложные модели (Marshall, 2010).

Также были предложены менее формализованные методы определения максимальных границ, такие как филогенетический брэкетинг и стратиграфический баундинг (Benton, Donoghue, 2007; Meredith et al., 2011). В последнем методе в качестве верхней границы возраста узла используется нижняя (ранняя) граница геологического интервала (или двух интервалов), предшествующего тому, в котором был найден самый древний ископаемый материал. В филогенетическом брэкетинге возрастной диапазон узла ограничен возрастом его соседних узлов (т.е. таких, которые являются непосредственными предками и потомками), что может основываться на палеонтологической летописи или на независимой молекулярной оценке. Например, получение молекулярных датировок для ежовых содержит определенные трудности из-за нередкой двусмысленной интерпретации ископаемых остатков этой группы (Rich, 1981), что объясняется генерализованным строением зубной системы - основного материала палеонтологических исследований. По этой причине при подборе калибровочных точек для датирования дивергенций в сем. Erinaceidae (Bannikova et al., 2014) самая древняя калибровочная точка, связанная с олигоцен-эоценовым периодом (28-49 млн лет) радиации базальных линий современных ежовых была взята из работы Мередита с соавт. (Meredith et al., 2011). Максимальная граница для этой калибровочной точки определяется через стратиграфический ограничитель и филогенетический брэкетинг и должна приниматься с осторожностью. Согласно Лопатину (Lopatin, 2006), раннеэоценовые ископаемые ежовые относятся к примитивным гимнурам; по этой причине предпочтение отдавалось накладыванию меньших ограничений на время разделения Еrinaceinae/Hylomyinae и отнесению верхнего предела этого события к границе палеоцена/эоцена.

В качестве внутренних калибровочных точек использовали: 1) время разделения Hylomys s.str. и *Neotetracus* (16 млн лет – минимальная граница) на основании ископаемых остатков из раннего миоцена Таиланда, относимых к этим таксонам (Mein, Ginsburg, 1997); 2) ожидаемое время базальной радиации кроновых Erinaceinae в MN13 (5.5 млн лет как минимальная граница) на основании ископаемых остатков, определенных как Erinaceus (Storch, Qiu, 1991; Qiu, Storch, 2005). Однако следует признать, что эти калибровочные точки являются вероятными, но не очевидными. Отнесение события разделения Neotetracus и Hylo*туѕ* ко времени не позднее 16 млн лет назад вызывает вопросы, учитывая трудности определения этих гимнур не только по ископаемым остаткам, но и по рецентному морфологическому материалу (Frost et al., 1991; Gould, 1995). Также нет уверенности в существовании хороших признаков, позволяющих отличать поздне-миоценовых Erinaceus от других родов ежей. Некоторые авторы вообще избегают обсуждать принадлежность ископаемых остатков ежовых к тому или иному роду. Известно, что, когда такие попытки предпринимались, возникала глубокая и трудно разрешимая путаница, как, например, в случае миоценового p. Mioechinus (Depéret, 1887; Butler, 1948; Rich, 1981; Gould, 1995; Mein, Ginsburg, 2002).

Что касается стратиграфического баундинга, этот прием был применен нами при датировании дивергенций землероек: в р. *Sorex*, где молекулярные часы были откалиброваны по пяти палеонтологическим датировкам (Bannikova et al., 2018), а также в р. *Crocidura* (Bannikova et al., 2021).

#### Вторичная калибровочная информация

В настоящее время во многих исследованиях для калибровки часов используются уже опубликованные ранее молекулярные датировки. Их называют вторичными калибровками, поскольку они основаны не на прямых палеонтологических или биогеографических данных, а на полученных ранее временах дивергенций. Очевидно, что в некоторых ситуациях с помощью вторичной калибровки из надежного источника могут быть получены более точные оценки времени, чем с помощью первичной калибровочной информации из ненадежных палеонтологических источников (Kumar, Hedges, 1998). Эта методика уязвима для критики (Hipsley, Müller, 2014), однако минимизировать ошибку можно путем конструирования априорных распределений, которые учитывают все источники ошибок оценки, основанной на вторичной калибровке.

Вторичные калибровки обычно используют для таксонов, по которым ограничена палеонтологическая информация, например, бактерии или грибы, а также для увеличения числа калибровочных точек при датировании многовидовых филогений (например, Reis et al., 2012, 2018). В наших исследованиях использовались вторичные калибровки в случаях, когда доступные данные задавали только минимальную границу, например, при определении времен дивергенций кротовых (Bannikova et al., 2015), кутор (Igea et al., 2015) и тушканчиков (Shenbrot et al., 2017).

## Калибровки, основанные на несовременных нуклеотидных последовательностях

Калибровка молекулярных часов с использованием гетерохронных данных полезна в исследованиях древней ДНК, а также для оценки темпов и временных масштабов эволюции видов с быстрой сменой поколений. Обретение опыта работы с ДНК ископаемых образцов открыло возможность использовать пробы от экземпляров, для которых имеются радиоуглеродные датировки. Однако ошибки радиоуглеродного датирования, возникающие в том числе из-за колебаний содержания <sup>14</sup>С в атмосфере (Reimer et al., 2013), представляют собой отдельный источник неопределенности возраста (Guilderson et al., 2005). Наконец. при работе с палеоДНК существует необходимость делать поправки на химическую модификацию последовательностей (Hofreiter et al., 2001). При небольшой длине палеосиквенсов оценки времен и скоростей могут быть смещены (см. раздел о занижении оценок скорости эволюции с течением времени).

Другая область, где продуктивно использование гетерохронных последовательностей для молекулярных датировок, — это филогения быстро эволюционирующих организмов, например, вирусов (в частности, у РНК вирусов скорость накопления замен может составлять 10<sup>-3</sup> на сайт в год (Duffy et al., 2008)). Важная практическая составляющая молекулярного датирования вирусных филогений — исследование историй эпидемий (например, Pekar et al., 2021).

Простейший способ оценить скорость и время, имея филогению для гетерохронных последовательностей, — использовать регрессию расстояния от корня древа до концов ветвей (root to tip distance) на время образцов, как это реализовано в программе TempEst (Rambaut et al., 2016). Предварительно необходимо проверить, достаточно ли информативны данные для этого анализа, что делается с помощью рандомизационного теста (Ramsden et al., 2009). Кроме этого, для гетерохронных данных активно используются методы ML (treedater; Volz, Frost, 2017) и байесовской статистики (BEAST; Heled, Drummond, 2010). Ситуация осложняется тем, что для описания эволюции вирусов часто требуется использование модели rate decay (Duchêne et al., 2014).

# Модель FBD и датирование на объединенных данных

Классический метод использования калибровок сводится к двухстадийному анализу: сначала, исходя из филогенетического положения и возраста фоссилий, оценивается возраст одного или нескольких узлов дерева (node-dating), затем, используя эту информацию, определяется возраст остальных узлов древа. Принципиально иной подход – датирование на объединенных данных (total evidence dating) – заключается в построении хронограммы путем одновременного анализа молекулярных и морфологических данных, причем последние включают информацию как для современных видов, так и для ископаемых таксонов с известным возрастом (Stadler, 2010; Heath et al., 2014; Gavryushkina, Zhu, 2020). Эта процедура реализована в нескольких программах, использующих байесовский подход (MrBayes, BEAST 2). Анализ основан на модели фоссилизации – рождения-смерти (Fossilized birth-death, FBD), описывающей одновременно структуру древа, вероятность захоронения и обнаружения фоссилий. Если филогенетическое положение вымерших видов известно хотя бы приблизительно, то возможно использовать вариант анализа без привлечения морфологических данных (Heath et al., 2014). Исходный вариант FBD модели предполагал, что процессы фоссилизации и диверсификации описываются одним и тем же набором параметров во всех частях древа. Более реалистична модель фоссилизации кладообразования (fossilized birth-death process skyline model, FBD; Stadler et al., 2013; Gavryushkina et al., 2014), которая постулирует существование нескольких эпох, каждая со своей динамикой этих процессов.

Сильная сторона датирования на объединенных данных — возможность использовать максимум палеонтологической информации, большая часть которой при классическом подходе оказалась бы вне анализа, в частности, из-за неопределенности филогенетического положения ископаемого материала. Модель FBD в разных ее вариантах требует дальнейшего изучения. Пока же нельзя исключить, что результаты будут чрезмерно чувствительны к исходным допущениям (Matzke, Wright, 2016; O'Reilly, Donoghue, 2020). Отдельная проблема — надежность результатов совместного анализа морфологических и молекулярных данных. Это связано с неадекватностью существующих моделей морфологической эволюции, высокой вероятностью филогенетических ошибок из-за адаптивных параллелизмов, что, например, скомпрометировало результаты О'Лири (O'Leary et al., 2013). Наконец, насыщенность модели параметрами требует больших вычислительных мощностей.

#### Биогеографические калибровки

На практике датирование по ископаемым материалам осложняется целым рядом теоретических и эмпирических проблем. Хорошую альтернативу палеонтологической информации составляют биогеографические данные. К первым публикациям в этой области относится работа по гавайским цветочницам, или медоносам (Нетіgnathus spp.), в которой для калибровки времени радиации этих птиц использовали возраст Гавайских островов (Fleischer et al., 1998). Некоторые особенности Гавайских островов делают их подходяшими для калибровки молекулярных часов. Считается, что они образовались вдоль "конвейерной ленты" и расположены последовательно по возрасту от самых старых (29.8 млн лет) островов на северо-западе до самых молодых (0.5 млн лет) на юго-востоке (Fleischer et al., 1998; Price, Clague, 2002).

Возраст островов может быть использован в качестве калибровки молекулярных часов, если соблюдается правило прогрессии (Hennig, 1966), согласно которому есть соответствие между возрастом островов и топологией филогенетического древа изучаемых таксонов. Например, в случае эндемичных гавайских цветочниц, дрозофил и бабочек самые молодые острова населяют виды, образующие внутренние ветви филогенетического древа, в то время как виды, распространенные на старых островах, располагаются на древе ближе к корню (Fleischer et al., 1998; Haines et al., 2014). Калибровка филогении по времени с помощью биогеографии и палеогеографии работает по принципу, что для данного палеогеографического контекста одни биогеографические сценарии более вероятны, чем альтернативные, и эта вероятность влияет на принимаемый в результате возраст изучаемых видов (Ho et al., 2015b; Baets et al., 2016).

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОЦЕНКА ВРЕМЕН ДИВЕРГЕНЦИИ ОТРЯДОВ ПЛАЦЕНТАРНЫХ КАК ПРИМЕР РАЗЛИЧИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ НА РАЗНЫХ ДАННЫХ

Использование разного числа и набора таксонов, большего или меньшего числа генных локусов, тех или иных моделей и калибровочных точек может приводить к сильному варьированию получаемых оценок времен дивергенции. Хорошим примером служат попытки определения времени появления отрядов Placentalia. Палеонтологические данные указывают на быструю радиацию плацентарных после массового вымирания на границе мела и палеогена (М/П) 65 млн лет назад (обзор: Archibald et al., 2001; Benton, Ayala, 2003). Более жесткая модель ("hard" explosive model) предполагает быструю радиацию единственной предковой ветви, перешагнувшей М/П границу (O'Leary et al., 2013). Альтернативная, более мягкая взрывная модель ("soft" explosive model) допускает позднемеловое происхождение нескольких наиболее древних ветвей плацентарных (Simpson, 1945; Archibald, Deutschman, 2001).

Молекулярные оценки этого события в целом значительно более древние и противоречат взрывной модели палеогенового происхождения плацентарных. Они подразумевают два варианта: 1) дивергенция отрядов и дальнейшая радиация внутри них относятся в подавляющем большинстве случаев к меловому периоду (модель ускоренной диверсификации, "короткий запал" ("short fuse"); Bininda-Emonds et al., 2007); 2) предки Placentalia и большинства отрядов сформировались в меловом периоде, но дальнейшая их диверсификация происходила в палеогене (модель замедленной диверсификации, "длинный запал" ("long fuse"); Reis et al., 2012).

Таким образом, хотя результаты разных молекулярных данных совпадают в вопросе о меловом происхождении плацентарных, согласованное представление о порядке возникновения отрядов относительно М/П границы отсутствует. Например, датировки Бининда-Эмондс с соавторами (Bininda-Emonds et al., 2007) показывают, что половина отрядов плацентарных произошла более 100 млн лет назад, т.е. намного раньше того времени, на которое указывают все известные ископаемые и некоторые молекулярные данные. Однако в этом исследовании должным образом не учитывались варьирование скоростей эволюции в разных линиях и неопределенности в оценке длин ветвей, и, кроме того, применялась точечная ископаемая калибровка для корня. Другие ранние молекулярные датировки (Kumar, Hedges, 1998) тоже искажены тем, что в них не принимались во внимание такие важные источники ошибок, как (1) степень близости ископаемых калибровок ко времени события дивергенции (Yang. Rannala, 2006), (2) случайный разброс (randomness) молекулярных скоростей (Thorne et al., 1998) и (3) разброс оценок длин ветвей (Rodríguez-Trelles et al., 2002). По сравнению с прежними исследованиями, в работе Мередита с соавт. (Meredith et al., 2011) с применением байесовских методов были получены относительно недавние времена диверсификации внутри отрядов млекопитающих. При этом времена для пяти отрядов плацентарных характеризовались очень широкими доверительными интервалами (от раннего мела до позднего палеоцена), что не позволяет уверенно утверждать, в меловом периоде или в палеоцене произошла основная диверсификация плацентарных. К столь широким доверительным интервалам времен дивергенций привел ограниченный объем генетических локусов (26 ядерных генов для 164 таксонов).

Рейс и соавторы (Reis et al., 2012) провели байесовский анализ 36 ядерных и 274 митохондриальных геномов (20.6 млн п.н.) (Yang, Rannala, 2006), используя датировку по палеонтологическим данным (по методу Бентона с соавт. (Benton et al., 2009)). В результате гипотеза базальных дивергенций внутри большинства отрядов плацентарных до М/П границы была отвергнута, но при этом полученные оценки предполагают возникновение стволовых групп плацентарных до М/П границы (модель "long fuse").

Филлипс (Phillips, 2016) получил датировки, допускающие возникновение Xenarthra, Afrotheria, Euarchontoglires и Laurasiatheria в меловом периоде, но большинство внутриотрядных дивергенций имело место в период после массового вымирания на М/П границе ("мягкая взрывная модель"). Филлипс предположил, что оценка скорости молекулярной эволюции может быть искажена такими биологическими факторами, как большие размеры тела и большая продолжительность жизни (что противоречит результатам Ромигера с соавторами (Romiguier et al., 2013)), и получил приближенные к традиционной мягкой взрывной модели датировки (более точные с его точки зрения), изымая такие таксоны из анализа времен дивергенций.

Однако Спрингер с соавт. (Springer et al., 2017) показали, что допущения, принятые Филлипсом, приводят к появлению на его древе так называемых "линий зомби" (zombie lineages) — артефакты, которые возникают, если полученные оценки времен моложе минимального возраста древнейших ископаемых остатков. Результаты Спрингера в отличие от результатов Филлипса лучше соответствуют модели "long fuse".

Итак, молекулярные данные дают разные оценки времени филогенетических событий (табл. 1), однако никакие из них не соответствуют жесткой взрывной модели. Анализ также показывает, что, помимо сигнала от собственно данных, допущения, принятые авторами, сильно влияют на оценки и выводы.

# БАННИКОВА, ЛЕБЕДЕВ

n	ſ	٦
4	Ľ	,

Таблица 1. Времена дивергенции и радиации современных групп Eulipotyphla по молекулярным данным, полу-
ченным нами (Bannikova et al., 2014, 2015; Банникова, 2019) и другими авторами (Douady et al., 2002; Douady, Dou-
zery, 2003; Springer et al., 2003, 2017; Roca et al., 2004; Meredith et al., 2011; Reis et al., 2012), а также по палеонтоло-
гическим данным (Lopatin, 2006)

Таксон или узел дивергенции	Наши данные	Другие молекулярные данные	Палеонтологические данные
Eulipotyphla	70—80 млн л. н.	70—85 млн л. н.	>70 млн л. н.
Solenodontidae	нет данных	~76 млн л. н.	нет данных
Erinaceidae	~66 млн л. н.	55—65 млн л. н.	61—63 млн л. н.
Hylomyinae/Erinaceinae	~52 млн л. н.	38 млн л. н.	~47 млн л. н.
Talpidae	~72 млн л. н.	60—70 млн л. н.	40 млн л. н.
Uropsilinae	43—52 млн л. н.	48—57 млн л. н.	35—37 млн л. н.
Soricidae	~66 млн л. н.	55—65 млн л. н.	45—47 млн л. н.
Soricinae/Crocidurinae	~38 млн л. н.	38 млн л. н.	18 млн л. н.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История молекулярной филогенетики и развития концепции молекулярных часов солержит немало примеров несовпадения молекулярных и палеонтологических времен дивергенции и ошибочных датировок, что связано, прежде всего, со следующими причинами. Во-первых, это ошибки определения длин ветвей (и глубин узлов ветвления) из-за низкой информативности данных или неточной модели. Влияние этих источников неопределенности можно уменьшить увеличением числа локусов и длины читаемых фрагментов, а также фильтрацией генов. для которых нет адекватной модели. Во-вторых, это ошибки в калибровочной информации как биологической, так и геологической природы. Роль их должна уменьшаться с ростом объема палеонтологических данных и повышением точности определения возраста ископаемых остатков. В-третьих, в случае нестрогих часов присутствует еще и трудно устранимая неопределенность, связанная с характером варьирования скоростей как между кладами, так и между генами (ее можно лишь отчасти уменьшить, увеличивая число анализируемых генов); здесь же следует упомянуть влияние rate decay (Ho et al., 2005, 2007).

Вторая и третья причины неопределенности в совокупности приводят к тому, что даже при увеличении объема данных до геномных, ошибка времен дивергенции снижается не до нуля, а только до некоторого предела (Reis, Yang, 2013; Zhu et al., 2015), делая точное определение молекулярных времен дивергенции невозможным. Кроме того, разные варианты молекулярного датирования могут давать существенно разные результаты даже когда они применяются к аналогичным и даже идентичным наборам данных (например, Reis et al., 2014; Foster et al., 2016). Такие несовпадения показывают, что выводы часто чувствительны к предположениям, исходно заложенным в выводах.

Помимо этого, большинство методов молекулярного датирования нацелены на учет изменения скорости молекулярной эволюции без моделирования механизмов или причин изменения скорости, которая может эволюционировать в зависимости от биологии вида. Известно только несколько методов, которые моделируют скорость молекулярной эволюции в соответствии с биологией вида (Lartillot, Delsuc, 2012; Nabholz et al., 2013). С другой стороны, необходимы дальнейшие усилия в создании сложных моделей эволюции нуклеотидных последовательностей, учитывающих специфику механизмов как возникновения повреждений ДНК (например, в случае СрG), так и репарации.

Полемика по поводу молекулярных часов не умаляет их практического преимущества в изучении филогенеза, а также недавних событий популяционного уровня. Стремительное развитие геномного секвенирования способствует познанию закономерностей изменчивости скорости молекулярной эволюции, что в дальнейшем, безусловно, ликвидирует брешь в нашем понимании сопряженной эволюции видов и их геномов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-14-50062.

# КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

# СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банникова А.А., 2019. Молекулярная эволюция и проблемы филогенетической реконструкции истинных насекомоядных (Mammalia: Eulipotyphla). Дис. ... док. биол. наук. М.: МГУ. 697 с.
- Распопова А.А., Банникова А.А., Лебедев В.С., 2018. Филогеография и историческая демография обыкновенной бурозубки // Генетика. Т. 54. № 12. С. 1426–1441.
- Aiewsakun P., Katzourakis A., 2016. Time-dependent rate phenomenon in viruses // J. Virol. V. 90. № 16. P. 7184–7195.
- Allio R., Donega S., Galtier N., Nabholz B., 2017. Large variation in the ratio of mitochondrial to nuclear mutation rate across animals: Implications for genetic diversity and the use of mitochondrial DNA as a molecular marker // Mol. Biol. Evol. V. 34. № 11. P. 2762–2772.
- *Álvarez-Carretero S., Reis M., dos,* 2020. Bayesian Phylogenomic Dating // The Molecular Evolutionary Clock. Cham: Springer. P. 221–249.
- Angelis K., Álvarez-Carretero S., Reis M., dos, Yang Z., 2018. An evaluation of different partitioning strategies for Bayesian estimation of species divergence times // Syst. Biol. V. 67. № 1. P. 61–77.
- Arbogast B.S., Edwards S.V., Wakeley J., Beerli P., Slowinski J.B., 2002. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales // Annu. Rev. Ecol. Syst. V. 33. № 1. P. 707–740.
- Archibald J.D., Deutschman D.H., 2001. Quantitative analysis of the timing of the origin and diversification of extant placental orders // J. Mamm. Evol. V. 8. № 2. P. 107–124.
- Archibald J.D., Averianov A.O., Ekdale E.G., 2001. Late Cretaceous relatives of rabbits, rodents, and other extant eutherian mammals // Nature. V. 414. № 6859. P. 62–65.
- Aris-Brosou S., Yang Z., 2002. Effects of models of rate evolution on estimation of divergence dates with special reference to the metazoan 18S ribosomal RNA phylogeny // Syst. Biol. V. 51. № 5. P. 703–714.
- Baets K., de, Antonelli A., Donoghue P.C.J., 2016. Tectonic blocks and molecular clocks // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. V. 371. № 1699. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0098
- Bannikova A.A., Lebedev V.S., Abramov A.V., Rozhnov V.V., 2014. Contrasting evolutionary history of hedgehogs and gymnures (Mammalia: Erinaceomorpha) as inferred from a multigene study // Biol. J. Linn. Soc. V. 112. P. 499–519.
- Bannikova A.A., Zemlemerova E.D., Lebedev V.S., Lavrenchenko L.A., 2021. The phylogenetic relationships within the Eastern Afromontane clade of Crocidura based on mitochondrial and nuclear data // Mamm. Biol. V. 101. P. 1005–1018. https://doi.org/10.1007/s42991-021-00120-7

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ том 83 № 1 2022

- Bannikova A.A., Lebedev V.S., Lissovsky A.A., Matrosova V., Abramson N.I. et al., 2010a. Molecular phylogeny and evolution of the Asian lineage of vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial cytb sequence // Biol. J. Linn. Soc. V. 99. № 3. P. 595–613.
- Bannikova A.A., Dokuchaev E.N., Yudina E.V., Bobretzov A.V., Sheftel B.I., Lebedev V.S., 2010b. Holarctic phylogeography of the tundra shrew (*Sorex tundrensis*) based on mitochondrial genes // Biol. J. Linn. Soc. V. 101. № 3. P. 721–746.
- Bannikova A.A., Zemlemerova E.D., Colangelo P., Sözen M., Sevindik M. et al., 2015. An underground burst of diversity – a new look at the phylogeny and taxonomy of the genus Talpa Linnaeus, 1758 (Mammalia: Talpidae) as revealed by nuclear and mitochondrial genes // Zool. J. Linn. Soc. V. 175. № 4. P. 930–948.
- Bannikova A.A., Chernetskaya D., Raspopova A., Alexandrov D., Fang Y. et al., 2018. Evolutionary history of the genus Sorex (Soricidae, Eulipotyphla) as inferred from multigene data // Zool. Scr. V. 47. № 5. P. 518–538.
- Barrera-Redondo J., Ramírez-Barahona S., Eguiarte L.E., 2018. Rates of molecular evolution in tree ferns are associated with body size, environmental temperature, and biological productivity // Evolution. V. 72. № 5. P. 1050–1062.
- Benton M.J., Ayala F.J., 2003. Dating the tree of life // Science. V. 300. № 5626. P. 1698–1700.
- Benton M.J., Donoghue P.C.J., 2007. Paleontological evidence to date the tree of life // Mol. Biol. Evol. V. 24. № 1. P. 26–53.
- Benton M.J., Donoghue P.C.J., Asher R.J., 2009. Calibrating and constraining molecular clocks // The Timetree of Life. N.-Y.: Oxford Univ. Press. P. 35–86.
- Bertorelle G., Benazzo A., Mona S., 2010. ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros // Mol. Ecol. V. 19. № 13. P. 2609–2625.
- Bininda-Emonds O.R.P., Cardillo M., Jones K.E., MacPhee R.D.E., Beck R.M.D. et al., 2007. The delayed rise of present-day mammals // Nature. V. 446. № 7135. P. 507–512.
- Bird A.P., 1980. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA // Nucleic Acids Res. V. 8. № 7. P. 1499–1504.
- Brandley M.C., Wang Y., Guo X., De Oca A.N.M., Fería-Ortíz M. et al., 2011. Accommodating heterogenous rates of evolution in molecular divergence dating methods: an example using intercontinental dispersal of *Plestiodon* (Eumeces) lizards // Syst. Biol. V. 60. № 1. P. 3–15.
- Bromham L., 2002. Molecular clocks in reptiles: Life history influences rate of molecular evolution // Mol. Biol. Evol. V. 19. № 3. P. 302–309.
- Bromham L., 2011. The genome as a life-history character: Why rate of molecular evolution varies between mammal species // Phil. Trans. Roy. Soc. B. Biol. Sci. V. 366. № 1577. P. 2503–2513.
- Bromham L., 2020. Causes of variation in the rate of molecular evolution // The Molecular Evolutionary Clock. Cham: Springer. P. 45–64.
- Bromham L., Penny D., 2003. The modern molecular clock // Nat. Rev. Genet. V. 4. № 3. P. 216–224.

- Bromham L., Rambaut A., Harvey P.H., 1996. Determinants of rate variation in mammalian DNA sequence evolution // J. Mol. Evol. V. 43. № 6. P. 610–621.
- Bromham L., Penny D., Rambaut A., Hendy M.D., 2000. The power of relative rates tests depends on the data // J. Mol. Evol. V. 50. № 3. P. 296–301.
- Bromham L., Hua X., Lanfear R., Cowman P.F., 2015. Exploring the relationships between mutation rates, life history, genome size, environment, and species richness in flowering plant // Am. Nat. V. 185. № 4. P. 507–524.
- Bromham L., Rambaut A., Fortey R., Cooper A., Penny D., 1998. Testing the Cambrian explosion hypothesis by using a molecular dating technique // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 95. № 21. P. 12386–12389.
- Bromham L., Duchêne S., Hua X., Ritchie A.M., Duchêne D.A., Ho S.Y.W., 2018. Bayesian molecular dating: Opening up the black box // Biol. Rev. V. 93. № 2. P. 1165–1191.
- Brown R.P., Yang Z., 2011. Rate variation and estimation of divergence times using strict and relaxed clocks // BMC Evol. Biol. V. 11.
  https://doi.org/10.1186/11.2148.11.271
- https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-271
- Brown W.M., George M., Jr., Wilson A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 76. № 4. P. 1967–1971.
- Butler P.M., 1948. On the evolution of the skull and teeth in the Erinaceidae, with special reference to fossil material in the British // Proc. Zool. Soc. Lond. V. 118. № 2. P. 446–500.
- *Chintalapati M., Moorjani P.*, 2020. Evolution of the mutation rate across primates // Curr. Opin. Genet. Dev. V. 62. P. 58–64.
- Cosson J.-F., Hutterer R., Libois R., Sara M., Taberlet P., Vogel P., 2005. Phylogeographical footprints of the Strait of Gibraltar and Quaternary climatic fluctuations in the western Mediterranean: A case study with the greater white-toothed shrew, Crocidura russula (Mammalia: Soricidae) // Mol. Ecol. V. 14. № 4. P. 1151–1162.
- Cracraft J., Houde P., Ho S.Y.W., Mindell D.P., Fjeldså J. et al., 2015. Response to comment on "Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds" // Science. V. 349. № 6255. https://doi.org/10.1126/science.aab1578
- Debruyne R., Poinar H.N., 2009. Time dependency of molecular rates in ancient DNA data sets, a sampling artifact? // Syst. Biol. V. 58. № 3. P. 348–360.
- Depéret C., 1887. Recherches sur la succession des Faunes de Vertébrés miocénes de la vallée du Rhone // Arch. Mus. Hist. Nat. Lyon. V. 4. P. 45–313.
- Donoghue P.C., Benton M.J., 2007. Rocks and clocks: Calibrating the tree of life using fossils and molecules // Trends Ecol. Evol. V. 22. № 8. P. 424–431.
- Doolittle R.F., Blombäck B., 1964. Amino-acid sequence investigations of fibrinopeptides from various mammals: evolutionary implications // Nature. V. 202. № 4928. P. 147–152.
- Dornburg A., Townsend J.P., Friedman M., Near T.J., 2014. Phylogenetic informativeness reconciles ray-finned fish molecular divergence times // BMC Evol. Biol. V. 14. № 1. https://doi.org/10.1186/s12862.014.0160.0

https://doi.org/10.1186/s12862-014-0169-0

- *Douady C., Douzery E.*, 2003. Molecular estimation of eulipotyphlan divergence times and the evolution of "Insectivora" // Mol. Phylogenet. Evol. V. 28. № 2. P. 285–296.
- Douady C.J., Chatelier P.I., Madsen O., Jong W.W., de, Catzeflis F. et al., 2002. Molecular phylogenetic evidence confirming the Eulipotyphla concept and in support of hedgehogs as the sister group to shrews // Mol. Phylogenet. Evol. V. 25. № 1. P. 200–209.
- Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J.F., 1998. Rates of spontaneous mutation // Genetics. V. 148. № 4. P. 1667–1686.
- Drummond A.J., Suchard M.A., 2010. Bayesian random local clocks, or one rate to rule them all // BMC Biol. V. 8. https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-114
- Drummond A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J., Rambaut A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence // PLoS Biol. V. 4. № 5. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 // Mol. Biol. Evol. V. 29. № 8. P. 1969–1973.
- Duchêne D., Bromham L., 2013. Rates of molecular evolution and diversification in plants: Chloroplast substitution rates correlate with species richness in the Proteaceae // BMC Evol. Biol. V. 13. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-65
- Duchêne S., Lanfear R., Ho S. Y.W., 2014. The impact of calibration and clock-model choice on molecular estimates of divergence times // Mol. Phylogenet. Evol. V. 78. P. 277–289.
- Duchêne S., Holt K.E., Weill F.-X., Le Hello S., Hawkey J. et al., 2016. Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria // Microb. Genom. V. 2. № 11. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000094
- Duffy S., Shackelton L.A., Holmes E.C., 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants // Nat. Rev. Genet. V. 9. № 4. P. 267–276.
- Duret L., Arndt P.F., 2008. The impact of recombination on nucleotide substitutions in the human genome // PLoS Genet. V. 4. № 5. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000071
- *Easteal S., Herbert G.*, 1997. Molecular evidence from the nuclear genome for the time frame of human evolution // J. Mol. Evol. V. 44. Suppl. 1. P. S121–S132.
- *Easteal S., Collet C., Betty D., Ashley M.V.*, 1995. Mammalian Molecular Clock. Austin: R.G. Landes Co. 170 p.
- *Eldredge N., Gould S.J.,* 1972. Punctuated equilibria: An alternative to phyletic gradualism // Models in Paleobiology. San Francisco: Freeman. P. 82–115.
- *Emerson B.C.*, 2007. Alarm bells for the molecular clock? No support for Ho et al.'s model of time-dependent molecular rate estimates // Syst. Biol. V. 56. № 2. P. 337–345.
- *Emerson B.C., Hickerson M.J.*, 2015. Lack of support for the time-dependent molecular evolution hypothesis // Mol. Ecol. V. 24. № 4. P. 702–709.
- Felsenstein J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach // J. Mol. Evol. V. 17. № 6. P. 368–376.

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ том 83 № 1 2022

- *Felsenstein J.*, 2004. Inferring Phylogenies. Sunderland: Sinauer associates. 681 p.
- *Fisher R.A.*, 1936. The measurement of selective intensity // Proc. Roy. Soc. B. V. 121. P. 58–62.
- Fitch W.M., Beintema J.J., 1990. Correcting parsimonious trees for unseen nucleotide substitutions: The effect of dense branching as exemplified by ribonuclease // Mol. Biol. Evol. V. 7. № 5. P. 438–443.
- Fleischer R.C., McIntosh C.E., Tarr C.L., 1998. Evolution on a volcanic conveyor belt: Using phylogeographic reconstructions and K-Ar-based ages of the Hawaiian Islands to estimate molecular evolutionary rates // Mol. Ecol. V. 7. № 4. P. 533–545.
- Foster C.S.P., Sauquet H., Merwe M., van der, McPherson H., Rossetto M., Ho S.Y.W., 2016. Evaluating the impact of genomic data and priors on Bayesian estimates of the angiosperm evolutionary timescale // Syst. Biol. V. 66. № 3. P. 338–351.
- *Frost D.R., Wozencraft W.C., Hoffmann R.S.*, 1991. Phylogenetic Relationships of Hedgehogs and Gymnures (Mammalia: Insectivora: Erinaceidae). Washington: Smithsonian Institution Press. 69 p.
- Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D. et al., 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // Nat. Biotechnol. V. 31. № 9. P. 822–826.
- Galtier N., Enard D., Radondy Y., Bazin E., Belkhir K., 2006. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA // Genome Res. V. 16. № 2. P. 215–222.
- *Galtier N., Jobson R.W., Nabholz B., Glemin S., Blier P.U.,* 2009. Mitochondrial whims: metabolic rate, longevity and the rate of molecular evolution // Biol. Lett. V. 5. № 3. P. 413–416.
- Gandolfo M., Nixon K.C., Crepet W.L., 2008. Selection of fossils for calibration of molecular dating models // Ann. Missouri Bot. Gard. V. 95. № 1. P. 34–42.
- Gao Z., Wyman M.J., Sella G., Przeworski M., 2016. Interpreting the dependence of mutation rates on age and time // PLoS Biol. V. 14. № 1. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002355
- *Gavryushkina A., Zhu C.*, 2020. Total-evidence dating and the fossilized birth–death model // The Molecular Evolutionary Clock. Cham: Springer. P. 175–197.
- Gavryushkina A., Welch D., Stadler T., Drummond A.J., 2014. Bayesian inference of sampled ancestor trees for epidemiology and fossil calibration // PLoS Comput. Biol. V. 10. № 12.
  - https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003919
- *Gillespie J.H.*, 1991. The Causes of Molecular Evolution. Oxford: Oxford Univ. Press. 336 p.
- Gillooly J.F., Allen A.P., West G.B., Brown J.H., 2005. The rate of DNA evolution: Effects of body size and temperature on the molecular clock // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 102. № 1. P. 140–145.
- *Goodman M.*, 1961. The role of immunologic differences in the phyletic development of human behavior // Hum. Biol. V. 33. № 2. P. 131–162.
- Goodman M., 1962. Evolution of the immunologic species specificity of human serum proteins // Hum. Biol. V. 34. P. 104–150.

- Gould G.C., 1995. Hedgehog phylogeny (Mammalia, Erinaceidae) the reciprocal illumination of the quick and the dead / American Museum Novitates. V. 3131. N.-Y.: Americian Museum of Natural History. 45 p.
- Guilderson T.P., Reimer P.J., Brown T.A., 2005. The boon and bane of radiocarbon dating // Science. V. 307. № 5708. P. 362–364.
- *Guindon S.*, 2020. Rates and rocks: Strengths and weaknesses of molecular dating methods // Front. Genet. V. 11. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00526
- Haines W.P., Schmitz P., Rubinoff D., 2014. Ancient diversification of Hyposmocoma moths in Hawaii // Nat. Commun. V. 5. https://doi.org/10.1038/ncomms4502
- Haldane J.B.S., 1947. The mutation rate of the gene for hemophilia, and its segregation ratios in males and fe-
- males // Ann. Eugenics. V. 13. № 4. P. 262–271. Hardouin E.A., Tautz D., 2013. Increased mitochondrial mutation frequency after an island colonization: posi-
- mutation frequency after an island colonization: positive selection or accumulation of slightly deleterious mutations? // Biol. Lett. V. 9. № 2. https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.1123
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T., 1989. Estimation of branching dates among primates by molecular clocks of nuclear DNA which slowed down in Hominoidea // J. Hum. Evol. V. 18. № 5. P. 461–476.
- Hasegawa M., Thorne J.L., Kishino H., 2003. Time scale of eutherian evolution estimated without assuming a constant rate of molecular evolution // Genes Genet. Syst. V. 78. № 4. P. 267–283.
- Heath T.A., Moore B.R., 2014. Bayesian inference of species divergence times // Bayesian Phylogenetics: Methods, Algorithms and Applications. Boca Raton: CRC Press. P. 277–318.
- Heath T.A., Holder M.T., Huelsenbeck J.P., 2012. A Dirichlet process prior for estimating lineage-specific substitution rates // Mol. Biol. Evol. V. 29. № 3. P. 939– 955.
- Heath T.A., Huelsenbeck J.P., Stadler T., 2014. The fossilized birth-death process for coherent calibration of divergence-time estimates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 111. № 29. P. E2957–E2966.
- Hedges S.B., Kumar S., 2003. Genomic clocks and evolutionary timescales // Trends Genet. V. 19. № 4. P. 200– 206.
- Heled J., Drummond A.J., 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data // Mol. Biol. Evol. V. 27. № 3. P. 570–580.
- Henn B.M., Gignoux C.R., Feldman M.W., Joanna L., Mountain J.L., 2008. Characterizing the time dependency of human mitochondrial DNA mutation rate estimates // Mol. Biol. Evol. V. 26. № 1. P. 217–230.
- Hennig W., 1966. Phylogenetic Systematics. Urbana: Univ. Illinois Press. 263 p.
- Herman J.S., McDevitt A.D., Kawałko A., Jaarola M., Wójcik J.M., Searle J.B., 2014. Land-bridge calibration of molecular clocks and the post-glacial Colonization of Scandinavia by the Eurasian field vole Microtus agrestis // PLoS One. V. 9. № 8.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103949

Hipsley C.A., Müller J., 2014. Beyond fossil calibrations: Realities of molecular clock practices in evolutionary biology // Front. Genet. V. 5. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00138

- Ho S. Y.W., 2009. An examination of phylogenetic models of substitution rate variation among lineages // Biol. Lett. V. 5. № 3. P. 421–424.
- *Ho S.Y.W.*, 2014. The changing face of the molecular evolutionary clock // Trends Ecol. Evol. V. 29. № 9. P. 496–503.
- *Ho S.Y.W.*, 2020. The molecular clock and evolutionary rates across the tree of life // The Molecular Evolutionary Clock. Cham: Springer. P. 3–24.
- *Ho S.Y.W., Duchêne S.*, 2014. Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales // Mol. Ecol. V. 23. № 24. P. 5947–5965.
- Ho S.Y.W., Phillips M.J., 2009. Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times // Syst. Biol. V. 58. № 3. P. 367–380.
- Ho S.Y.W., Duchêne S., Duchêne D., 2015a. Simulating and detecting autocorrelation of molecular evolutionary rates among lineages // Mol. Ecol. V. 15. № 4. P. 688– 696.
- Ho S.Y.W., Phillips M.J., Cooper A., Drummond A.J., 2005. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times // Mol. Biol. Evol. V. 22. № 7. P. 1561–1568.
- Ho S.Y.W., Shapiro B., Phillips M.J., Cooper A., Drummond A.J., 2007. Evidence for time dependency of molecular rate estimates // Syst. Biol. V. 56. № 3. P. 515–522.
- Ho S.Y.W., Lanfear R., Bromham L., Phillips M.J., Soubrier J. et al., 2011. Time-dependent rates of molecular evolution // Mol. Ecol. V. 20. № 15. P. 3087–3101.
- Ho S.Y.W., Tong K.J., Foster C.S.P., Ritchie A.M., Lo N., Crisp M.D., 2015b. Biogeographic calibrations for the molecular clock // Biol. Lett. V. 11. № 8. https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0194
- Hodgkinson A., Eyre-Walker A., 2011. Variation in the mutation rate across mammalian genomes // Nat. Rev. Genet. V. 12. № 11. P. 756–766.
- Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., Haeseler A., von, Pääbo S., 2001. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA // Nucleic Acids Res. V. 29. № 23. P. 4793–4799.
- Hope A.G., Ho S.Y.W., Malaney J.L., Cook J.A., Talbot S.L., 2014. Accounting for rate variation among lineages in comparative demographic analyses // Evolution. V. 68. № 9. P. 2689–2700.
- *Hua X., Bromham L.*, 2017. Darwinism for the genomic age: Connecting mutation to diversification // Front. Genet. V. 8.

https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00012

- Hua X., Cowman P., Warren D., Bromham L., 2015. Longevity is linked to mitochondrial mutation rates in rockfish: A test using Poisson regression // Mol. Biol. Evol. V. 32. № 10. P. 2633–2645.
- Huelsenbeck J.P., Larget B., Swofford D., 2000. A compound Poisson process for relaxing the molecular clock // Genetics. V. 154. № 4. P. 1879–1892.
- Hug L.A., Roger A.J., 2007. The impact of fossils and taxon sampling on ancient molecular dating analyses // Mol. Biol. Evol. V. 24. № 8. P. 1889–1897.

- *Igea J., Aymerich P., Bannikova A.A., Gosálbez J., Castresana J.*, 2015. Multilocus species trees and species delimitation in a temporal context: Application to the water shrews of the genus *Neomys //* BMC Evol. Biol. V. 15. https://doi.org/10.1186/s12862-015-0485-z
- *Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C.,* 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals // J. Mol. Evol. V. 32. № 12. P. 128–144.
- Jarvis E.D., Mirarab S., Aberer A.J., Li B., Houde P. et al., 2014. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds // Science. V. 346. № 6215. P. 1320–1331.
- Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., Haeseler A., von, Jermiin L.S., 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates // Nat. Methods. V. 14. № 6. P. 587–589.
- Kim S.-H., Elango N., Warden C.W., Vigoda E., Yi S., 2006. Heterogeneous genomic molecular clocks in primates // PLoS Genet. V. 2. № 10. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020163
- *Kimura M.*, 1968. Evolutionary rate at the molecular level // Nature. V. 217. № 5129. P. 624–626.
- *Kimura M.*, 1969. The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 63. № 4. P. 1181–1188.
- Kimura M., 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. N.Y.; L.; Cambridge: Cambridge Univ. Press. 394 p.
- *Kimura M., Ohta T.*, 1971. On the rate of molecular evolution // J. Mol. Evol. V. 1. № 1. P. 1–17.
- Kishino H., Thorne J.L., Bruno W.J., 2001. Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution // Mol. Biol. Evol. V. 18. № 3. P. 352–361.
- Kong A., Frigge M.L., Masson G., Besenbacher S., Sulem P., et al., 2012. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk // Nature. V. 488. № 7412. P. 471–475.
- Kumar S., 2005. Molecular clocks: Four decades of evolution // Nat. Rev. Genet. V. 6. № 8. P. 654–662.
- Kumar S., Hedges S.B., 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution // Nature. V. 392. № 6679. P. 917– 920.
- Kumar S., Hedges S.B., 2016. Advances in time estimation methods for molecular data // Mol. Biol. Evol. V. 33. № 4. P. 863–869.
- Kumar S., Filipski A., Swarna V., Walker A., Hedges S.B., 2005. Placing confidence limits on the molecular age of the human-chimpanzee divergence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 102. № 52. P. 18842–18847.
- Lanfear R., Welch J.J., Bromham L., 2010. Watching the clock: Studying variation in rates of molecular evolution between species // Trends Ecol. Evol. V. 25. № 9. P. 495–503.
- Lanfear R., Thomas J.A., Welch J.J., Bromham L., 2007. Metabolic rate does not calibrate the molecular clock // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 104. № 39. P. 15388– 15393.
- Lanfear R., Ho S.Y.W., Davies T.J., Moles A.T., Aarssen L., et al., 2013. Taller plants have lower rates of molecular evolution // Nat. Commun. V. 4. https://doi.org/10.1038/ncomms2836

24

- Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M., Senfeld T., Calcott B., 2017. Methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses // Mol. Biol. Evol. V. 34. № 3. P. 772–773.
- Langley C.H., Fitch W.M., 1974. An estimation of the constancy of the rate of molecular evolution // J. Mol. Evol. V. 3. № 3. P. 161–177.
- Lartillot N., Delsuc F., 2012. Joint reconstruction of divergence times and life-history evolution in placental mammals using a phylogenetic covariance model // Evolution. V. 66. № 6. P. 1773–1787.
- Lee M.S.Y., 1999. Molecular clock calibrations and metazoan divergence dates // J. Mol. Evol. V. 49. № 3. P. 385–391.
- Lepage T., Lawi S., Tupper P., Bryant D., 2006. Continuous and tractable models for the variation of evolutionary rates // Math. Biosci. V. 199. № 2. P. 216–233.
- Lopatin A.V., 2006. Early Paleogene insectivore mammals of Asia and establishment of the major groups of Insectivora // Paleontol. J. V. 40. № 3. P. S205–S405.
- Lukoschek V., Keogh J.S., Avise J.C., 2012. Evaluating fossil calibrations for dating phylogenies in light of rates of molecular evolution: a comparison of three approaches // Syst. Biol. V. 61. № 1. P. 22–43.
- *Lynch M.*, 2010a. Evolution of the mutation rate // Trends Genet. V. 26. № 8. P. 345–352.
- Lynch M., 2010b. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 107. № 3. P. 961–968.
- Lynch M., Ackerman M.S., Gout J.-F., Long H., Sung W. et al., 2016. Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate // Nat. Rev. Genet. V. 17. № 11. P. 704–714.
- Mai U., Mirarab S., 2021. Log transformation improves dating of phylogenies // Mol. Biol. Evol. V. 38. № 3. P. 1151–1167.
- Manceau M., Marin J., Morlon H., Lambert A., 2020. Model-based inference of punctuated molecular evolution // Mol. Biol. Evol. V. 37. № 11. P. 3308–3323.
- Margoliash E., 1963. Primary structure and evolution of cytochrome c // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 50. № 4. P. 672–679.
- Marshall C.R., 2008. A simple method for bracketing absolute divergence times on molecular phylogenies using multiple fossil calibration points // Am. Nat. V. 171. № 6. P. 726–742.
- *Marshall C.R.*, 2010. Using confidence intervals to quantify the uncertainty in the end-points of stratigraphic ranges // The Paleontological Society Papers. V. 16. P. 291–316.
- Martin A.P., Palumbi S.R., 1993. Body size, metabolic rate, generation time and the molecular clock // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 90. № 9. P. 4087–4091.
- Martínková N., Barnett R., Cucchi T., Struchen R., Pascal M. et al., 2013. Divergent evolutionary processes associated with colonization of offshore islands // Mol. Ecol. V. 22. № 20. P. 5205–5220.
- Matzke N.J., Wright A., 2016. Inferring node dates from tip dates in fossil Canidae: The importance of tree priors // Biol. Lett. V. 12. № 8. https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0328
- Mayr E., 1963. Animal Species and Evolution. Cambridge: Harvard Univ. Press. 797 p.

- Mein P., Ginsburg L., 1997. Les mammifères du gisement miocène inférieur de Li Mae Long, Thaïlande: systématique, biostratigraphie et paléoenvironnement // Geodiversitas. V. 19. № 4. P. 783–844.
- Mein P., Ginsburg L., 2002. Sur l'âge relatif des différents dépôts karstiques miocènes de La Grive-Saint-Alban (Isère) // Cahiers Sci. Mus. Hist. Nat. Lyon. V. 5. P. 7–47.
- Meredith R.W., Janecka J.E., Gatesy J., Ryder O.A., Fisher C.A. et al., 2011. Impacts of the Cretaceous Terrestrial Revolution and KPg extinction on mammal diversification // Science. V. 334. № 6055. P. 521–524.
- Milholland B., Dong X., Zhang L., Hao X., Suh Y., Vijg J., 2017. Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice // Nat. Commun. V. 8. https://doi.org/10.1038/ncomms15183
- Mitchell K.J., Cooper A., Phillips M.J., 2015. Comment on "Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds" // Science. V. 349. № 6255. P. 1460.
- Molak M., Ho S.Y.W., 2015. Prolonged decay of molecular rate estimates for metazoan mitochondrial DNA // PeerJ. V. 3. https://doi.org/10.7717/peerj.821
- Mooers A.O., Harvey P.H., 1994. Metabolic rate, generation time, and the rate of molecular evolution in birds // Mol. Phylogenet. Evol. V. 3. № 4. P. 344–350.
- Moorjani P., Amorim C.E.G., Arndt P.F., Przeworski M., 2016. Variation in the molecular clock of primates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 113. № 38. P. 10607– 10612.
- Müller H.J., 1954. The nature of the genetic effects produced by radiation // Radiation Biology. N.-Y.: McGraw-Hill. P. 351–473.
- Nabholz B., Glemin S., Galtier N., 2008. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals—the lon-gevity hypothesis // Mol. Biol. Evol. V. 25. № 1. P. 120–130.
- Nabholz B., Uwimana N., Lartillot N., 2013. Reconstructing the phylogenetic history of long-term effective population size and life-history traits using patterns of amino acid replacement in mitochondrial genomes of mammals and birds // Genome Biol. Evol. V. 5. № 7. P. 1273–1290.
- Nachman M.W., Crowell S.L., 2000. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans // Genetics. V. 156. № 1. P. 297–304.
- Navascues M., Emerson B.C., 2009. Elevated substitution rate estimates from ancient DNA: Model violation and bias of Bayesian methods // Mol. Ecol. V. 18. № 21. P. 4390–4397.
- Nei M., Xu P., Glazko G., 2001. Estimation of divergence times from multiprotein sequences for a few mammalian species and several distantly related organisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 98. № 5. P. 2497–2502.
- *Nguyen J.M.T., Ho S.Y.W.*, 2020. Calibrations from the fossil record // The Molecular Evolutionary Clock. Cham: Springer. P. 117–134.
- Nunney L., 1999. Lineage selection and the evolution of multistage carcinogenesis // Proc. Roy. Soc. B. V. 266. № 1418. P. 493–498.
- Ogilvie H.A., Heled J., Xie D., Drummond A.J., 2016. Computational performance and statistical accuracy of

\*BEAST and comparisons with other methods // Syst. Biol. V. 65. № 3. P. 381–396.

- Ohta T., 1972a. Evolutionary rate of cistrons and DNA divergence // J. Mol. Evol. V. 1. № 2. P. 150-157.
- Ohta T., 1972b. Population size and rate of evolution // J. Mol. Evol. V. 1. № 4. P. 305-314.
- Ohta T., 1973. Slightly deleterious mutant substitutions in evolution // Nature. V. 246. № 5428. P. 96–98.
- Ohta T., 1974. Mutational pressure as the main cause of molecular evolution and polymorphism // Nature. V. 252. № 5482. P. 351-354.
- Ohta T., 2002. Near-neutrality in evolution of genes and gene regulation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 99. № 25. P. 16134–16137.
- O'Leary M.A., Bloch J.I., Flynn J.J., Gaudin T.J., Giallombardo A. et al., 2013. The placental mammal ancestor and the post-K-Pg radiation of placentals // Science. V. 339. № 6120. P. 662–667.
- O'Reilly J.E., Donoghue P.C.J., 2020. The effect of fossil sampling on the estimation of divergence times with the fossilised birth death process // Syst. Biol. V. 69. № 1. P. 124-138.
- Pagel M., Venditti C., Meade A., 2006. Large punctuational contribution of speciation to evolutionary divergence at the molecular level // Science. V. 314. № 5796. P. 119-121.
- Pekar J., Worobey M., Moshiri N., Scheffler K., Wertheim J.O., 2021. Timing the SARS-CoV-2 index case in Hubei province // Science. V. 372. № 6540. P. 412-417.
- Pesole G., Sbisá E., Preparata G., Saccone C., 1992. The evolution of the mitochondrial D-loop region and the origin of modern man // Mol. Biol. Evol. V. 9. № 4. P. 587-598.
- Peterson G.I., Masel J., 2009. Quantitative prediction of molecular clock and Ka/Ks at short timescales // Mol. Biol. Evol. V. 26. № 11. P. 2595-2603.
- Pfeifer S.P., 2020. Spontaneous mutation rates // The Molecular Evolutionary Clock. Cham: Springer. P. 35-44.
- Phillips M.J., 2016. Geomolecular dating and the origin of placental mammals // Syst. Biol. V. 65. № 3. P. 546-557.
- Phillips S.J., Dudík M., Elith J., Graham C.H., Lehmann A. et al., 2009. Sample selection bias and presence-only distribution models: implications for background and pseudo-absence data // Ecol. Appl. V. 19. № 1. P. 181-197.
- Price J.P., Clague D.A., 2002. How old is the Hawaiian biota? Geology and phylogeny suggest recent divergence // Proc. Roy. Soc. B. Biol. Sci. V. 269. № 1508. P. 2429-2435.
- *Oiu Z.D., Storch G.*, 2005. The fossil record of the Eurasian Neogene Insectivores (Erinaceomorpha, Soricomorpha, Mammalia): Part I // Scripta Geol. Spec. Issue. Leiden. V. 5. P. 37-50.
- Rambaut A., Lam T.T., Carvalho L.M., Pybus O.G., 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen) // Virus Evol. V. 2. № 1.

https://doi.org/10.1093/ve/vew007

Ramsden C., Holmes E.C., Charleston M.A., 2009. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence // Mol. Biol. Evol. V. 26. № 1. P. 143–153.

- Rannala B., 2002. Identifiability of parameters in MCMC Bayesian inference of phylogeny // Syst. Biol. V. 51. № 5. P. 754–760.
- Rannala B., Yang Z., 2007. Inferring speciation times under an episodic molecular clock // Syst. Biol. V. 56. № 3. P. 453-466.
- Raspopova A.A., Bannikova A.A., Sheftel B.I., Kryštufek B., Kouptsov A.V. et al., 2020. A never-ending story of the common shrew: searching for the origin // Mammal Res. V. 65. № 4. P. 729–742.
- Reimer P.J., Bard E., Bayliss A., Beck J.W., Blackwell P.G. et al., 2013. IntCal13 and Marine13 radiocarbon age calibration curves 0-50,000 years cal BP // Radiocarbon. V. 55. № 4. P. 1869-1887.
- Reis M., dos, Yang Z., 2013. The unbearable uncertainty of Bayesian divergence time estimation // J. Syst. Evol. V. 51. № 1. P. 30–43.
- Reis M., dos, Zhu T., Yang Z., 2014. The impact of the rate prior on Bayesian estimation of divergence times with multiple loci // Syst. Biol. V. 63. № 4. P. 555–565.
- Reis M., dos, Donoghue P.C.J., Yang Z., 2016. Bayesian molecular clock dating of species divergences in the genomics era // Nat. Rev. Genet. V. 17. № 2. P. 71-80.
- Reis M., dos, Inoue J., Hasegawa M., Asher R.J., Donoghue P.C., Yang Z., 2012. Phylogenomic datasets provide both precision and accuracy in estimating the timescale of placental mammal phylogeny // Proc. Roy. Soc. B. V. 279. № 1742. P. 3491–3500.
- Reis M., dos, Thawornwattana Y., Angelis K., Telford M.J., Donoghue P.C.J., Yang Z., 2015. Uncertainty in the timing of origin of animals and the limits of precision in molecular timescales // Curr. Biol. V. 25. № 22. P. 2939-2950.
- Reis M.D., dos, Gunnell G.F., Barba-Montoya J., Wilkins A., Yang Z., Yoder A.D., 2018. Using phylogenomic data to explore the effects of relaxed clocks and calibration strategies on divergence time estimation: Primates as a test case // Syst. Biol. V. 67. № 4. P. 594-615.
- Rich T.H.V., 1981. Origin and history of the Erinaceidae and Brachyericinae (Mammalia, Insectivora) in North America // Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. V. 171. P. 1-116.
- Ritchie A.M., Lo N., Ho S.Y., 2017. The impact of the tree prior on molecular dating of data sets containing a mixture of inter-and intraspecies sampling // Syst. Biol. V. 66. № 3. P. 413–425.
- Roca A.L., Bar-Gal G.K., Eizirik E., Helgen K.M., Maria R. et al., 2004. Mesozoic origin for West Indian insectivores // Nature. V. 429. № 6992. P. 649–651.
- Rodríguez-Trelles F., Tarrío R., Ayala F.J., 2002. A methodological bias toward overestimation of molecular evolutionary time scales // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 99. № 12. P. 8112-8115.
- Rogers A.R., Harpending H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // Mol. Biol. Evol. V. 9. № 3. P. 552-569.
- Romiguier J., Ranwez V., Douzery E.J.P., Galtier N., 2013. Genomic evidence for large, long-lived ancestors to placental mammals // Mol. Biol. Evol. V. 30. № 1. P. 5–13.
- Ronquist F., Klopfstein S., Vilhelmsen L., Schulmeister S., Murray D.L., Rasnitsyn A.P., 2012. A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radia-

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ 2022 том 83 Nº 1

tion of the Hymenoptera // Syst. Biol. V. 61. No 6. P. 973–999.

Sagulenko P., Puller V., Neher R.A., 2018. TreeTime: Maximum-likelihood phylodynamic analysis // Virus Evol. V. 4. № 1.

https://doi.org/10.1093/ve/vex042

- Sanderson M.J., 1997. A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy // Mol. Biol. Evol. V. 14. № 12. P. 1218–1231.
- Sanderson M.J., 2002. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: A penalized likelihood approach // Mol. Biol. Evol. V. 19. № 1. P. 101–109.
- Sanderson M.J., 2003. r8s: Inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock // Bioinformatics. V. 19. № 2. P. 301–302.
- Santos C., Montiel R., Sierra B., Bettencourt C., Fernandez E. et al., 2005. Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: A model using families from the Azores Islands (Portugal) // Mol. Biol. Evol. V. 22. № 6. P. 1490–1505.
- Sarich V.M., Wilson A.C., 1967. Immunological time scale for hominid evolution // Science. V. 158. № 3805. P. 1200–1203.
- Scally A., 2016. The mutation rate in human evolution and demographic inference // Curr. Opin. Genet. Dev. V. 41. P. 36–43.
- Shapiro B., Rambaut A., Drummond A.J., 2006. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences // Mol. Biol. Evol. V. 23. № 1. P. 7–9.
- Shapiro B., Ho S.Y.W., Drummond A.J., Suchard M.A., Pybus O.G., Rambaut A., 2011. A Bayesian phylogenetic method to estimate unknown sequence ages // Mol. Biol. Evol. V. 28. № 2. P. 879–887.
- Shenbrot G., Bannikova A., Giraudoux P., Quéré J.-P., Raoul F., Lebedev V., 2017. A new recent genus and species of three-toed jerboas (Rodentia: Dipodinae) from China: A living fossil? // J. Zool. Syst. Evol. Res. V. 55. № 4. P. 356–368.
- Simpson G.G., 1945. The principles of classification and a classification of mammals // Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. V. 85. P. 1–350.
- Smith A.B., Peterson K.J., 2002. Dating the time of origin of major clades: molecular clocks and the fossil record // Annu. Rev. Earth Planet. Sci. V. 30. № 1. P. 65–88.
- Smith S.A., O'Meara B.C., 2012. treePL: Divergence time estimation using penalized likelihood for large phylogenies // Bioinformatics. V. 28. № 20. P. 2689–2690.
- Soubrier J., Steel M., Lee M.S.Y., Der Sarkissian C., Guindon S. et al., 2012. The influence of rate heterogeneity among sites on the time dependence of molecular rates // Mol. Biol. Evol. V. 29. № 11. P. 3345–3358.
- Springer M.S., Murphy W.J., Eizirik E., O'Brien S.J., 2003. Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 100. № 3. P. 1056–1062.
- Springer M.S., Meredith R.W., Gatesy J., Emerling C.A., Park J. et al., 2012. Macroevolutionary dynamics and historical biogeography of primate diversification inferred from a species supermatrix // PLoS One. V. 7. № 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049521

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ том 83 № 1 2022

- Springer M.S., Emerling C.A., Meredith R.W., Janečka J.E., Eizirik E., Murphy W.J., 2017. Waking the undead: Implications of a soft explosive model for the timing of placental mammal diversification // Mol. Phylogenet. Evol. V. 106. P. 86–102.
- Stadler T., 2010. Sampling-through-time in birth-death trees // J. Theor. Biol. V. 267. № 3. P. 396–404.
- Stadler T., Kühnert D., Bonhoeffer S., Drummond A.J., 2013. Birth-death skyline plot reveals temporal changes of epidemic spread in HIV and hepatitis C virus (HCV) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 110. № 1. P. 228–233.
- Stebbins G.L., Lewontin R.C., 1972. Comparative evolution at the levels of molecules, organisms, and populations // Darwinian, Neo-Darwinian, and Non-Darwinian Evolution. Berkeley: Univ. California Press. P. 23–42.
- Storch G., Qiu S., 1991. Insectivores (Mammalia: Erinaceidae, Soricidae, Talpidae) from the Lufeng hominoid locality, Late Miocene of China // Geobios. V. 24. № 5. P. 601–621.
- Suzuki M., Bird A., 2008. DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics // Nat. Rev. Genet. V. 9. № 6. P. 465–476.
- Tajima F, 1993. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis // Genetics. V. 135. № 2. P. 599–607.
- Takezaki N., Rzhetsky A., Nei M., 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees // Mol. Biol. Evol. V. 12. № 5. P. 823–833.
- Tamura K., Tao Q., Kumar S., 2018. Theoretical foundation of the RelTime method for estimating divergence times from variable evolutionary rates // Mol. Biol. Evol. V. 35. № 7. P. 1170–1182.
- Tamura K., Battistuzzi F.U., Billing-Ross P., Murillo O., Filipski A., Kumar S., 2012. Estimating divergence times in large molecular phylogenies // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 109. № 47. P. 19333–19338.
- Tao Q., Tamura K., Battistuzzi F.U., Kumar S., 2019. A machine learning method for detecting autocorrelation of evolutionary rates in large phylogenies // Mol. Biol. Evol. V. 36. № 4. P. 811–824.
- *Thomas J.A., Welch J.J., Lanfear R., Bromham L.*, 2010. A generation time effect on the rate of molecular evolution in invertebrates // Mol. Biol. Evol. V. 27. № 5. P. 1173–1180.
- *Thorne J.L., Kishino H., Painter I.S.*, 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution // Mol. Biol. Evol. V. 15. № 12. P. 1647–1657.
- To T.-H., Jung M., Lycett S., Gascuel O., 2016. Fast dating using least-squares criteria and algorithms // Syst. Biol. V. 65. № 1. P. 82–97.
- Tong K.J., Lo N., Ho S.Y.W., 2016. Reconstructing evolutionary timescales using phylogenomics // Zool. Syst. V. 41. № 4. P. 343–351.
- *Tuffley C., Timothy W., White J., Hendy M.D., Penny D.,* 2012. Correcting the apparent mutation rate acceleration at shorter time scales under a Jukes–Cantor model // Mol. Biol. Evol. V. 29. № 12. P. 3703–3709.
- Vandiver A.R., Idrizi A., Rizzardi L., Feinberg A.P., Hansen K.D., 2015. DNA methylation is stable during replication and cell cycle arrest // Sci. Rep. V. 5. https://doi.org/10.1038/srep17911

- Volz E.M., Frost S.D.W., 2017. Scalable relaxed clock phylogenetic dating // Virus Evol. V. 3. № 2. https://doi.org/10.1093/ve/vex025
- Warnock R.C.M., Parham J.F., Joyce W.G., Lyson T.R., Donoghue P.C.J., 2015. Calibration uncertainty in molecular dating analyses: There is no substitute for the prior evaluation of time priors // Proc. Roy. Soc. B. Biol. Sci. V. 282. № 1798. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1013
- Webster A.J., Payne R.J.H., Pagel M., 2003. Molecular phylogenies link rates of evolution and speciation // Science. V. 301. № 5632. P. 478.
- Welch J.J., Bromham L., 2005. Molecular dating when rates vary // Trends Ecol. Evol. V. 20. № 6. P. 320–327.
- Welch J.J., Bininda-Emonds O.R., Bromham L., 2008. Correlates of substitution rate variation in mammalian protein-coding sequences // BMC Evol. Biol. V. 8. https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-53
- Weller C., Wu M., 2015. A generation-time effect on the rate of molecular evolution in bacteria // Evolution. V. 69. № 3. P. 643–652.
- Wilson A.C., Carlson S.S., White T.J., 1977. Biochemical evolution // Annu. Rev. Biochem. V. 46. № 1. P. 573–639.
- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllensten U.B. et al., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics // Biol. J. Linn. Soc. V. 26. № 4. P. 375–400.
- Wilson Sayres M.A., Makova K.D., 2011. Genome analyses substantiate male mutation bias in many species // Bio-Essays. V. 33. № 12. P. 938–945.

- Woodhams M., 2006. Can deleterious mutations explain the time dependency of molecular rate estimates? // Mol. Biol. Evol. V. 23. № 12. P. 2271–2273.
- Wu C.I., Li W.H., 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 82. № 6. P. 1741–1745.
- Yang Z., Rannala B., 2006. Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds // Mol. Biol. Evol. V. 23. № 1. P. 212–226.
- Yoder A.D., Yang Z., 2000. Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks // Mol. Biol. Evol. V. 17. № 7. P. 1081–1090.
- Zheng Y., Wiens J.J., 2016. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species // Mol. Phylogenet. Evol. V. 94. P. 537–547.
- Zhu T., 2020. Bayesian molecular dating // The Molecular Evolutionary Clock. Cham: Springer. P. 83–100.
- Zhu T., Reis M., dos, Yang Z., 2015. Characterization of the uncertainty of divergence time estimation under relaxed molecular clock models using multiple loci // Syst. Biol. V. 64. № 2. P. 267–280.
- Zuckerkandl E., Pauling L., 1962. Molecular disease, evolution, and genic heterogeneity // Horizons in Biochemistry / Eds Kasha M., Pullman B. N.-Y.: Academic Press. P. 189–225.
- Zuckerkandl E., Pauling L., 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins // Evolving Genes and Proteins. N.-Y.: Academic Press. P. 97–166.

# The concept of modern molecular clock and experience in estimating divergence times of Eulipotyphia and Rodentia

A. A. Bannikova<sup>*a*, \*</sup> and V. S. Lebedev<sup>*b*, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991 Russia <sup>b</sup>Zoological Museum, Moscow State University B. Nikitskaya, 2, Moscow, 125009 Russia \*e-mail: hylomys@mail.ru \*\*e-mail: wslebedev@gmail.com

Almost 60 years have passed since the degree of DNA difference between two species was discovered to be a function of the time since their divergence. Later, it became clear that there is no global molecular clock and the rate of molecular evolution varies greatly depending on the gene and phylogenetic lineage, correlating with biological characteristics (generation length, body size, and fertility) and features of the genome. The development of the molecular clock concept is associated with the progress of methods that allow taking into account and measuring the degree of inconstancy of the molecular evolution rate. Currently, dating is mostly performed using Relaxed clock methods, which rely on various models of the evolution rate (for example, with or without autocorrelation of rates in adjacent branches). Another relevant factor that allows reducing the errors of molecular dating is an increase in the amount of data up to the genomic level, which increases the requirements for the computational efficiency of algorithms and methods for decomposing data into partitions. A separate problem is the dependence of the estimates of the evolution rate on time (the phenomenon of rate decay), which is especially important for the analysis of recent history. In the absence of an adequate sequence evolution model, the timing estimates can be significantly biased, which often affects the results obtained with mtDNA. One of the most important directions is the development of methods for obtaining calibration information: more complete use of the constantly and rapidly growing volume of paleontological data, analysis of paleoDNA, and other variants of heterochronous data. Despite the fact that the accuracy of estimates of the levels of molecular divergences continues to grow, the uncertainty in dating remains largely due to the ambiguity of calibrations and the shortcomings of existing models of the DNA sequences evolution.

УДК 575.8

# ИЗМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСА СИМБИОТИЧЕСКИХ ДРОЖЖЕЙ DROSOPHILA MELANOGASTER ПРИ АДАПТАЦИИ МУХ К СУБСТРАТАМ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ NaCl

© 2022 г. А. С. Дмитриева<sup>1, \*</sup>, Е. Ю. Яковлева<sup>1</sup>, И. А. Максимова<sup>1</sup>, А. А. Белов<sup>1</sup>, А. В. Марков<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия <sup>2</sup>Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН ул. Профсоюзная, 123, Москва, 117997 Россия \*E-mail: dmnastya89@mail.ru Поступила в редакцию 02.09.2021 г. После доработки 06.10.2021 г. Принята к публикации 25.10.2021 г.

Модельный организм Drosophila melanogaster является удобным объектом для изучения механизмов адаптации к неблагоприятным условиям среды. В ходе эволюционного эксперимента, проводимого на кафедре биологической эволюции МГУ, разные линии дрозофил адаптировались к кормам с различным содержанием NaCl (0, 2, 4 и 7%). Ранее нами было показано, что некоторые штаммы симбиотических дрожжей могут вносить вклад в адаптацию дрозофил к соленым субстратам, однако зависимость численности и состава дрожжевого населения дрозофил от концентрации соли в корме до сих пор специально не изучалась. В данной работе исследован количественный и качественный состав дрожжевой составляющей микробиома дрозофил из 11 лабораторных линий D. melanogaster и пяти обжитых ими кормов. Показано, что по мере роста концентрации соли в корме дрожжевой микробиом дрозофил претерпевает значительные изменения. Общая численность дрожжей меняется нелинейно: она минимальна при концентрации соли 0% и максимальна при 2–4%, при концентрации 7% численность дрожжей в мухах и их корме меньше, чем при 2-4%, но значительно больше, чем при 0%. При низкой концентрации соли в мухах резко преобладает вид Pichia occidentalis, при промежуточных концентрациях видовое разнообразие дрожжей возрастает при сохранении прежнего доминанта, а при 7% появляется новый доминант Starmerella bacillaris и сильно меняется состав минорных компонентов. Полученные данные согласуются с гипотезой о том, что дрожжи S. bacillaris помогают мухам выдерживать высокую концентрацию NaCl на ранних этапах адаптации, но в дальнейшем эти полезные симбионты могут быть потеряны мухами на фоне постепенного развития генетических адаптаций насекомых (или других компонентов микробиома) к соленому корму.

DOI: 10.31857/S0044459622010043

Вид Drosophila melanogaster Meig. (Diptera, Drosophilidae) — один из наиболее популярных модельных объектов для изучения взаимоотношений макроорганизма и микробиома, в том числе по причине относительной простоты его микробного населения, сходного по ряду признаков с микробиомом млекопитающих (Erkosar et al., 2013; Erkosar, Leulier, 2014; Newell, Douglas, 2014; Hoang et al., 2015; Trinder et al., 2017; Douglas, 2018). Ключевыми компонентами микробиома *D. melanogaster* являются бактерии и дрожжи, переносимые мухами в кишечнике и на поверхности тела.

Адаптация дрозофил к соли в лабораторных эволюционных экспериментах давно используется как модель для изучения механизмов микроэволюции (Waddington, 1959; Te Velde et al., 1988),

однако роль микробиома в такой адаптации начала изучаться лишь недавно. Особый интерес представляет дрожжевая часть микробиома, которая в целом изучена слабее, чем бактериальная. При этом известно, что дрожжи обычно служат основной пищей для дрозофил на разных стадиях развития и необходимы для нормального развития личинок D. melanogaster на природных субстратах (Becher et al., 2012). Разные виды дрожжей по-разному влияют на выживаемость и скорость развития личинок. а личинки проявляют избирательность, предпочитая питаться теми дрожжами, которые положительно влияют на их рост (Starmer, 1981; Anagnostou et al., 2010). Личинки и имаго дрозофил, со своей стороны, влияют на видовой состав дрожжевых сообществ, развивающихся на кормах, способствуя размножению определенных видов дрожжей и препятствуя росту мицелиальных грибов (Stamps et al., 2012). Некоторые виды дрожжей выдерживают прохождение через кишечник дрозофил, что позволяет дрозофилам служить эффективными распространителями дрожжей в природных условиях (Reuter et al., 2007; Coluccio et al., 2008; Stamps et al., 2012; Hoang et al., 2015; Günther, Goddard, 2019). Также известно, что видовой состав дрожжевой составляющей микробиома дрозофилид сильно зависит от диеты мух (Chandler et al., 2012). По-видимому, живые дрожжевые клетки могут передаваться от личинки к имаго в ходе метаморфоза, но только при наличии в кишечнике личинки определенных кишечных бактерий (Guilhot et al., 2020).

Ранее мы показали, что некоторые штаммы дрожжей (в особенности Starmerella bacillaris) помогают линиям D. melanogaster адаптироваться к корму с 4% NaCl (Панченко и др., 2017; Ивницкий и др., 2018; Dmitrieva et al., 2019). Однако общие закономерности изменения численности и состава дрожжевого микробиома дрозофил по мере роста концентрации соли в корме, к которому адаптируются насекомые, до сих пор не изучались. В данном исследовании мы попытались восполнить этот пробел, охарактеризовав численность и видовой состав дрожжевой части микробиома 11 лабораторных линий D. melanogaster, адаптированных к различным концентрациям соли.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подопытные линии мух и корма. В работе использовались 11 лабораторных линий взрослых мух (имаго) *D. melanogaster* и пять обжитых ими кормов. Все линии произведены от одной исходной аутбредной популяции дикого типа в октябре 2014 г. и содержатся на разных кормах в рамках эволюционного эксперимента, проводимого на кафедре биологической эволюции МГУ (Марков и др., 2015; Belkina et al., 2018; Dmitrieva et al., 2019).

Проведен анализ дрожжевого населения следующих 16 проб:

– N1flies, N2flies – контрольные линии мух, выращиваемые на стандартном корме (60 г инактивированных дрожжей, 35 г манной крупы, 50 г сахара, 45 г измельченного изюма, 8 г агара, 2 г пропионовой кислоты на 1 л корма) без добавления соли в боксах (см. ниже);

 N3flies — контрольная линия мух, выращиваемая на таком же корме без добавления соли в банке (см. ниже);

 N2medium, N3medium – корм, освоенный мухами N2flies и N3flies соответственно;  2S1flies, 2S2flies, 2S3flies – линии мух, содержащиеся в банках на таком же корме с добавлением 2% соли (20 г NaCl на 1 л корма);

– 2S1medium – корм дрозофил линии 2S1flies;

 4S1flies, 4S2flies, 4S3flies — линии мух, содержащиеся в банках на таком же корме с добавлением 4% соли;

– 4S1medium – корм дрозофил линии 4S1flies;

— 7S1flies, 7S2flies — линии мух, содержащиеся в боксах на таком же корме с добавлением 7% соли (эти линии в 2014—2016 гг. содержались на 4% соли, а затем постепенно, путем прибавления по 0.5% соли каждые два—три месяца, переведены на корм с 7% соли);

- 7S1medium - корм дрозофил линии 7S1flies.

Линии мух N3flies, 2S1flies, 2S2flies, 2S3flies, 4S1flies, 4S2flies, 4S3flies содержатся в цилиндрических стеклянных банках с кормом диаметром 64 мм и высотой 100 мм, закрытых ватно-марлевыми пробками, при естественном освещении и температуре  $22-25^{\circ}$ С. В каждой банке находится 50 мл корма и поилка — цилиндрический пластиковый резервуар объемом 1 мл, заполненный мокрой ватой. Каждые две недели все имаго, находящиеся в банке, обездвиживаются углекислым газом и извлекаются из сосуда на стерилизованную охлажденную плитку, затем из них случайным образом отбираются 10 самцов и 10 самок, которые помещаются в банку со свежим кормом.

Линии мух N1flies, N2flies, 7S1flies, 7S2flies содержатся в боксах из оргстекла, в каждом из которых корм находится в 12 открытых цилиндрических стеклянных пробирках диаметром 22 мм и высотой 100 мм, содержащих по 10 мл корма. Еженедельно в бокс добавляются четыре пробирки со свежим кормом и удаляются четыре пробирки, простоявшие в боксе три недели. Помимо пробирок с кормом, в каждом боксе находится поилка — пробирка со смоченной ватой, заменяемая еженедельно.

Методика проведения эксперимента и приготовления гомогенатов имаго. Изучение микробиоты дрозофил и их кормов проводилось с октября 2020 г. по февраль 2021 г.

Для анализа микробиоты из каждой линии мух брали по 10 имаго в возрасте 7 сут после выхода из куколки. Ранее мы показали, что именно в этом возрасте численность дрожжей в мухах, как правило, достигает максимума (Дмитриева и др., 2021). Чтобы смыть клетки дрожжей с поверхности насекомых, мух помещали в стерильные пробирки и промывали в 10 мл стерильной воды на вортексе MultiReax (Heidolph, Германия) в режиме 1700 об/мин в течение 15 мин. После этого насекомых доставали стерильной петлей и переносили в стерильные микропробирки, в которых проводилась их гомогенизация в 1 мл стерильной воды с помощью силиконового пестика, после чего каждый гомогенат еще раз был обработан на вортексе в течение 3 мин. Параллельно исследовали пять обжитых мухами кормов (см. выше). Для этого брали 10 мг корма с поверхности, а затем гомогенизировали и разводили по методике, описанной выше.

Для определения дрожжевого компонента микробиоты дрозофил и кормов из полученных образцов было сделано два последовательных десятикратных разведения, которые в 10-кратной повторности высевали на чашки Петри по методу Дригальского. В качестве питательной среды использовали глюкозо-пептонно-дрожжевой агар (глюкоза – 20 г/л, пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, агар – 20 г/л), в который перед разливом в чашки для подавления роста бактерий добавляли хлорамфеникол (1 г/л). Посевы инкубировали в течение 3 сут при комнатной температуре  $(20-22^{\circ}C)$ , а затем еще 4-7 сут в холодильнике при температуре 4-6°С для того, чтобы колонии хорошо сформировались, но не слились воедино.

Методика оценки состава дрожжевого компонента микробиома. Выросшие колонии были разделены на типы на основании макроморфологических признаков и подсчитаны. В результате для каждого образца была определена численность представителей каждого морфотипа колоний, а также общая численность дрожжей в колониеобразующих единицах (КОЕ) в пересчете на одну муху или на 1 мг корма (поскольку масса дрозофилы составляет примерно 1 мг). По две-три колонии из каждого морфотипа были выделены в чистую культуру, а затем сгруппированы на основании культуральных и микроморфологических признаков.

По одному-два представителя каждой группы были идентифицированы до вида на основании анализа нуклеотидных последовательностей ITS региона рДНК. Для выделения ДНК чистые культуры наращивали на жидкой глюкозо-пептоннодрожжевой среде в течение 3-4 сут. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин. Далее удаляли надосадочную жидкость, клетки промывали в стерильном фосфатно-солевом (рН 7.4) буферном растворе (ЭкоСервис, Россия) и ресуспендировали в Трис-ЭДТА буфере (рН 8.0). Полученные суспензии инкубировали на водяной бане при температуре 100°С в течение 10 мин, добавляли 100 мг стерильных стеклянных шариков (200-300 мкм) и обрабатывали на гомогенизаторе Minilys (Bertin Instruments, Франция) в течение 30 с при 5000 об/мин. Полученные лизаты центрифугировали при 14500 об/мин в течение 3 мин и полученную надосадочную жидкость использовали в качестве матрицы для постановки ПЦР.

Амплификацию проводили по следующей программе: 1) первичная денатурация при 96°С в течение 2 мин; 2) далее 35 циклов: денатурация при 96°С – 20 с, отжиг праймеров при  $52^{\circ}$ С – 50 с, синтез дочерней цепи  $72^{\circ}$ С – 1.5 мин; 3) финальная элонгация при  $72^{\circ}$ С в течение 7 мин. При амплификации использовали праймеры ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA-3') и NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Визуализацию полученных ПЦР-продуктов проводили с помощью горизонтального электрофореза в 1.5% агарозном геле.

Секвенирование выполнено с использованием праймера NL4 научно-исследовательской компанией "Евроген" (Москва). Редактирование полученных последовательностей выполнено с использованием программы Chromas Lite 2.01. Для выравнивания и сравнения последовательностей использовали программу Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). При идентификации чистых культур использовали алгоритмы BLAST базы данных GenBank NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Полученные последовательности депонированы в базе данных GenBank NCBI под номерами OK181114– OK181159.

Разнообразие дрожжевого микробиома оценивали с помощью индекса видового разнообразия Шеннона, рассчитываемого по формуле  $H = -\sum_{i=1}^{k} \frac{N_i}{N} \ln \frac{N_i}{N}$ , где N – общая численность дрожжей всех видов в пробе,  $N_i$  – численность *i*-го вида дрожжей в пробе, *i* изменяется от 1 до *k*, где *k* – количество видов дрожжей в пробе. Данный индекс учитывает одновременно и видовое богатство дрожжей в пробе и выравненность распределения КОЕ по видам (рис. 1). Значение индекса равно нулю, если в пробе всего один вид дрожжей. При прочих равных, чем больше индекс Шеннона, тем более разнообразным можно считать дрожжевое сообщество пробы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные результаты представлены в табл. 1. Для каждой пробы приведена общая численность дрожжей всех видов и численность каждого вида в отдельности. Данные величины — усредненные, так как посев производился в 10-кратной повторности. Приведено их стандартное отклонение. Также рассчитано относительное обилие каждого вида дрожжей в пробе (в процентах).

В исследованных образцах обнаружено в общей сложности шесть видов дрожжей:

1) *Starmerella bacillaris* (Kroemer & Krumbholz) F.L. Duarte & A. Fonseca, 2012;

2) *Starmerella etchellsii* (Lodder & Kreger-van Rij) C.A. Rosa & Lachance, 2018;



**Рис. 1.** Индекс Шеннона, характеризующий видовое разнообразие дрожжевого населения в пробах. Закрашенные ромбы — линии мух, незакрашенные — пробы корма. Ноль означает, что микробное сообщество состоит только из одного вида (дрожжей). В пробе N3flies дрожжей не обнаружено, поэтому значение отсутствует.

3) *Candida californica* (Mrak & McClung ex K.W. Anderson & C.E. Skinner, 2006);

4) Pichia membranifaciens (Hansen, 1904) E.C. Hansen;

5) *Pichia occidentalis* (Kurtzman, Smiley & Johnson, 2008) Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers;

6) Zygosaccharomyces bailii (Barnett et al., 1983).

Кроме того, в линии 7S1flies встречаются колонии мицелиального гриба *Geotrichum candidum* (Link, 1809).

Дрожжи обнаружены во всех пробах, кроме одной (N3flies). Дрожжевой микробиом каждой отдельной пробы может включать от одного до четырех видов дрожжей. Пробы сильно различаются по значению индекса разнообразия Шеннона (рис. 1).

На кормах без добавления соли общая численность дрожжей невелика (рис. 2). На корме N3mediит доминируют два вида: *P. occidentalis* и *Z. bailii*; а *C. californica* — минорный компонент дрожжевого микробиома. В корме N2medium дрожжевое население на 100% состоит из дрожжей *Z. bailii*.

На корме с 2% соли дрожжей на два порядка больше. Этот корм населен почти исключительно дрожжами *P. occidentalis*. Дрожжи *P. membranifaciens*, *C. californica* и *Z. bailii* представлены единичными редкими колониями.

Корм с добавлением 4% соли по таксономическому составу дрожжевого населения похож на корм с 2% соли, однако численность дрожжей на нем больше примерно в 2 раза.

На корме с 7% соли дрожжей тоже довольно много, хотя и меньше, чем на кормах с 2 и 4% соли (рис. 2). Дрожжевое население корма 7S1medium довольно разнообразно и при этом характеризу-

ется видами, не встречающимися на других кормах. Доминантным видом выступает P. occidentalis, в роли субдоминанта – S. bacillaris. Первый вид распространен в разных линиях мух и на кормах, а второй встречался ранее в линиях, содержащихся на корме с 4% NaCl (Ивницкий и др., 2018; Dmitrieva et al., 2019), но в настоящем исследовании он в них не обнаружен и встречается только в линиях, живущих на корме с 7% NaCl. Это дает основания предположить, что дрожжи S. bacillaris маркируют определенный этап адаптации мух к корму с высоким содержанием соли. Возможно, данный этап уже завершился на корме с 4% соли и еще идет на корме с 7% соли (Дмитриева и др., 2021). Кроме того, более 8% колониеобразующих единиц в корме 7S1medium принадлежат не встречавшимся ранее видам дрожжей, которые пока не удалось надежно определить.

Соотношение численности дрожжей в мухах, живущих на кормах с разной концентрацией соли, аналогично ситуации на кормах. Меньше всего дрожжей в мухах, живущих на корме без добавления соли, больше всего — в мухах на кормах с добавлением 2 и 4% соли. Мухи, живущие на корме с 7% соли, имеют больше дрожжей, чем те, что живут без соли, и меньше, чем те, что живут на кормах с 2 и 4% соли.

Дрожжевое население мух из линий, живущих на корме без добавления соли, наименее разнообразное. В линиях N1flies и N2flies оно полностью состоит из дрожжей вида *P. occidentalis*. У мух из линии N3flies дрожжи не обнаружены вовсе (поэтому точка на рис. 1, соответствующая данной линии, отсутствует). Последний результат выглядит неожиданным, учитывая, что дрожжевое население корма N3medium довольно разнообраз-

об указано относительное	
ждой из 16 пр	нение
NaCl. Для ка:	артное откло
нцентрации	рма) ± станда
іри разной ко	или на 1 мг ко
овых средах і	Е (на 1 муху в
х мух и корм	ое число КОІ
в гомогената	и абсолютно
сть дрожжей	дрожжей (%)
1. Численно	аждого вида
Таблица	обилие к

AUTINO NUM	the state of the									
Проба	Starmerella bacillaris	S. etchellsii	Pichia occidentalis	P. membrani- faciens	Candida californica	Zygosaccharomyces bailii	Geotrichum candidum	Gen. et sp. indet.	Общая численность КОЕ/муха (мг корма)	Стандартное отклонение общей численности
N2medium	0	0	0	0	0	$\begin{array}{c} 100\% \\ (20\pm 63) \end{array}$	0	0	20	63
N3medium	0	0	54.9% ( $560 \pm 420$ )	0	$\begin{array}{c} 2.0\% \\ (20\pm 63) \end{array}$	43.1% (440 ± 523)	0	0	1020	670
NIflies	0	0	100% (3480 $\pm$ 972)	0	0	0	0	0	3480	972
N2flies	0	0	100% (560 ± 246)	0	0	0	0	0	560	246
N3flies	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2S1medium	0	0	99.7% (118640 ± 20243)	0.2% (220 ± 220)	$\begin{array}{c} 0.07\% \\ (80\pm103) \end{array}$	0.02% (20 ± 63)	0	0	118960	20188
2SIflies	0	0	$\begin{array}{c} 98.4\% \\ (95160\pm10087) \end{array}$	0	1.6% (1540 ± 1334)	0.04% (40 ± 84)	0	0	96740	10688
2S2flies	0	0	$\begin{array}{c} 98.9\% \\ (188960\pm 60303) \end{array}$	0	1.1% (2200 ± 1941)	0	0	0	191160	60733
2S3flies	0	0	$\begin{array}{c} 99.4\% \\ (293480\pm82848) \end{array}$	0	0.6% (1820 $\pm$ 1872)	0	0	0	295300	83388
4S1medium	0	0	$\begin{array}{c} 99.9\% \\ (201040\pm59974) \end{array}$	0	0.1% (200 ± 432)	0	0	0	201240	59948
4SIflies	0	0	$\begin{array}{c} 98.0\% \\ (130660\pm32080) \end{array}$	2.0% (2740 ± 499)	0	0	0	0	133400	32146
4S2flies	0	0	$\begin{array}{c} 99.99\% \\ (139100\pm41200) \end{array}$	0.01% (20 ± 63)	0	0	0	0	139120	41 235
4S3flies	0	0	$\begin{array}{c} 98.0\% \\ (494400 \pm 147912) \end{array}$	0.06% (320 ± 424)	0	1.9% (9720 ± 4884)	0	0	504440	149799
7S1medium	23.2% (6880 ± 3198)	0	67.2% (19900 ± 9069)	1.2% (356 ± 400)	0	0	0	8.3% (2460 ± 7164)	29596	11 460
7S If lies	99.5% (52140 ± 12417)	0	0.5% (238 ± 238)	0	0	0	0.02% (8 ± 14)	0	52306	12370
7S2flies	$89.3\% (1846 \pm 1009)$	1.0% (20 ± 28)	9.6% (198 ± 186)	0.2% (4 ± 13)	0	0	0	0	2068	1029

# ИЗМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСА СИМБИОТИЧЕСКИХ ДРОЖЖЕЙ

33



**Рис. 2.** Общая численность дрожжей. Значения приведены в логарифмической шкале, отрезками показано стандартное отклонение. Закрашенные ромбы – линии мух, незакрашенные – пробы корма.

но. Причины контрастных различий дрожжевого населения мух и кормов, на которых они живут, пока неясны.

При повышении концентрации соли до 2–4% разнообразие дрожжей в мухах заметно возрастает. Дрожжевое население мух из линий, живущих на корме с добавлением 2% соли, сходно во всех трех репликах (2S1flies, 2S2flies, 2S3flies). Оно также сходно с дрожжевым сообществом корма 2S1medium. Доминирующим видом дрожжей является *P. occidentalis*, a *C. californica* – основной минорный вид. В пробах 2S1flies и 2S1medium также обнаружены единичные колонии *Z. bailii*.

Дрожжевое население мух из линий, живущих на корме с добавлением 4% соли, сходно во всех трех репликах. Также оно схоже с дрожжевым микробиомом корма 4S1medium. Доминирующий вид дрожжей – *P. occidentalis. P. membranifaciens* встречается в небольшом количестве во всех трех линиях 4S, а в линии 4S3flies встречаются также дрожжи *Z. bailii*. Таким образом, дрожжевой микробиом мух, живущих на 2 и 4% соли, в целом схож.

При росте концентрации соли в корме от 2–4 до 7% в кишечнике мух происходит смена доминанта с *P. occidentalis* на *S. bacillaris*, доля *P. occidentalis* резко снижается и меняется состав минорных компонентов: исчезают *C. californica* и *Z. bailii*, появляются *S. etchellsii* и *Geotrichum candidum*. Дрожжевое сообщество, населяющее корм с 7% соли, сильно отличается от дрожжевого населения кишечника мух, живущих на этом корме. Доминант на корме – *P. occidentalis*, а в кишечнике мух обеих линий (7S1flies, 7S2flies) доминирует вид *S. bacillaris*.

Интересно, что в пробе 7S2flies появляется еще один вид дрожжей из того же рода – S. etchellsii, не встречавшийся ранее ни в одной из рассматриваемых линий (Ивницкий и др., 2018; Dmitrieva et al., 2019; Дмитриева и др., 2021). Об экологии вида S. etchellsii известно немного. Этот вид спорадически выделяется из самых разных источников (Kurtzman et al., 2011), но чаще всего его обнаруживали на пчелах и в субстратах, посешаемых этими насекомыми (Rosa et al., 2003; Teixeira et al., 2003). Также в литературе есть сведения об осмотолерантности этих дрожжей, их использовании при производстве соевого соуса, а также неоднократном обнаружении в субстратах с высоким содержанием соли, например, в огуречном рассоле (Lee et al., 1992; Suzuki et al., 1992; Wanakhachornkrai, Lertsiri, 2003; Feng et al., 2012).

Как видно из приведенного описания и табл. 1, дрожжевое население корма и мух существенно различается при минимальной (0%) и максимальной (7%) концентрации соли, но сходно при промежуточных концентрациях (2 и 4%). Так, при концентрации соли 0% в гомогенатах мух обнаружен только один вид дрожжей (*P. occidentalis*), тогда как в корме выявлены три вида (*P. occidentalis*, *Z. bailii, C. californica*). При концентрации 7% в гомогенатах доминируют дрожжи *S. bacillaris*, а в корме – *P. occidentalis*. Различаются и минорные компоненты дрожжевого микробиома: только в гомогенатах мух 7S обнаружены виды *S. etchellsii* и *G. candidum*, в то время как дрожжи Gen. et sp. in-

det. (пока не идентифицированные, но отличные от всех идентифицированных видов) обнаружены только в корме, где они составляют свыше 8% от общего числа колониеобразующих единиц. При концентрациях соли 2 и 4% дрожжевое население мух и корма, напротив, сходно по составу: всегда преобладает *P. occidentalis*, а все минорные компоненты (*P. membranifaciens, C. californica, Z. bailii*) встречаются и в гомогенатах, и в корме (хоть и не всегда, т.е. не в каждой пробе).

При всех четырех концентрациях NaCl численность дрожжей (КОЕ) в 1 мг корма сопоставима с их численностью в одной гомогенизированной мухе, масса которой составляет тоже примерно 1 мг. Поскольку перед приготовлением гомогената мухи промывались водой, а присутствие значительного количества дрожжей в полости тела, мышцах и других тканях и органах насекомого маловероятно, мы предполагаем, что в гомогенатах представлены в основном те дрожжи, которые находились в пищеварительном тракте. Поскольку масса содержимого пищеварительного тракта существенно меньше массы целого насекомого, можно говорить о повышенной концентрации дрожжей в пищеварительной системе мух по сравнению с кормом. Это может объясняться отчасти преимушественным питанием мух дрожжевой биомассой, а отчасти тем, что пищеварительная система мух предоставляет более благоприятные условия для некоторых видов дрожжей, чем корм.

Особый интерес представляет отсутствие вида S. bacillaris в линиях мух, содержащихся на корме с 4% соли, и его присутствие в линиях, содержащихся на корме с 7% соли. Ранее (в 2017-2018 гг.) дрожжи S. bacillaris доминировали в линиях 4S (Ивницкий и др., 2018; Dmitrieva et al., 2019), однако в дальнейшем (2019–2020 гг.) они перестали обнаруживаться в гомогенатах мух из этих линий (Дмитриева и др., 2021). При этом, как мы показали ранее, данный вид дрожжей вносит существенный вклад в адаптацию дрозофил к соли, повышая эффективность размножения мух на корме с 4% NaCl (Dmitrieva et al., 2019). Тот факт, что теперь вид S. bacillaris обнаружен у мух, адаптированных к 7% NaCl (ранее микробиом этих мух не изучался), хотя у линий 4S его по-прежнему нет, позволяет предположить, что мы имеем дело с некой сложной коэволюционной динамикой, отражающей различные этапы адаптации холобионта (симбиотического комплекса, включаюшего макроорганизм и его микробиом (Margulis, Fester, 1991)) к соленому корму. Например, не исключено, что дрожжи S. bacillaris успешно развиваются в линиях дрозофил, недавно помещенных на соленый корм (или недавно переведенных на более соленый корм с менее соленого, как линии 7S) и еще не успевших к нему адаптироваться генетически. На этом этапе дрожжи S. bacillaris, по-видимому, помогают мухам выдерживать высокую концентрацию NaCl, как показали ранее наши эксперименты (Dmitrieva et al., 2019). В дальнейшем, однако, эти полезные симбионты могут быть потеряны мухами (Дмитриева и др., 2021). Это может происходить на фоне постепенного развития генетических адаптаций насекомых к соленому корму или в результате изменения структуры самого микробиома. Возможно, S. bacillaris доминирует в микробном сообществе только пока оно не приспособилось к повышенной концентрации NaCl, но по мере адаптации других видов дрожжей к изменившимся условиям S. bacillaris вытесняется из сообщества. Кроме того, на процесс становления дрожжевого компонента микробного сообшества может оказывать влияние его бактериальный компонент. Для проверки этих гипотез и выявления механизмов предполагаемых тенденций (если они подтвердятся) необходимы дальнейшие эксперименты.

# выводы

Анализ дрожжевого компонента микробиома дрозофил, содержащихся на кормах с разным содержанием соли, позволил выявить следующие закономерности.

1. Общая численность дрожжей как в мухах, так и в их корме меняется с ростом концентрации NaCl немонотонно: она минимальна при концентрации соли 0%, максимальна — при концентрации 2 и 4%, при концентрации 7% численность дрожжей в мухах и их корме меньше, чем при 2— 4%, но значительно больше, чем при 0% (рис. 2).

2. По мере роста концентрации соли в корме дрожжевой микробиом дрозофил претерпевает значительные изменения. При концентрации 0% как численность, так и разнообразие дрожжей в гомогенатах мух минимальны, обнаруживается только P. occidentalis. При повышении концентрации до 2–4% численность и разнообразие дрожжей резко возрастают. Вид P. occidentalis по-прежнему доминирует, но к нему добавляются минорные компоненты: P. membranifaciens, C. californica, Z. bailii. При росте концентрации до 7% появляется новый доминант – S. bacillaris, а процентная доля P. occidentalis резко снижается. Меняется и состав других минорных компонентов: исчезают C. californica и Z. bailii, появляются S. etchellsii и G. candidum.

3. Дрожжевое население корма и мух существенно различается при минимальной (0%) и максимальной (7%) концентрациях соли, но сходно при промежуточных (2 и 4%) концентрациях.

4. Концентрация дрожжей (живых дрожжевых клеток) в пищеварительной системе мух значительно выше, чем в корме.

5. Дрожжи вида S. bacillaris, ранее доминировавшие в микробиоме мух, живущих на корме с 4% соли. больше не встречаются ни в этих мухах. ни в их корме. Однако они присутствуют в линиях, живущих на корме с 7% соли. Возможно, данный вид дрожжей маркирует начальный этап адаптации холобионта к повышению концентрации соли. Это согласуется с обнаруженным ранее фактом, что S. bacillaris вносит сушественный вклал в алаптацию дрозофил к соли. повышая эффективность размножения мух на корме с 4% NaCl (Dmitrieva et al., 2019). Для проверки этой гипотезы. а также для оценки относительного вклада генетических и эпигенетических изменений мух и компонентов их микробиома в адаптацию холобионта к повышению концентрации соли в корме требуются дальнейшие исследования.

# ФИНАНСИРОВАНИЕ

Микробиологическое исследование выполнено в рамках темы государственного задания № 121040800174-6 "Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал". Молекулярная идентификация видов дрожжей и культивирование дрозофил в рамках эволюционного эксперимента выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-34-90141).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов какихлибо исследований с использованием теплокровных животных в качестве объектов.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дмитриева А.С., Максимова И.А., Качалкин А.В., Марков А.В., 2021. Возрастные изменения дрожжевой составляющей микробиома Drosophila melanogaster // Микробиология. Т. 90. № 2. С. 226–235.
- Ивницкий С.Б., Максимова И.А., Панченко П.Л., Дмитриева А.С., Качалкин А.В. и др., 2018. Роль микробиома в адаптации Drosophila melanogaster к кормовому субстрату с повышенной концентрацией NaCl // Журн. общ. биологии. Т. 79. № 5. С. 393–403.
- Марков А.В., Ивницкий С.Б., Корнилова М.Б., Наймарк Е.Б., Широкова Н.Г., Перфильева К.С., 2015. Материнский эффект маскирует адаптацию к неблагоприятным условиям и затрудняет дивергенцию у Drosophila melanogaster // Журн. общ. биологии. Т. 76. № 6. С. 429–437.
- Панченко П.Л., Корнилова М.Б., Перфильева К.С., Марков А.В., 2017. Симбиотическая микробиота вносит вклад в адаптацию Drosophila melanogaster к небла-

гоприятной кормовой среде // Изв. РАН. Сер. биол. Т. 44. С. 341–351.

- Anagnostou C., Dorsch M., Rohlfs M., 2010. Influence of dietary yeasts on Drosophila melanogaster life-history traits // Entomol. Exp. Appl. V. 136. P. 1–11.
- Becher P.G., Flick G., Rozpędowska E., Schmidt A., Hagman A. et al., 2012. Yeast, not fruit volatiles mediate Drosophila melanogaster attraction, oviposition and development // Funct. Ecol. V. 26. P. 822–828.
- Belkina E.G., Naimark E.B., Gorshkova A.A., Markov A.V., 2018. Does adaptation to different diets result in assortative mating? Ambiguous results from experiments on Drosophila // J. Evol. Biol. V. 31. P. 1803–1814.
- *Chandler J.A., Eisen J.A., Kopp A.*, 2012. Yeast communities of diverse *Drosophila species*: Comparison of two symbiont groups in the same hosts // Appl. Environ. Microbiol. V. 78. P. 7327–7336.
- Coluccio A.E., Rodriguez R.K., Kernan M.J., Neiman A.M., 2008. The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila* // PLoS One. V. 3.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002873

Dmitrieva A.S., Ivnitsky S.B., Maksimova I.A., Panchenko P.L., Kachalkin A.V., Markov A.V., 2019. Symbiotic yeasts affect adaptation of Drosophila melanogaster to food substrate with high NaCl concentration // PLoS One. V. 14.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224811

- *Douglas A.E.*, 2018. The *Drosophila* model for microbiome research // Lab. Anim. V. 47. P. 157–164.
- *Erkosar B., Leulier F.*, 2014. Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: Novel insights from the *Drosophila* model // FEBS Lett. V. 588. № 22. P. 4250–4257.
- *Erkosar B., Storelli G., Defaye A., Leulier F.*, 2013. Host-intestinal microbiota mutualism: "learning on the fly" // Cell Host Microbe. V. 13. P. 8–14.
- Feng J., Zhan X.-B., Wang D., Zhang L.-M., Lin C.-C., 2012. Identification and analysis of the metabolic functions of a high-salt-tolerant halophilic aromatic yeast *Candida etchellsii* for soy sauce production // World J. Microbiol. Biotechnol. V. 28. № 4. P. 1451–1458.
- Guilhot R., Rombaut A., Xuéreb A., Howell K., Fellous S., 2020. Bacterial influence on the maintenance of symbiotic yeast through *Drosophila* metamorphosis // bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.05.31.126185
- Günther C.S., Goddard M.R., 2019. Do yeasts and Drosophila interact just by chance? // Fungal Ecol. V. 38. P. 37–43.
- Hoang D., Kopp A., Chandler J.A., 2015. Interactions between Drosophila and its natural yeast symbionts – Is Saccharomyces cerevisiae a good model for studying the fly-yeast relationship? // PeerJ. V. 3. https://doi.org/10.7717/peerj.1116
- *Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T.,* 2011. The Yeasts, a Taxonomic Study. 5th edn. Amsterdam: Elsevier. 2080 p.
- Lee F.-L., Lee C.-F., Okada S., Hsu W.-H., Kozaki M., 1992. Chemotaxonomic comparison of osmotolerant yeasts isolated from "Inyu" (black soybean sauce) mash in Taiwan and "Shoyu" (soybean sauce) mash in Japan // Bull. Jpn. Fed. Cult. Coll. V. 8. P. 11–17.
- *Margulis L., Fester R.*, 1991. Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis. Boston: MIT Press. 470 p.
- *Newell P.D., Douglas A.E.*, 2014. Interspecies interactions determine the impact of the gut microbiota on nutrient

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ том 83 № 1 2022
allocation in *Drosophila melanogaster* // Appl. Environ. Microbiol. V. 80. № 2. P. 788–796.

- *Reuter M., Bell G., Greig D.*, 2007. Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector // Curr. Biol. V. 17. P. R81–R83.
- Rosa C.A., Lachance M.-A., Silva J.O.C., Teixeira A.C.P., Marini M.M. et al., 2003. Yeast communities associated with stingless bees // FEMS Yeast Res. V. 4. № 3. P. 271–275.
- Stamps J.A., Yang L.H., Morales V.M., Boundy-Mills K.L., 2012. Drosophila regulate yeast density and increase yeast community similarity in a natural substrate // PLoS One. V. 7.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042238

- Starmer W.T., 1981. A comparison of Drosophila habitats according to the physiological attributes of the associated yeast communities // Evolution. V. 35. P. 38–52.
- Suzuki M., Nakase T., Mori H., Toriumi H., Kurtzman C.P., 1992. Chemotaxonomic study on halophilic/halotoler-

ant yeasts in the matured soy sauce mashes // Bull. Jpn. Fed. Cult. Coll. V. 8. P. 18–27.

- Te Velde J.H., Molthoff C.F.M., Scharloo W., 1988. The function of anal papillae in salt adaptation of Drosophila melanogaster larvae // J. Evol. Biol. V. 2. P. 139–153.
- Teixeira A.C.P., Marini M.M., Nicoli J.R., Antonini Y., Martins R.P. et al., 2003. Starmerella meliponinorum sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 53. P. 339–343.
- Trinder M., Daisley B.A., Dubeet J.S., Reiß G., 2017. Drosophila melanogaster as a high-throughput model for host-microbiota interactions // Front. Microbiol. V. 8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00751
- Waddington C.H., 1959. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters // Nature. V. 183. P. 1654–1655.
- Wanakhachornkrai P, Lertsiri S., 2003. Comparison of determination method for volatile compounds in Thai soy sauce // Food Chem. V. 83. P. 619–629.

## Changes in the symbiotic yeasts of *Drosophila melanogaster* in course of adaptation to substrates with extra NaCl content

A. S. Dmitrieva<sup>a</sup>, \*, E. Yu. Yakovleva<sup>a</sup>, I. A. Maksimova<sup>a</sup>, A. A. Belov<sup>a</sup>, and A. V. Markov<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University Leninskie Gory, 1, bld. 12, Moscow, 119234 Russia <sup>b</sup>Borisyak Paleontological Institute, RAS Profsoyuznaya, 123, Moscow, 117997 Russia \*e-mail: dmnastva89@mail.ru

The model organism *Drosophila melanogaster* is a convenient object for studying the mechanisms of adaptation to adverse environments. In course of an evolutionary experiment conducted at the Department of Biological Evolution of Moscow State University, different *Drosophila* strains adapt to food substrates with different NaCl content (0, 2, 4, and 7%). Previously, we have shown that some strains of symbiotic yeast can contribute to the adaptation of *Drosophila* to high-salt substrates. However, the relationship between NaCl concentration and the abundance and composition of yeasts in Drosophila has not yet been studied in detail. Here, we explore the quantitative and qualitative composition of yeast component of the Drosophila microbiome in 11 laboratory lines of D. melanogaster and five food substrates inhabited by them. We find out that as the concentration of salt in the substrate increases, the yeast microbiome of Drosophila undergoes significant changes. The total abundance of yeasts changes nonlinearly; it is the lowest at 0% NaCl, the highest at 2-4%, intermediate at 7%. At a low salt concentration, the species *Pichia occidentalis* strongly predominates; at intermediate concentrations, the species diversity of yeasts increases while maintaining the same dominant: at 7%, a new dominant Starmerella bacillaris appears and the composition of minor components changes considerably. The results are consistent with the hypothesis that S. bacillaris may help the flies to withstand high NaCl concentrations at the early stages of adaptation, but later these useful symbionts can be lost as the genetic adaptations of insects (or other components of their microbiome) to salty food gradually develop.

УДК 595.422:595.799:571.6

## ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕЩЕЙ VARROA UNDERWOODI (ACARI: VARROIDAE) В ПОПУЛЯЦИИ APIS CERANA USSURIENSIS (HYMENOPTERA: APIDAE) В ПРИМОРСКОМ КРАЕ, РОССИЯ

© 2022 г. Р. А. Ильясов<sup>1, 2, 3,</sup> \*, Д. И. Такахаши<sup>4,</sup> \*\*, М. Л. Ли<sup>2</sup>, М. Ю. Прощалыкин<sup>5</sup>, А. С. Лелей<sup>5,</sup> \*\*\*, Х. В. Квон<sup>2,</sup> \*\*\*\*, В. Н. Даниленко<sup>1,</sup> \*\*\*\*, А. Г. Николенко<sup>3,</sup> \*\*\*\*\*

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН ул. Губкина, 3, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Инчхонский национальный университет, Отделение наук о жизни, специализация в области биологических наук, Центр исследований насекомых-переносчиков болезней

Академи-ро 119, Ёнсу-гу, Сонгдо-донг, Инчхон, 22012 Республика Корея

<sup>3</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН Просп. Октября, 71, Уфа, 450054 Россия

> <sup>4</sup>Университет Киото Сангё, факультет естественных наук Камигамо Мотояма, Кита Вард, Киото, 603-8555 Япония

<sup>5</sup>Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, ДВО РАН Просп. 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, 690022 Россия

\*E-mail: apismell@hotmail.com

\*\*E-mail: jit@cc.kyoto-su.ac.jp

\*\*\*E-mail: lelej@biosoil.ru

\*\*\*\*E-mail: hwkwon@inu.ac.kr

\*\*\*\*\*E-mail: valerid@vigg.ru

\*\*\*\*\*\*E-mail: a-nikolenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.08.2021 г. После доработки 05.10.2021 г. Принята к публикации 19.10.2021 г.

Виды рода Varroa являются эктопаразитическими клещами медоносных пчел рода Apis. В отличие от хорошо известных видов клещей V. destructor и V. jacobsoni, V. underwoodi остается мало изученным. Современный ареал V. underwoodi в популяции A. cerana включает Непал, Южную Корею, Японию, Малайзию, Индию, Индонезию, Папуа-Новую Гвинею, Вьетнам и Китай. Недавно он был найден в России (Приморский край) на A. cerana ussuriensis. Поскольку V. destructor и V. jacobsoni обладают способностью легко переходить на другие виды медоносных пчел, есть большая вероятность того, что V. underwoodi может в дальнейшем перейти в массовом порядке с A. cerana на A. mellifera. Первый случай паразитирования V. underwoodi в семьях пчел A. mellifera зафиксирован в Папуа-Новой Гвинее. Varroa underwoodi требует тщательного изучения, поскольку является новым потенциальным паразитом A. mellifera и способен принести с собой новые виды и штаммы вирусов и бактерий, изменить состав микробиома кишечника пчел, нарушить защитные и адаптивные механизмы их организма. В статье представлены данные морфометрии V. underwoodi и полиморфизма его гена COX1 мтДНК. Проведено сравнение V. underwoodi с другими видами клещей V. destructor и V. jacobsoni. Средняя генетическая дивергенция и р-дистанция между V. underwoodi и другими видами Varroa составляли 9% и 0.09 соответственно, что согласуется со средним уровнем видовых различий у насекомых. Нуклеотидные последовательности гена COX1 мтДНК V. underwoodi из Приморского края (Россия) LC532104 и провинции Цзилинь (Китай) МН205176 оказались идентичными и отнесены к гаплотипу China 1 MH205176. Предполагается, что между популяциями A. cerana России и Китая происходит непрерывный обмен, который привел к появлению V. underwoodi в природной популяции A. cerana ussuriensis в Приморском крае. Современная северная граница ареала V. underwoodi проходит по территории Дальнего Востока России и, вероятно, совпадает с таковой A. cerana ussuriensis (45.06° с.ш.). Вероятно, селекция семей пчел A. mellifera по гигиеническому поведению против клещей V. destructor может оказаться эффективной также против V. underwoodi и позволит предотвратить возможный переход V. underwoodi с азиатских пчел A. cerana на европейских пчел A. mellifera.

DOI: 10.31857/S0044459622010055

Паразитические клещи рода Varroa Oudemans, 1904 относятся к семейству Varroidae инфраотряда Gamasina отряда Mesostigmata надотряда Parasitiformes. Клещи р. Varroa являются эктопаразитами пчел р. Apis и представлены четырьмя видами (Anderson, Trueman, 2000; Rosenkranz et al., 2010): 1) V. jacobsoni, описанный с A. cerana (о-в Ява, Индонезия) (Oudemans, 1904), позднее найден и на A. nigrocincta в Индонезии (Hadisoesilo, Otis, 1998; Anderson, Trueman, 2000) и A. mellifera в Папуа-Новой Гвинее (Roberts et al., 2015); 2) V. destructor (первоначально ошибочно идентифицированный как V. jacobsoni) описан с A. cerana (Китай, Япония, Южная Корея, Таиланд), позднее найден и на A. mellifera в Японии (Anderson, 2000; Anderson, Trueman, 2000); 3) V. rindereri c A. koschevnikovi (Сабах, Малайзия) (Guzman, Delfinado-Baker, 1996), на других видах пчел пока не обнаружен; 4) V. underwoodi, описанный с A. cerana (Непал) (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987), позднее найден на A. nigrocincta в Индонезии (Anderson et al., 1997; Кузнецов, 2005).

Медоносная пчела *А. mellifera* поражается во всем мире преимущественно *V. destructor* (Traynor et al., 2020), а в Папуа-Новой Гвинее — *V. jacobsoni* (Roberts et al., 2015). Описано несколько митохондриальных гаплотипов *V. destructor*, из которых два — *K* (корейский) и *J* (японский) — способны размножаться и паразитировать в семьях *A. mellifera* (Anderson, 2000; Anderson, Trueman, 2000; Muñoz et al., 2008). Клещи *V. rindereri* и *V. underwoodi* в наименьшей степени изучены (Oudemans, 1904; Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987; Guzman, Delfinado-Baker, 1996; Anderson et al., 1997; Rath, 1999; Anderson, Trueman, 2000; Wang et al., 2019a).

Другой вид медоносной пчелы, A. cerana, поражается преимущественно клещом V. destructor и в меньшей степени V. underwoodi; последний встречается в меньшей численности (Wang et al., 2019a, b; Lin et al., 2021). Сравнительно недавно V. underwoodi выявлен и в России (Приморский край), описаны его морфометрия и полиморфизм гена *COX1* мтДНК в природной популяции *A. cerana* (Кузнецов, 2005; Кузнецов, Лелей, 2005; Ilyasov et al., 2021). Данные работы посвящены первому обнаружению V. underwoodi в природной популяции А. cerana в России, поэтому поверхностно и недостаточно детально обсуждают особенности эволюции и генетической структуры популяции V. underwoodi, не приводят детальный анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена COX1 мтДНК Varroa underwoodi из разных популяций, а также не характеризуют V. underwoodi как переносчика новых патогенов пчел – вирусов и бактерий. Существует необходимость в систематизации всех имеющихся знаний о клеще V. underwoodi, оценке возможных угроз V. underwoodi для других видов пчел р. Apis, на основе которых могут быть разработаны превентивные меры, направленные на предотвращение расширения ареала этого вида клеща в странах Азии и России.

Наряду с расширением ареала V. underwoodi растет число его видов-хозяев: A. cerana в Непале (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987), A. nuluensis в Малайзии (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987; Guzman et al., 1996; Anderson et al., 1997), A. nigrocincta в Индонезии (Anderson et al., 1997; Hadisoesilo, 1997), A. mellifera в Папуа-Новой Гвинее (Lee, 1995; Anderson et al., 1997; Guzman, Rinderer, 1999). Клещи V. underwoodi успешно размножаются в семьях пчел A. cerana, но обнаружение его в семьях других видов медоносных пчел позволяет предположить способность этих клещей к межвидовой смене хозяев. Особенно опасен он может быть для семей A. mellifera, содержащихся рядом с семьями A. cerana, как это принято в большинстве азиатских стран (Zheng et al., 2011, 2018; Chantawannakul et al., 2016; Wang et al., 2019a, b; Roberts et al., 2020).

Поскольку разные гаплотипы клещей Varroa имеют разную способность к паразитированию на разных видах пчел р. Apis (Anderson, 2000; Anderson, Trueman, 2000; Muñoz et al., 2008) (гаплотипы *К* и *J* из шести гаплотипов клещей *V. destructor* способны паразитировать на пчелах A. mellifera), то существует высокая вероятность того, что некоторые гаплотипы V. underwoodi смогут паразитировать на пчелах A. mellifera и затем, подобно V. destructor, распространиться по всему миру. V. underwoodi характеризуется высоким уровнем генетического разнообразия (Navajas et al., 2010; Roberts et al., 2015; Wang et al., 2019а). Высокий уровень генетического разнообразия этого вида позволяет быстро сформировать гаплотипы V. илderwoodi, способные паразитировать на A. mellifera. Это подтверждается и законом гомологических рядов Н.И. Вавилова (1920), согласно которому у близких форм могут параллельно развиваться сходные признаки и, таким образом, способность видов V. destructor и V. jacobsoni к паразитированию на A. mellifera может также проявляться и у V. underwoodi. Следовательно, А. mellifera является потенциальным хозяином для V. underwoodi в ходе его дальнейшей эволюшии (Anderson, 2000: Anderson, Trueman, 2000; Muñoz et al., 2008; Wang et al., 2019a, b; Ilyasov et al., 2021).

Переход V. underwoodi на нового хозяина A. mellifera может сопровождаться трансмиссией новых видов и штаммов вирусов и бактерий, провоцированием новых болезней, ведущих к нарушению микробиома, снижению выживаемости и иммунитета (Sandionigi et al., 2015; Hubert et al., 2017; Raymann et al., 2017; Diaz et al., 2019; Marche et al., 2019; Wang et al., 2019a, b; Bleau et al., 2020; Chen et al., 2021). Исследование особенностей V. underwoodi позволит заранее разработать методы борьбы с новым паразитом (Guzman, Rinderer, 1999; Kolar, Lodge, 2001; Woolhouse et al., 2005). Одним из таких методов является селекция семей пчел A. mellifera по гигиеническому поведению против клеща V. destructor, которая, вероятно, будет также работать и против клеща V. underwoodi (Mondragón et al., 2005; Allsopp, 2006; Locke, Fries, 2011; Cakmak, Fuchs, 2013; Locke, 2016; Conlon et al., 2018; McMullan, 2018; Alphen, Fernhout, 2020). В настояшей работе дана детальная характеристика клещей V. underwoodi в популяции A. cerana ussuriensis в Приморском крае на основе анализа морфометрии и полиморфизма гена СОХ1 мтДНК, систематизированы все имеющиеся знания о клеще V. underwoodi, проведена оценке возможных угроз V. underwoodi для других видов пчел р. Apis. в частности А. mellifera. предложены превентивные меры, направленные на предотвращение расширения ареала этого вида клеща в странах Азии и России.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Имаго клещей Varroa underwoodi собраны летом 2004 г. из выводковых ячеек двух семей № 2 и № 5 Apis cerana ussuriensis на пасеке в селе Ромашка Хасанского района Приморского края России (43.5° с.ш., 131.3° в.д.). Все собранные образцы клещей V. underwoodi были помещены в 70% этанол и хранились при -20°С.

Клещи *V. underwoodi* обнаружены только в семьях *A. cerana ussuriensis*, где уровень зараженности семей составлял 50%.

Для предварительного подтверждения видовой принадлежности морфометрические характеристики и размер взрослых самок клещей V. underwoodi (n = 10) сравнивали с литературными данными (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987; Woo, 1992; Anderson et al., 1997; Huang, 2004; Wang et al., 2019а). Перед оценкой морфометрии отобранные образцы клещей V. underwoodi высушивались при комнатной температуре в течение 1 мин. У клешей V. underwoodi для морфометрии использовался дорсальный щит с боковыми щетинками (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987; Woo, 1992; Anderson et al., 1997; Huang, 2004; Wang et al., 2019а). Измерение проводили с помощью цифрового микроскопа EOS Kiss X7 (Canon, Япония) с объективом MP-E 65mm f/2.8 1-5x Macro Photo (Canon, Япония) при увеличении ×150.

Тотальную ДНК экстрагировали из трех клещей на семью *A. cerana ussuriensis* с использованием набора Qiagen DNEasy для тканей животных с использованием колонок для связывания ДНК (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Последовательность гена *COX1* мтДНК использовали для идентификации вида клещей и определения гаплотипа мтДНК. ПЦР-амплификация гена *COX1* мтДНК *V. underwoodi* проведена по методике Вана и соавторов (Wang et al., 2019а) с использованием пары праймеров (*COX1\_*821\_F: 5'-GGAGTAGGTACAGGTTGAACGG-3' и *COX1\_*821\_R: 5'-ACAACCCCAGCAATAATAGCAA-3') с продуктом 821 п.н. (Wang et al., 2019а).

Все пролукты ПШР были очишены с помошью набора OIAquick PCR Purification Kit (250) (OIAGEN. Хильден, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Нуклеотидные последовательности гена COX1 мтДНК образцов V. underwoodi определяли путем двухстороннего секвенирования продуктов ПШР с использованием метода секвенирования Сэнгера (Sanger et al., 1977) и пары праймеров (F-V51: 5'-GTAATTTGTATACAAAGAGGG-3' и R-V1400: 5'-CAATATCAATAGAAGAATTAGC-3') (Warrit et al., 2004) на капиллярном секвенаторе ABI 3730xl (Applied Biosystems, Фостер-Сити, США) с помощью набора ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с инструкциями производителя. Нуклеотидная последовательность гена COX1 мтДНК V. underwoodi размером 458 п.н. загружена в базу данных Генбанка DDBJ/GenBank под регистрационным номером LC532104.

Последовательности гена *COX1* мтДНК *V. underwoodi* (МН205173 (Ханчжоу, Китай), МН205174 (Цзиньхуа, Китай), МН205175 (Наньчан, Китай), МН205176 (Цзилинь, Китай), МН205177 (Маомин, Китай)), *V. destructor* (КЈ403739, КЈ507740, КЈ403742, КЈ403744 (Эр-Рияд, Саудовская Аравия)) и *V. jacobsoni* (МF462134 (Порт-Морсби, Папуа-Новая Гвинея), АF010479 (Канберра, Австралия)) из Генбанка использованы для сравнительного анализа с *V. underwoodi* из Приморского края. Образцы клещей видов *V. destructor* и *V. jacobsoni* использованы также для сравнительного анализа в качестве внешних групп.

Уровень генетической дивергенции и р-дистанции между видами клещей V. underwoodi, V. destructor и V. jacobsoni оценивали на основе последовательностей гена СОХ1 мтДНК с применением метода выравнивания CLUSTALW в MEGA 10.0.5 (Kumar et al., 2018). Дендрограмма филогенетических отношений методом ближайшего соседа, основанная на р-дистанции последовательностей гена СОХ1 мтДНК построена с 2000 бутстрэп-репликациями в CLC Genomics Workbench 21 (Qiagen Inc., Миссиссога, Канада). Статистический анализ и анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) выполняли с использованием ARLEQUIN 3.5.2 (Excoffier, Lischer, 2010), STATISTICA 8.0 (StatSoft, США) и EXCEL 2010 (Microsoft, CIIIA).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Таксономическая принадлежность образцов клеща *V. underwoodi* определена с использованием данных морфометрии и полиморфизма гена



**Рис. 1.** Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *COX1* мтДНК клещей *Varroa underwoodi*, *V. de*structor и *V jacobsoni*.

СОХІ мтДНК. Эллипсоидальное тело самок V. илderwoodi каштаново-коричневое. Поверхность дорсального щита слегка бороздчатая, сетчатая, с густыми наклоненными шетинками примерно олинаковой ллины и небольшими шипиками. Боковые щетинки постепенно удлиняются кзади, последние три укорачиваются. Длина тела взрослой самки V. underwoodi 767.5  $\pm$  20.5 мкм (среднее значение ± стандартное отклонение), ширина  $1300.5 \pm 20.5$  мкм (n = 10). Для сравнения, длина и ширина тела взрослых самок V. underwoodi в семьях A. cerana - 700-752 мкм × 1089-1157 мкм (n = 15); в семьях A. mellifera – 700–735 мкм × × 1090-1120 мкм (n = 6); в семьях A. cerana (провинция Западное Папуа, Индонезия) – 690–730 мкм × × 1050–1130 мкм (n = 5); в семьях A. cerana (Сулавеси, Ява, Индонезия) - 720-780 мкм × 1050-1080 мкм (n = 2); в семьях A. nigrocincta (Сулавеси) — 740–760 мкм × 1120–1220 мкм (n = 5) (Anderson et al., 1997); в семьях A. cerana (Непал) – 741–780 мкм ×  $\times$  1151–1168 MKM (n = 2) (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987); в семьях A. cerana (Южная Корея) – 703– 784 MKM  $\times$  1135–1324 MKM (n = 2) (Woo, 1992). Морфологические параметры наших экземпляров соответствуют ранее опубликованным данным по V. underwoodi (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987; Anderson et al., 1997; Huang, 2004; Wang et al., 2019a).

Был проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *COX1* мтДНК видов клещей *V. underwoodi*, *V. destructor* и *V. jacob*- *soni*. Выровненные нуклеотидные последовательности гена *COX1* мтДНК позволяют рассчитать различия нуклеотидов в соответствующих позициях у разных образцов клещей (рис. 1).

Все различия между V. underwoodi, V. destructor и *V. jacobsoni* рассчитаны на основе полиморфизма последовательностей гена СОХІ мтДНК. В табл. 1 представлены усредненные попарные оценки числа нуклеотидных и аминокислотных замен, р-дистанции и процент генетической дивергенции на основе последовательностей гена СОХ1 мтДНК клещей V. underwoodi (LC532104 (Приморский край, Россия), МН205173 (Ханчжоу, Китай), МН205174 (Цзиньхуа, Китай), МН205175 (Нань-Китай), МН205176 (Цзилинь, Китай), чан, MH205177 (Маомин, Китай)), V. destructor (КЈ403739, КЈ507740, КЈ403742, КЈ403744 (Эр-Рияд, Саудовская Аравия)) и V. jacobsoni (MF462134 (Порт-Морсби, Папуа-Новая Гвинея), АF010479 (Канберра, Австралия)). Обнаружено, что нуклеотидные последовательности гена СОХ1 мтДНК образцов V. underwoodi LC532104 из Приморского края (Россия) идентичны МН205176 из провинции Цзилинь (Китай) (Wang et al., 2019а).

Последовательности гена *COX1* мтДНК видов клещей *V. underwoodi*, *V. destructor* и *V. jacobsoni* различаются на статистически значимом уровне (*p* ≤ 0.05). Нуклеотидная последовательность гена *COX1* мтДНК позволяет с 95%-й вероятностью различать виды клещей р. *Varroa*. Из трех видов клещей наиболее близки друг к другу *V. destructor* и *V. ja*-

		V. underwoodi	V. destructor	V. jacobsoni
	Виды Varroa	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 4	n = 2
		число нуклеотидных	замен/ число амино	кислотных замен
V. underwoodi			45/36	44/34
V. destructor	р-дистанция/тенетическая	* 0.099/10		33/26
V. jacobsoni		* 0.097/10	* 0.072/7	

Таблица 1. Оценка средних значений р-дистанции и генетической дивергенции (ниже диагонали) и замен нуклеотидов и аминокислот (выше диагонали) между видами клещей *Varroa* на основе последовательности гена *COX1* мтДНК

**Примечание:** \* статистически значимые различия ( $p \le 0.05$ ).

*cobsoni* со значением генетической дивергенции 7%. *V. underwoodi* равноудален от *V. destructor* и *V. jacobsoni* и отличается от них по значению генетической дивергенции 10%.

В табл. 2 представлены попарные генетические дистанции, генетическая дивергенция, число замен нуклеотидов и аминокислот между каждым образцом *V. underwoodi* (n = 6), *V. destructor* (n = 4) и *V. ja-cobsoni* (n = 2), рассчитанные на основе сравнения последовательностей гена *COX1* мтДНК.

Между образцами гена *СОХ1* мтДНК *V. under*woodi значения генетической дивергенции варьировали от 0 до 2%, р-дистанции – от 0.000 до 0.022, количества нуклеотидных замен — от 0 до 10, аминокислотных замен - от 0 до 8. Не наблюдалось генетических различий между образцами MH205176, V. underwoodi (Цзилинь, Китай) и LC532104, V. underwoodi (Приморский край, Россия), а также MH205175, V. underwoodi, (Наньчан, Китай) и MH205174, V. underwoodi (Цзиньхуа, Китай). Наименьшие генетические различия наблюдались между образцами MH205176, V. underwoodi (Цзилинь, Китай) и MH205175, V. underwoodi (Наньчан, Китай): LC532104. V. underwoodi (Приморский край, Россия) и MH205175, V. underwoodi (Наньчан, Китай); MH205176, V. underwoodi (Цзилинь, Китай) и MH205174, V. underwoodi (Цзиньхуа, Китай); LC532104, V. underwoodi (Приморский край, Россия) и МН205174, V. underwoodi (Цзиньхуа, Китай). Наибольшие генетические

различия наблюдались между МН205177 (Маомин, Китай) и остальными образцами *V. underwoodi*. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *COX1* мтДНК МН205176 (Цзилинь, Китай) и LC532104 (Приморский край, Россия) показывает отсутствие нуклеотидных замен между ними. Эти последовательности гена *COX1* мтДНК обозначены как гаплотип *China 1 MH205176* (рис. 2) (Ilyasov et al., 2021).

Между образцами *V. destructor* генетическая дивергенция варьировала от 0 до 1%, р-дистанция от 0.000 до 0.022, количество нуклеотидных замен от 0 до 4, а количество аминокислотных замен от 0 до 1. Наименьшие генетические различия наблюдались между образцами *V. destructor* КЈ403744 и КЈ403739 из Саудовской Аравии (Эр-Рияд). Не обнаружено генетических различий между образцами *V. destructor* КЈ403742 и КЈ403740 из Саудовской Аравии (Эр-Рияд), а также между образцами *V. jacobsoni* МГ462134 из Папуа-Новой Гвинеи (Порт-Морсби) и АF010479 из Австралии (Канберра).

Нами построена дендрограмма филогенетических отношений методом ближайшего соседа с 2000 бутстрэп репликациями на основе р-дистанций между последовательностями гена *COX1* мтДНК трех видов клещей *V. underwoodi*, *V. destructor*, *V. jacobsoni*. Последовательность гена *COX1* мтДНК LC532104 *V. underwoodi* из России (Приморский край) (гаплотип *China 1 MH205176*) объединена в





#### ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕЩЕЙ VARROA UNDERWOODI

Таблица 2. Попарные разл	( виниц	и генетичес	жая дивері	сэм килнэ:	кду видамі	и <i>Varroa</i> , рє	ассчитанны	ле на осно	омигоп эа	рфизма по	следовател	њностей ге	на СОХІ
Виды Varroa		<i>іроомләрип ү</i> '9LIS07HW 'I	<u>к пидекмооді</u> 5 <sup>.</sup> ГС235104'	<u>іроомләрип У</u> 'SLIS0ZHW <sup>·</sup> E	<i>іроомләрип У</i> Ԡ/IS07HW ՠ	<i>іроомләрип У</i> '£LIS0ZHW 'S	<i>іроомләрип у</i> 'LLIS07HW '9	7. KJ403744, 7. KJ403744,	Kl403742, Kl403742,	лозэплээр <sub>Х</sub> 6 <sup>.</sup> К1201/40 <sup>.</sup>	V. destructor 10. KJ403739,	II. ME462134, V. jacobsoni	12. AF010479, V jacobsoni
1					Число н.	уклеотиднь	JX 3AMEH / L	исло амин	окислотны	х замен			
1. MH205176, V. underwoodi,			0/0	1/1	1/1	2/2	10/8	44/36	46/36	46/36	44/35	44/34	4 /34
цзилинь, Китаи 2. LC532104, <i>Y. underwoodi</i> ,		0.000/0		1/1	1/1	2/2	10/8	44/36	46/36	46/36	44/35	44/34	44/34
Приморский край, Россия 3. MH205175, V. underwoodi,		0.002/0	0.002/0		0/0	1/1	10/8	45/37	47/37	47/37	45/36	45/35	45/35
Наньчан, Китай 4. МН205174, <i>V. underwoodi</i> , Пзиньхув, Китай	% 1	0.002/0	0.002/0	0.000/0		1/1	10/8	45/37	47/37	47/37	45/6	45/35	45/35
5. MH205173, <i>V. underwoodi</i> ,	зргенция	0.004/0	0.004/0	0.002/0	0.002/0		6/7	45/37	47/37	47/37	45/36	45/35	45/35
ланчжоу, китаи 6. MH205177, <i>V. underwoodi</i> , Маллин, Китой	аид квяс	0.022/2	0.022/2	0.022/2	0.022/2	0.020/2		42/36	44/36	44/36	42/35	44/36	44/36
7. KJ403744, V. destructor,	эгитэнэ	0.096/10	0.096/10	0.098/10	0.098/10	0.098/10	0.092/9		4/2	4/2	2/1	32/27	32/27
Саудовская Аравия 8. К.J403742, <i>V. destructor</i> , Саупокская Апавия	т\киµньт	0.100/10	0.100/10	0.103/10	0.103/10	0.103/10	0.096/10	0.009/1		0/0	4/1	34/27	34/27
9. К1507740, <i>V. destructor</i> , Сауловская Аравия	эид-д	0.100/10	0.100/10	0.103/0	0.103/10	0.103/10	0.096/10	0.009/1	0/000/0		4/1	34/27	34/27
10. К.1403739, V. destructor, Самповская Апавия		0.096/10	0.096/10	0.098/10	0.098/10	0.098/10	0.092/9	0.004/1	0.009/1	0.009/1		32/26	32/26
11. МF462134 <i>V. jacobsoni</i> , Папуа-Новая Гвинея		0.096/10	0.096/10	0.098/10	0.098/10	0.098/10	0.096/10	0.070/7	0.074/7	0.074/7	0.070/7		0/0
12. АF010479, V. jacobsoni, Австралия		0.096/10	0.096/10	0.098/10	0.098/10	0.098/10	0.096/10	0.070/7	0.074/7	0.074/7	0.070/7	0/000.0	



**Рис. 3.** Дендрограмма филогенетических отношений методом ближайшего соседа с 2000 бутстрэп-репликациями на основе р-дистанций между последовательностями гена *COX1* мтДНК трех видов *Varroa*. Цифры на каждой ветви указывают генетические дистанции.

один кластер со всеми последовательностями представителей *V. underwoodi* MH205173, MH205174, MH205176, MH205177 из Китая. Отдельными кластерами располагаются последовательности *COX1* мтДНК представителей *V. destructor* KJ403739, KJ403742, KJ403742, KJ403742 (Эр-Рияд, Саудовская Аравия) и представителей *V. jacobsoni* MF462134 (Порт-Морсби, Папуа-Новая Гвинея), AF010479 (Канберра, Австралия) (рис. 3).

На дендрограмме филогенетических отношений в кластере *V. underwoodi* образец LC532104 (Приморский край, Россия) располагается наиболее близко к самому северному образцу MH205176 (Цзилинь, Китай), находящемуся на удалении 450 км, а наиболее удаленно – от самого южного образца MH205177 (Маомин, Китай), находящегося на удалении 3000 км. Кластер *V. underwoodi* генетически ближе к кластеру *V. destructor*, чем к кластеру *V. jacobsoni*. Южный образец MH205177 *V. underwoodi* (Маомин, Китай) наиболее удален от остальных образцов *V. underwoodi* и ближе к кластеру *V. destructor* (рис. 3).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Клещ Varroa underwoodi, вероятно, произошел из южных регионов Азии, а позже распространился на север в результате совместной миграции с пчелами Apis cerana. Предыдущие исследования, основанные на изучении морфологии и гена СОХІ мтДНК, показали паразитирование клеща V. underwoodi в семьях пчел А. cerana в Непале (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987), Южной Корее (Woo, 1992; Кузнецов, 2005; Chantawannakul et al., 2016), Индонезии (Anderson et al., 1997; Chantawannakul et al., 2016), Папуа-Новой Гвинее (Lee, 1995; Anderson et al., 1997; Chantawannakul et al., 2016), Китае (Huang, 2004; Wang et al., 2019а), Вьетнаме и Японии (Guzman, Rinderer, 1999; Chantawannakul et al., 2016). Сравнительно недавно V. underwoodi выявлен и в России (Приморский край) (Кузнецов, 2005; Кузнецов, Лелей, 2005; Ilyasov et al., 2021). Нами показано распространение V. underwoodi на Дальнем Востоке России в семьях пчел A. cerana ussuriensis с использованием методов морфометрии и секвенирования митохондриального гена СОХ1 мтДНК (рис. 1, 2) (Ilyasov et al., 2021). Место обнаружения V. under*woodi* в Приморье находится на удалении 450 км от места обнаружения этого вида в Северном Китае (Ilyasov et al., 2021). По результатам сравнительного анализа гена *COX1* мтДНК (рис. 3) все образцы *V. underwoodi* объединяются в один кластер, кроме образца MH205177 (Маомин, Китай), который группируется отдельно (рис. 3). Вероятно, данный образец следует отнести к новому подвиду *V. underwoodi* или даже новому виду в р. *Varroa*, что может выясниться после дополнительного специального исследования.

Клещи V. underwoodi, вероятно, всегда встречались в небольшом количестве в природной популяции диких пчел A. cerana, обитающих в дуплах деревьев в Приморском крае в России. В ульях А. cerana условия для размножения V. underwoodi оказались более благоприятными, чем в бортях в дуплах деревьев, что привело к возрастанию численности клещей на пасеках. По данным В.Н. Кузнецова (2005), в 2002 г. в трутневом расплоде A. cerana на пасеке клещи V. underwoodi обнаружены только один раз, но в 2004 г. наблюдалось массовое размножение V. underwoodi. В 2004 г. расплод трутней на пасеке был заражен клещами *V. underwoodi* на 2.8% в июне, на 35% в июле и на 58% в августе, а рабочие пчелы были заражены только на 1%. Следует отметить, что отдельные трутневые ячейки *А. сегапа* содержали до 5–6 имаго и 2-3 нимфы V. underwoodi. Имаго и нимфы V. underwoodi обнаружены на куколках трутней A. cerana и редко наблюдались в выводке рабочих пчел. Самки V. underwoodi в основном встречались на молодых трутнях и очень редко на молодых рабочих пчелах A. cerana. Летом 2004 г. до 16% молодых трутней были заражены клещами V. underwoodi, но осенью клещи у взрослых пчел отсутствовали. Возможно, что большое количество клещей на расплоде пчел способствовало активному роению семей А. cerana для очистки семьи пчел от клешей. В 2004 г. наблюдалось частое роение семей A. cerana на пасеке, сильно пораженной клещами V. underwoodi (Кузнецов, 2005). Сейчас в России пчелы А. cerana не разводятся в специальных ульях на пасеках для получения меда. Этот вид медоносной пчелы сохранился на Дальнем Востоке России в диком состоянии и обитает в лесах в дуплах деревьев.

Уровень заражения пчел клещами *V. underwoodi* значительно выше в северных провинциях Китая, чем в южных (Wang et al., 2019а). Это связано с тем, что массовое размножение клещей происходит в семьях пчел, выращивающих расплод в зимний безоблетный период. На более высокий уровень заражения *V. underwoodi* в Северной Азии влияет время выращивания расплода трутней, которое немного короче в холодном климате (Wang et al., 2019а). Идентичность последовательностей гена *COX1* мтДНК *V. underwoodi* из Приморского края (Россия) LC532104 и провинции Цзилинь

(Китай) MH205176 позволяет предположить, что гаплотип *China 1 MH205176 V. underwoodi* является адаптированным к паразитированию на пчелах *A. cerana*, обитающих в холодном климате Северной Азии. Возможно, что дальневосточный регион заселен единой популяцией *V. underwoodi* гаплотипа *China 1 MH205176*, распространенной на обширной территории Северной Азии в результате миграции семей *A. cerana* (Traynor et al., 2020; Ilyasov et al., 2021).

Клещи Varroa, собранные в Приморском крае (Россия), идентифицированы как V. underwoodi на основании их морфометрии, которая находится в диапазоне ранее описанных популяций этого вида (Delfinado-Baker, Aggarwal, 1987; Anderson et al., 1997; Huang, 2004; Wang et al., 2019а), а также последовательности гена СОХІ мтДНК, который был идентичен с образцом МН205176 из провинции Цзилинь (Китай) (табл. 2, рис. 2) (Wang et al., 2019а; Ilyasov et al., 2021). Длина и ширина тела взрослых самок V. underwoodi из Приморского края немного больше, чем у представителей этого вида из южных популяций, что можно объяснить его северным распространением. Скорость молекулярной эволюции у видов клещей р. Varroa очень низкая, а их геномы более консервативны, чем геномы их видов-хозяев пчел р. *Apis* (Ilvasov et al., 2021). Эти генетические особенности представителей V. underwoodi из удаленных друг от друга регионов Дальнего Востока России и Северного Китая можно объяснить паразитическим образом жизни внутри семей A. cerana. Аналогичным образом можно объяснить отсутствие различий между образцами V. destructor из отдаленных регионов Саудовской Аравии, с одной стороны, и Папуа-Новой Гвинеи и Австралии – с другой.

Средний уровень генетической дивергенции между V. destructor и V. jacobsoni в данной работе (7%) очень близок к таковой (6%) между V. destructor из семи стран (Южная Корея, Франция, Вьетнам, Китай, Япония, Непал, Шри Ланка) и V. jacobsoni из четырех стран (Индонезия, Малайзия, Лаос, Папуа-Новая Гвинея) (табл. 1) (Techer et al., 2019). Средняя генетическая дивергенция между тремя вилами клешей V. underwoodi, V. destructor и V. jacobsoni по нуклеотидной последовательности гена СОХІ мтДНК варьирует в диапазоне от 7 до 10%, а р-дистанция — от 0.072 до 0.099. Это согласуется с диапазоном генетических различий между видами насекомых (8-17% и 0.100-0.200 соответственно) (Tan et al., 2007; Han et al., 2016; Eimanifar et al., 2017; Ilyasov et al., 2018, 2019).

Наличие клещей *V. underwoodi* в закрытых ячейках расплода рабочих в одной семье *A. mellifera* в Папуа-Новой Гвинее (Roberts et al., 2015) показывает, что может произойти межвидовая смена хозяина и переход *V. underwoodi* с *A. cerana* на *A. mellifera*. В настоящее время *V. underwoodi* не выявлен в массовом порядке на пасеках в семьях А. mellifera на Дальнем Востоке России. Однако миграция A. cerana между Россией и Китаем может привести к появлению на Дальнем Востоке России новых гаплотипов V. underwoodi из Китая, способных к паразитированию в семьях A. mellifera. Клещ V. underwoodi генетически близок к V. destructor, который является обычным паразитом как A. mellifera, так и A. cerana, поэтому весьма вероятен переход V. underwoodi на A. mellifera (Roberts et al., 2020). Надо быть готовым к появлению у пчел A. mellifera нового паразита V. underwoodi с разрушительными эффектами для популяции (Anderson, 2000; Anderson, Trueman, 2000; Muñoz et al., 2008; Rosenkranz et al., 2010; Roberts et al., 2015; Wang et al., 2019a; Ilyasov et al., 2021).

Разрушительные эффекты для пчел A. mellifera могут быть вызваны больше не самими клещами, а трансмиссией новых, не характерных для данного вида патогенов – вирусов и бактерий. Паразитические клещи V. destructor и V. underwoodi имеют различный видовой состав микробиома кишечника и могут быть переносчиками разных видов вирусов (восемь РНК-вирусов и один ДНК-вирус) (Sandionigi et al., 2015; Wang et al., 2019b; Sacca, Lodesani, 2020; Chen et al., 2021). В популяции A. cerana клещи V. destructor переносят вирусы DWV, IAPV, BQCV, KBV, CBPV, SBV и AmFV, a V. underwoodi переносят вирусы DWV, CBPV, AmFV, BQCV, IAPV и KBV (Wang et al., 2019b; Chen et al., 2021). Кроме того, один и тот же вирус имеет разное действие на разные виды пчел. Так, вирус мешотчатого расплода Korean Sacbrood Virus (kSBV) уничтожил 95% популяции А. cerana и не был вирулентен для популяции A. mellifera (Choi et al., 2010; Koetz, 2013; Vung et al., 2017; Wang et al., 2019b). В семьях пчел А. mellifera, инфицированных паразитическим клещом V. destructor, наблюдается повышенное количество бактерий Snodgrassella alvi и уменьшение количества бактерий сем. Lactobacillaceae в кишечнике рабочих особей (Hubert et al., 2017; Marche et al., 2019; Bleau et al., 2020). Микробиом пораженных клещом личинок становится сходным с микробиомом V. destructor, что свидетельствует об обмене микробиомом кишечника между пчелой и эктопаразитическим клещом (Sandionigi et al., 2015). Искусственное заражение пчел патогенной микроспоридией Nosema сегапае также изменяет состав микробиома кишечника и провоцирует рост численности бактерии Gilliamella apicola (Rubanov et al., 2019). Заражение паразитическим клешом *V. destructor* является более важным фактором нарушения и изменения состава микробиома кишечника взрослых пчел A. mellifera, чем заражение микроспоридиями N. ceranae, N. apis и трипаносомой Lotmaria passim (Hubert et al., 2017). Для борьбы с этими паразитами пчеловоды часто используют химические вещества, такие как фумагиллин (против Nosema

spp.) и щавелевую кислоту (против *V. destructor*), которые, в свою очередь, уменьшают разнообразие и численность бактерий микробиома кишечника *A. mellifera* (Raymann et al., 2017; Diaz et al., 2019). Такие изменения микробиома кишечника пчел могут негативно влиять на физиологию, иммунитет, выживаемость и адаптацию к условиям окружающей среды (Bleau et al., 2020; Sacca, Lodesani, 2020; Ильясов и др., 2021).

Для борьбы с распространением V. destructor и предотвращения потенциального перехода V. underwoodi возможно применять селекции пчел по гигиеническому поведению, устойчивых к паразитированию клещами Varroa spp. Сейчас в мире существует девять устойчивых к клещу V. destructor популяций медоносной пчелы A. mellifera, которые были получены путем целенаправленной селекции: 1) популяция медоносных пчел северного графства Дублин в Ирландии; 2) популяция медоносных пчел подвида А. m. scutellata в Бразилии и Южной Африке; 3) популяция медоносных пчел в Тулузе во Франции; 4) популяция медоносных пчел на острове Фернандо де Норонья в Бразилии; 5) приморская популяция медоносных пчел в Приморском крае России; 6) популяция медоносных пчел Готланд в Швеции; 7) популяция медоносных пчел Авиньон во Франции; 8) популяция медоносных пчел Арнотского леса в Итаке в штате Нью-Йорк США; 9) популяция медоносных пчел на острове Мармара в Турции (Mondragón et al., 2005; Allsopp, 2006; Locke, Fries, 2011; Çakmak, Fuchs, 2013; Locke, 2016; Conlon et al., 2018; McMullan, 2018; Alphen, Fernhout, 2020). Селекция семей медоносных пчел по гигиеническому поведению на устойчивость к клещу V. destructor позволит использовать меньше акарицидов и предотвратить нарушения микробиома кишечника, обеспечиваюшего зашитную функцию организма и играющего важную роль в иммунитете и адаптации пчел к условиям окружающей среды (Çakmak, Fuchs, 2013). Селекция семей пчел по гигиеническому поведению против клеща V. destructor может также оказаться эффективной против клеща V. underwoodi.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До недавнего времени известный ареал клещей Varroa underwoodi охватывал практически все страны, где встречается медоносная пчела Apis cerana, включая и Дальний Восток России. Идентичность последовательностей гена COX1 у экземпляров V. underwoodi из Северного Китая и Приморского края России, удаленных между собой на 450 км, указывает на возможную свободную миграцию A. cerana и расселению паразита, а также на низкую скорость молекулярной эволюции генома V. underwoodi в результате паразитического образа жизни. Хотя северные границы аре-

ала V. underwoodi еще не исследованы, но в 2020 г. образцы A. cerana ussuriensis собраны в районе села Терней Приморского края (45.06° с.ш., 136.61° в.д.), северной границе ареала данного вида пчел. Возможно, таким образом, что северная граница ареала клеща V. underwoodi будет совпадать с северной границей ареала A. cerana. В дальнейшем планируется охарактеризовать популяцию V. underwoodi с помошью дополнительных маркеров СОХЗ. АТР6 и СҮТВ. которые позволят найти генетические различия между российскими и китайскими образцами V. underwoodi и выявить его биогеографические связи. Медоносная пчела A. mellifera может стать новым хозяином для паразитического клеща V. underwoodi, поскольку он широко встречается в семьях А. cerana, находящихся рядом с семьями A. mellifera. Возможный переход клеща V. underwoodi на нового хозяина A. mellifera может сопровождаться трансмиссией новых видов и штаммов вирусов и бактерий, изменением микробиома кишечника, подавлением иммунитета и адаптации к изменяющимся климатическим условиям. Селекция семей медоносных пчел по гигиеническому поведению на устойчивость к клещу V. destructor может стать эффективной защитой от перехода близкородственного клеща V. underwoodi с A. cerana на A. mellifera.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Т.Ф. Долмацкой и В.Е. Гохману за рецензию и ревизию статьи.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке государственного задания (регистрационный номер АААА-А21-121011990120-7) – И.Р., грантов Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (грант № 19-54-70002 e-Asia\_t) – Н.А. и Программы постдокторских исследований в Инчхонском национальном университете (2017–2019 гг.) – И.Р.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов какихлибо исследований с использованием теплокровных животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Вавилов Н.И., 1920. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости // Тр. 3-го Всеросс. съезда по селекции и семеноводству. Саратов: Губполиграфотдел, 3-е отд. С. 41–56.

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ том 83 № 1 2022

- Ильясов Р.А., Марсова М.В., Ковтун А.С., Ватлин А.А., Юнес Р.А. и др., 2021. Роль микробиома кишечника медоносных пчел // Пчеловодство. № 7. С. 18–20.
- Кузнецов В.Н., 2005. Китайская восковая пчела Apis cerana cerana F. (Hymenoptera, Apidae) на Дальнем Востоке России. М.: Т-во науч. изд. КМК. 112 с.
- Кузнецов В.Н., Лелей А.С., 2005. О паразитировании клещей рода Varroa Oudemans, 1904 (Acari: Varroidae) на китайской восковой пчеле Apis cerana cerana Fabricius, 1793 (Hymenoptera: Apidae) в Приморском крае // Чтения памяти А.И. Куренцова. № 16. С. 39–46.
- *Allsopp M.H.*, 2006. Analysis of *Varroa destructor* infestation of Southern African honeybee populations. MSc dissertation. Pretoria: Univ. Pretoria. 285 p.
- Alphen J.J.M., van, Fernhout B.J., 2020. Natural selection, selective breeding, and the evolution of resistance of honeybees (*Apis mellifera*) against *Varroa* // Zool. Lett. V. 6.

https://doi.org/10.1186/s40851-020-00158-4

- Anderson D.L., 2000. Variation in the parasitic bee mite Varroa jacobsoni Oud. // Apidologie. V. 31. № 2. P. 281–292.
- Anderson D.L., Trueman J.W., 2000. Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species // Exp. Appl. Acarol. V. 24. № 3. P. 165–189.
- Anderson D.L., Halliday R.B., Otis G.W., 1997. The occurrence of Varroa underwoodi (Acarina: Varroidae) in Papua New Guinea and Indonesia // Apidologie. V. 28. № 3–4. P. 143–147.
- Bleau N., Bouslama S., Giovenazzo P., Derome N., 2020. Dynamics of the honeybee (*Apis mellifera*) gut microbiota throughout the overwintering period in Canada // Microorganisms. V. 8. № 8. https://doi.org/10.3390/microorganisms8081146
- Çakmak I., Fuchs S., 2013. Exploring a treatment strategy for long-term increase of Varroa tolerance on Marmara Island, Turkey // J. Apic. Res. V. 52. № 5. P. 242–250.
- Chantawannakul P., Guzman L.I., de, Li J., Williams G.R., 2016. Parasites, pathogens, and pests of honeybees in Asia // Apidologie. V. 47. P. 301–324.
- *Chen G., Wang S., Jia S., Feng Y., Hu F. et al.*, 2021. A new strain of virus discovered in China specific to the parasitic mite *Varroa destructor* poses a potential threat to honey bees // Viruses. V. 13. https://doi.org/10.3390/v13040679
- Choi Y.S., Lee M.Y., Hong I.P., Kim N.S., Kim H.K., et al., 2010. Occurrence of sacbrood virus in Korean apiaries from Apis cerana (Hymenoptera: Apidae) // J. Apic. V. 25. P. 187–191.
- Conlon B.H., Frey E., Rosenkranz P., Locke B., Moritz R.F.A., Routtu J., 2018. The role of epistatic interactions underpinning resistance to parasitic Varroa mites in haploid honey bee (Apis mellifera) drones // J. Evol. Biol. V. 31. № 6. P. 801–809.
- *Delfinado-Baker M., Aggarwal K.*, 1987. A new *Varroa* (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae) // Int. J. Acarology. V. 13. № 4. P. 233–237.
- Diaz T., Del-Val E., Ayala R., Larsen J., 2019. Alterations in honey bee gut microorganisms caused by Nosema spp. and pest control methods // Pest Manag. Sci. V. 75. № 3. P. 835–843.

- Eimanifar A., Kimball R.T., Braun E.L., Moustafa D.M., Haddad N. et al., 2017. The complete mitochondrial genome of the Egyptian honey bee, Apis mellifera lamarckii (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA B Resour. V. 2. № 1. P. 270–272.
- Excoffier L., Lischer H.E., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resour. V. 10. № 3. P. 564–567.
- Hadisoesilo S., 1997. A comparative study of two species of cavity-nesting honey bees of Sulawesi, Indonesia. PhD thesis. Guelph: The Univ. Guelph. 199 p.
- Hadisoesilo S., Otis G.W., 1998. Differences in drone cappings of *Apis cerana* and *Apis nigrocincta* // J. Apic. Res. V. 37. № 1. P. 11–15.
- Han T., Lee W., Lee S., Park I.G., Park H., 2016. Reassessment of species diversity of the subfamily Denticollinae (Coleoptera: Elateridae) through DNA barcoding // PLoS One. V. 11. № 2. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148602
- Huang S., 2004. The main kinds of honeybee ectoparasitic mites and the first found of *Varroa underwoodi* in China // Apic. China. V. 55. P. 6. (In Chinese).
- Hubert J., Bicianova M., Ledvinka O., Kamler M., Lester P.J. et al., 2017. Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite Varroa destructor, and pathogens Nosema and Lotmaria passim // Microb. Ecol. V. 73. № 3. P. 685–698.
- Guzman L.I., de, Delfinado-Baker M., 1996. A new species of Varroa (Acari: Varroidae) associated with Apis koschevnikovi (Apidae: Hymenoptera) in Borneo // Int. J. Acarology. V. 22. № 1. P. 23–27.
- Guzman L.I., de, Rinderer T.E., 1999. Identification and comparison of Varroa species infesting honey bees // Apidologie. V. 30. № 2–3. P. 85–95.
- Guzman L.I., de, Rinderer T.E., Delatte G.T., Macchiavelli R.E., 1996. Varroa jacobsoni Oudemans tolerance in selected stocks of Apis mellifera L. // Apidologie. V. 27. № 4. P. 193–210.
- *Ilyasov R.A., Park J., Takahashi J., Kwon H.W.*, 2018. Phylogenetic uniqueness of honeybee *Apis cerana* from the Korean peninsula inferred from the mitochondrial, nuclear, and morphological data // J. Apic. Sci. V. 62. Nº 2. P. 189–214.
- Ilyasov R.A., Han G.Y., Lee M.-L., Kim K.W., Proshchalykin M.Y. et al., 2019. Phylogenetic relationships of Russian Far-East *Apis cerana* with other North Asian populations // J. Apic. Sci. V. 63. № 2. P. 289–314.
- Ilyasov R.A., Takahashi J.I., Proshchalykin M.Y., Lelej A.S., Lee M.L. et al., 2021. First evidence of presence of Varroa underwoodi mites on native Apis cerana colonies in Primorsky Territory of Russia based on COX1 gene // J. Apic. Sci. V. 65. № 1. P. 177–186.
- *Koetz A.H.*, 2013. Ecology, behaviour and control of *Apis cerana* with a focus on relevance to the Australian incursion // Insects. V. 4. P. 558–592.
- Kolar C.S., Lodge D.M., 2001. Predicting invaders: Response from Kolar and Lodge // Trends Ecol. Evol. V. 16. № 10. P. 546.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis

across computing platforms // Mol. Biol. Evol. V. 35. No 6. P. 1547–1549.

- Lee B., 1995. Mites, bees, and plagues that are and might be // Partners Res. Dev. № 8. P. 2–9.
- Lin Z., Wang S., Neumann P., Chen G., Page P. et al., 2021. Population genetics and host specificity of Varroa destructor mites infesting eastern and western honeybees // J. Pest Sci. V. 94. № 4. P. 1487–1504.
- Locke B., 2016. Natural Varroa mite-surviving Apis mellifera honeybee populations // Apidologie. V. 47. № 3. P. 467–482.
- Locke B., Fries I., 2011. Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving Varroa destructor infestation // Apidologie. V. 42. № 4. P. 533–542.
- Marche M.G., Satta A., Floris I., Pusceddu M., Buffa F., Ruiu L., 2019. Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from Varroa-infested colonies // J. Apic. Res. V. 58. № 3. P. 444–454.
- *McMullan J.*, 2018. Adaptation in honey bee (*Apis mellifera*) colonies exhibiting tolerance to *Varroa destructor* in Ireland // Bee World. V. 95. № 2. P. 39–43.
- Mondragón L., Spivak M., Vandame R., 2005. A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite Varroa destructor over one year in Mexico // Apidologie. V. 36. № 3. P. 345–358.
- Muñoz I., Dall'Olio R., Lodesani M., De La Rúa P., 2008. Sequence variation in the mitochondrial tRNAleu-COX2 intergenic region of African and African-derived honey bee populations // EurBee 3. 3rd European Conference of Apidology. Belfast: Queens Univ. P. 73.
- Navajas M., Anderson D.L., Guzman L.I., de, Huang Z.Y., Clement J. et al., 2010. New Asian types of Varroa destructor: A potential new threat for world apiculture // Apidologie. V. 41. P. 181–193.
- Oudemans A.C., 1904. On a new genus and species of parasitic Acari // Notes from the Leyden Museum. V. 24. P. 216–222.
- Rath W., 1999. Co-adaptation of Apis cerana Fabr. and Varroa jacobsoni Oud. // Apidologie. V. 30. № 2–3. P. 97–110.
- Raymann K., Shaffer Z., Moran N.A., 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees // PLoS Biol. V. 15. № 3. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001861
- Roberts J.M., Anderson D.L., Tay W.T., 2015. Multiple host shifts by the emerging honeybee parasite, Varroa jacobsoni // Mol. Ecol. V. 24. № 10. P. 2379–2391.
- Roberts J.M.K., Schouten C.N., Sengere R.W., Jave J., Lloyd D., 2020. Effectiveness of control strategies for Varroa jacobsoni and Tropilaelaps mercedesae in Papua New Guinea // Exp. Appl. Acarol. V. 80. № 3. P. 399–407.
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B., 2010. Biology and control of Varroa destructor // J. Invert. Pathol. V. 103. Suppl. 1. P. 96–119.
- Rubanov A., Russell K.A., Rothman J.A., Nieh J.C., McFrederick Q.S., 2019. Intensity of Nosema ceranae infection is associated with specific honey bee gut bacteria and weakly associated with gut microbiome structure // Sci. Rep. V. 9.
  - https://doi.org/10.1038/s41598-019-40347-6
- Sacca M.L., Lodesani M., 2020. Isolation of bacterial microbiota associated to honey bees and evaluation of po-

tential biocontrol agents of *Varroa destructor* // Benef. Microbes. V. 11. № 7. P. 641–654.

- Sandionigi A., Vicario S., Prosdocimi E.M., Galimberti A., Ferri E. et al., 2015. Towards a better understanding of Apis mellifera and Varroa destructor microbiomes: Introducing 'phyloh' as a novel phylogenetic diversity analysis tool // Mol. Ecol. Resour. V. 15. № 4. P. 697– 710.
- Sanger F, Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
- Tan K., Warrit N., Smith D.R., 2007. Mitochondrial DNA diversity of Chinese Apis cerana // Apidologie. V. 38. P. 238–246.
- Techer M.A., Rane R.V., Grau M.L., Roberts J.M.K., Sullivan S. T. et al., 2019. Divergent evolutionary trajectories following speciation in two ectoparasitic honey bee mites // Commun. Biol. V. 2. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0606-0

Traynor K.S., Mondet F., Miranda J.R., de, Techer M., Kow-

- allik V. et al., 2020. Varroa destructor: A complex parasite, crippling honey bees worldwide // Trends Parasitol. V. 36. № 7. P. 592–606.
- Vung N.N., Lee M.-L., Lee M.-Y., Kim H.K., Kang E.J. et al., 2017. Breeding and selection for resistance to Sacbrood Virus for Apis cerana // J. Apic. V. 32. № 4. P. 345–352.

Wang S., Chen G., Lin Z., Wu Y., Hu F. et al., 2019a. Occurrence of multiple honeybee viruses in the ectoparasitic mites Varroa spp. in Apis cerana colonies // J. Invertebr. Pathol. V. 166. https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107225

Wang S., Lin Z., Dietemann V., Neumann P., Wu Y. et al., 2019b. Ectoparasitic mites Varroa underwoodi (Acarina: Varroidae) in eastern honeybees, but not in western honeybees // J. Econom. Ent. V. 112. № 1. P. 25–32.

- Warrit N., Hagen T.A.R., Smith D.R., Çakmak I., 2004. A survey of Varroa destructor strains on Apis mellifera in Turkey // J. Apic. Res. V. 43. № 4. P. 190–191.
- *Woo K.S.*, 1992. New honeybee mite *Varroa underwoodi* on *Apis cerana* in South Korea // Honeybee Sci. V. 13. P. 173–174. (in Japanese).
- Woolhouse M.E., Haydon D.T., Antia R., 2005. Emerging pathogens: The epidemiology and evolution of species jumps // Trends Ecol. Evol. V. 20. № 5. P. 238–244.
- Zheng H.-Q., Wei W.-T., Hu F.-L., 2011. Beekeeping industry in China // Bee World. V. 88. P. 41–44.
- Zheng H., Cao L., Huang S., Neumann P., Hu F., 2018. Current status of the beekeeping industry in China // Asian Beekeeping in the 21st Century. Heidelberg: Springer-Verlag. P. 129–158.

### Characteristics of *Varroa underwoodi* mites (Acari: Varroidae) in the population of *Apis cerana ussuriensis* (Hymenoptera: Apidae) in the Primorsky Krai of Russia

R. A. Ilyasov<sup>*a*, *b*, *c*, \*, J. I. Takahashi<sup>*d*, \*\*</sup>, M. L. Lee<sup>*b*</sup>, M. Yu. Proshchalykin<sup>*e*</sup>, A. S. Lelej<sup>*e*, \*\*\*</sup>, H. W. Kwon<sup>*b*, \*\*\*\*</sup>, V. N. Danilenko<sup>*a*, \*\*\*\*\*</sup>, and A. G. Nikolenko<sup>*c*, \*\*\*\*\*\*</sup></sup>

<sup>a</sup>Vavilov Institute of General Genetics, RAS

Gubkina, 3, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup>Incheon National University, Division of Life Sciences, Major of Biological Sciences, and Convergence

Research Center for Insect Vectors

Academy-ro 119, Yeonsu-gu, Songdo-dong, Incheon, 22012 Republic of Korea

<sup>c</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre of RAS

Prosp. Oktyabrya, 71, Ufa, 450054 Russia

<sup>d</sup>Kyoto Sangyo University, Faculty of Life Sciences

Kamigamo Motoyama, Kita Ward, Kyoto, 603-8555 Japan

<sup>e</sup>Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of RAS

Prosp. 100 years of Vladivostok, 159, Vladivostok, 690022 Russia

\*e-mail: apismell@hotmail.com

\*\*e-mail: jit@cc.kyoto-su.ac.jp

\*\*\*e-mail: lelej@biosoil.ru

\*\*\*\*e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

\*\*\*\*\*e-mail: valerid@vigg.ru

\*\*\*\*\*\*e-mail: a-nikolenko@yandex.ru

Species of the genus *Varroa* are ectoparasitic mites of the *Apis* honey bees. Unlike the well-known species of mites *V. destructor* and *V. jacobsoni*, *V. underwoodi* is still poorly studied. According to foreign publications, the currently recognized distribution of *V. underwoodi* in the *A. cerana* population includes Nepal, South Korea, Japan, Malaysia, India, Indonesia, Papua New Guinea, Vietnam, and China. Recently it was discovered in the Russia (Primorsky Krai) on the honey bees *A. cerana ussuriensis*. Since *V. destructor* and *V. jacobsoni* have the ability to easily switch to other bee species, there is a possibility that later *V. underwoodi* may also extensively switch from Asian honey bees *A. cerana* to European honey bees *A. mellifera*. The first case of *V. underwoodi* requires careful study, since it is a new potential parasite of honey bees *A. mellifera*, which can also bring

#### ИЛЬЯСОВ и др.

new species and strains of viruses and bacteria, change the composition of the gut microbiome, and disrupt the protective and adaptive mechanisms of the bees. The article presents the data on morphometry and polymorphism of the gene *COX1* of mtDNA. *Varroa underwoodi* was compared with other mite species *V. destructor* and *V. jacobsoni*. The mean genetic divergence and p-distance between *V. underwoodi* and other *Varroa* species were 9% and 0.09, respectively, which are consistent with the level of species differences in insects. The nucleotide sequences of the gene *COX1* of mtDNA of *V. underwoodi* from Primorsky Krai of Russia LC532104 and from the Jilin province of China MH205176 turned out to be identical and were assigned to the *China 1 MH205176* haplotype. It is assumed that there is continuous migration between the *A. cerana* populations of Russia and China, which led to the spread of *V. underwoodi* in the natural population of *A. cer-ana ussuriensis* in the Primorsky Krai of Russia, and the mite is currently distributed up to 45.06°N. Thus, the northern border of the *V. underwoodi* range is located on the territory of Russian Far East and, probably, co-incides with the range of *A. cerana ussuriensis*. It is likely that the selection of *A. mellifera* bee colonies for hygienic behavior against the *V. destructor* mite may also be effective against *V. underwoodi* and will prevent the possible transition of *V. underwoodi* from Asian *A. cerana* to European *A. mellifera*.

УДК 595.774.2:591.4.498

## МОРФОТИПЫ МУХ-КРОВОСОСОК (DIPTERA, HIPPOBOSCIDAE) ПО МОРФОЛОГИИ ПУЛЬВИЛЛ И ЭМПОДИЕВ В КОНТЕКСТЕ ШИРОТЫ КРУГА ХОЗЯЕВ

© 2022 г. А. А. Яцук<sup>1,</sup> \*, А. Ф. Сафонкин<sup>1</sup>, А. В. Матюхин<sup>1</sup>, Т. А. Триселева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН Ленинский пр., 33, Москва, 119071 Россия \*E-mail: sasha\_djedi@mail.ru Поступила в редакцию 08.09.2021 г. После доработки 13.10.2021 г. Принята к публикации 19.10.2021 г.

На 13 видах из 7 родов мух-кровососок (Crataerina hirundinis, L., 1758, Hippobosca equina, L., 1758, Icosta ordea, Macquart, 1835, Lipoptena cervi, L., 1758, L. fortisetosa, Maa, 1965, Ornithoica stipeturi, Schinner, 1868, O. turdi, Latreille, 1812, O. unicolor, Speiser, 1900, Ornithomva avicularia, L., 1758, Or. chloropus, Bergroth, 1901, Or. comosa, Austen, 1930, Or. fringillina, Curtis, 1836, Pseudolinhia canariensis, Macquart, 1840) подробно изучена морфология пульвилл и эмподиев, а также их морфометрические показатели: длина, ширина пульвилл, длина и расстояние между щетинками эмподия. Впервые описаны щетинковидные выросты на пульвиллах у исследованных видов, определена высота, толщина и расстояние между ними. Выдвинуто предположение, что пульвиллы позволяют кровососкам прикрепляться к перьям или шерсти хозяина по принципу специфичной для основного хозяина "ленты-липучки". По морфологии двулопастных крючков на шетинковидных выростах пульвилл выделено четыре морфотипа, по морфологии эмподиев выделено пять морфотипов. Проведено сопоставление морфотипов с широтой круга хозяев. Морфология эмподия характеризует родовой уровень. Широта круга хозяев больше связана с морфологией этой структуры. Наиболее заметные морфологические отличия отмечены между родами кровососок, обитающих на млекопитающих и птицах. Морфология крючков более консервативна. Статистический анализ размерных характеристик пульвилл и эмподиев показал возможность идентификации большинства исследованных видов и родов Hippoboscidae по этим структурам с вероятностью от 65.5 до 100%. Наличие видоспецифичных признаков пульвилл и эмподиев для родов и видов кровососок позволяет классифицировать виды, а морфометрические показатели могут быть использованы при идентификации поврежденных экземпляров.

DOI: 10.31857/S0044459622010079

Представители сем. Нірроboscidae, Samouelle, 1819 — это высокоспециализированные облигатные кровососущие эктопаразиты млекопитающих и птиц, распространенные повсеместно (Досжанов, 1980). В семействе описано 213 видов (Dick, 2006; Obona et al., 2019), разделенных на три подсемейства: Ornithomyinae, Hippoboscinae и Lipopteninae (Maa, Peterson, 1987). Мухи Нірроboscidae имеют серьезное эпидемиологическое значение, так как являются переносчиками многих опасных заболеваний (Bequaert, 1954; Досжанов, 1980) как у млекопитающих (Ganez et al., 2004; Farajollahi et al., 2005), так и у птиц (Хаметова и др., 2018).

Становление паразитизма и гематофагии у этих насекомых связано с трофической специализацией. Предположительно, эволюция питания мух-кровососок шла от копрофагии через факультативную гематофагию к облигатной гематофагии, что сопровождалось возникновением комплекса различных адаптаций к длительному обитанию на покровах хозяина (Балашов, 2005, 2011; Чайка, 2015).

Поскольку мухи-кровососки живут среди шерсти и перьев своих хозяев, в ходе эволюции у них возник механизм надежного прикрепления к подобным покровам, включающий морфологические структуры на лапках: коготки, пульвиллы и эмподий (Досжанов, 1980; Andreani et al., 2020).

Пульвиллы – это мягкие подушечки, позволяющие прикрепляться к покровам хозяина (Досжанов, 1980; Andreani et al., 2020). Они располагаются на склеротизированном щитке и прикреплены к мембранному основанию претарзуса (Досжанов, 2003). У представителей родов *Lipoptena*, Nitzsch, 1818 (*L. cervi*, L., 1758 и *L. fortiseto*-

*sa*, Maa, 1965) и *Нірроbosca*, L., 1758 (*H. equina*, L., 1758) пульвиллы и коготки на каждой лапке с одной стороны развиты больше, чем с другой, а у вида *Pseudolinhia canariensis*, Macquart, 1840 левая и правая пульвиллы похожи по размеру и форме (Andreani et al., 2020).

Эмподии — это длинные непарные выросты, располагающиеся между пульвиллами и покрытые щетинками. Они представляют собой небольшие шпоры, позволяющие захватывать волоски хозяина (Досжанов, 1980; Andreani et al., 2020). По данным литературы, эмподии у *P. canariensis* покрыты бо́льшим количеством щетинок, чем у *H. equina, L. cervi* и *L. fortisetosa* (Andreani et al., 2020).

В аспекте связи с хозяином и межвидовых различий по лапкам мух-кровососок подробно изучена только морфология коготков (Andreani et al., 2020).

Настоящая работа посвящена исследованию морфологических отличий пульвилл и эмподиев у представителей сем. Hippoboscidae, различающихся широтой круга хозяев, на видовом и родовом уровнях.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на самцах 13 видов из 7 родов: *Crataerina hirundinis*, L., 1758 (5 экз.), *Hippobosca equina*, L., 1758 (3 экз.), *Icosta ordea*, Macquart, 1835 (2 экз.), *Lipoptena cervi*, L., 1758 (2 экз.), *L. fortisetosa*, Maa, 1965 (2 экз.), *Ornithoica stipeturi*, Schinner, 1868 (1 экз.), *O. turdi*, Latreille, 1812 (2 экз.), *O. unicolor*, Speiser, 1900 (1 экз.), *Ornithomya avicularia*, L., 1758 (3 экз.), *Or. chloropus*, Bergroth, 1901 (2 экз.), *Or. comosa*, Austen, 1930 (2 экз.), *Or. fringillina*, Curtis, 1836 (2 экз.), *Pseudolinhia canariensis*, Macquart, 1840 (3 экз.). Идентификация видов произведена по определительному ключу Т.Н. Досжанова (2003).

Фотографии препаратов лапок были получены с использованием оборудования ЦКП "Инструментальные методы в экологии" при ИПЭЭ РАН: установки S150A Sputter Coater (Edwards, UK) с напылением золота в ручном режиме и электронного микроскопа TESCAN MIRA 3 LMH (TESCAN, Czech Republic), оснащенного системой энергодисперсионного анализа AZtecOne X-act (Oxford Instruments, UK) и катодом Шоттки.

При исследовании пульвилл проведены измерения их длины и ширины, высоты, толщины и расстояния между щетинковидными образованиями, располагающимися на них. При исследовании эмподиев измерена длина щетинок, располагающихся на эмподии, и расстояние между ними. Так как у представителей р. *Ornithoica* щетинки имеют ребристую структуру, дополнительно измерена ширина и расстояние между ребрами. Обсчет размеров произведен по фотографиям.

Статистическая обработка материала проведена с помощью программы Statistica 10 (StatSoft Inc., USA). Были применены следующие анализы: дискриминантный анализ (в качестве показателя уровня вклада переменной в разделительную силу модели используется  $\lambda p$  (Partiallambda), в качестве показателя уникальности признака — R2 (1-Toler.)); MANOVA, поскольку основная часть переменных может коррелировать между собой, с апостериорным сравнением средних (post-hoc) тестом Тьюки для неравных *N*.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительные анализы показали отсутствие достоверных различий между особями каждого вида мух. У исследованных экземпляров каждого вида между всеми лапками не выявлено достоверных различий по эмподиям и пульвиллам.

Анализ морфологии лапок мух-кровососок показал различия на уровне видов и родов.

С помощью электронного микроскопа на подушечках пульвилл выявлены щетинковидные выросты, располагающиеся продольными рядами и оканчивающиеся плоскими двулопастными крючками (рис. 1–4). У видов *C. hirundinis, I. ordea, O. turdi, O. stipeturi, O. unicolor, Or. avicularia, Or. fringillina, Or. comosa* и *P. canariensis* длинные двулопастные крючки. Их внутренние стороны скругленные (рис. 4*e*). У *Or. chloropus* скругленными являются внешние стороны крючков (рис. 4*e*). У видов *H. equina, L. cervi* и *L. fortisetosa* лопасти у крючков короткие (рис. 4*a*,  $\delta$ ). Расположение щетинковидных выростов на пульвиллах у *P. canariensis* отличается от других родов. Они собраны в пучки по три–пять штук в каждом (рис. 4*e*).

Поскольку левая и правая пульвиллы у представителей Lipoptena и Hippobosca имеют разную длину, виды этих родов рассматривались отдельно. На основе размерных характеристик данной структуры (табл. 1) дискриминантный анализ позволяет правильно определить виды и роды с вероятностью 100%. При идентификации видов важны длина длинной пульвиллы ( $\lambda p = 0.97$ ; F = 65.1,  $p < 0.000, R^2 = 0.17$ ), высота щетинковидных выростов ( $\lambda p = 0.27$ ; F = 19, p < 0.000,  $R^2 = 0.57$ ) и расстояние между ними ( $\lambda p = 0.56$ ; F = 5.4, p < 0.018,  $R^2 = 0.5$ ), а родов — высота щетинковидных выростов ( $\lambda p = 0.28$ ; F = 38, p < 0.000,  $R^2 = 0.74$ ) и расстояние между ними ( $\lambda p = 0.56$ ; F = 11.6, p < 0.004,  $R^2 = 0.67$ ). Анализ MANOVA подтвердил различия между видами ( $\lambda w = 0.0006$ ; p < 0.000) и родами  $(\lambda w = 0.134; p < 0.000).$ 

На основе размерных характеристик пульвилл (табл. 2) дискриминантный анализ позволяет



**Рис. 1.** Коготки, пульвиллы, эмподиум мух-кровососок родов *Crataerina*, *Ornithomya* и *Pseudolinhia*. a - Or. *avicularia*;  $\delta - Or.$  *chloropus*; e - Or. *comosa*; e - Or. *fringillina*;  $\partial - P.$  *canariensis*; e - C. *hirundinis*. К – коготь, П – пульвилла, Э – эмподиум (для рис. 1–3). Масштаб:  $a, \delta, e, \partial - 100$  мкм, e - 50 мкм, e - 200 мкм.

53



**Рис. 2.** Коготки, пульвиллы, эмподиум мух-кровососок р. *Ornithoica.*  $a, \delta - O.$  *turdi*; e - O. *stipeturi*; e - O. *unicolor*.  $\Pi C -$ поперечные складки. Масштаб: a, e, e - 50 мкм,  $\delta - 10$  мкм.

правильно идентифицировать представителей остальных изученных родов *Crataerina*, von Olfers, 1816, *Icosta*, *Ornithoica*, *Ornithomya* и *Pseudolinhia*: вида с вероятностью 98% и рода с вероятностью 94%. При этом важны все показатели, но наиболее значимыми при определении видов являются

длина пульвилл ( $\lambda p = 0.4$ ; F = 551, p < 0.000,  $R^2 = 0.06$ ), толщина щетинковидных выростов ( $\lambda p = 0.5$ ; F = 21, p < 0.005,  $R^2 = 0.05$ ) и расстояние между ними ( $\lambda p = 0.58$ ; F = 17, p < 0.000,  $R^2 = 0.07$ ), а при определении родов – длина ( $\lambda p = 0.31$ ; F = 117.6, p < 0.000,  $R^2 = 0.68$ ) и ширина ( $\lambda p = 0.51$ ; F = 50, p < 0.000,

**Таблица 1.** Размерные показатели пульвилл у представителей родов *Hippobosca* и *Lipoptena* ( $X_{cp} \pm Sx_{cp}$ , мкм)

		Пульвиллы		Щети	нковидные вы	росты
Вид ( <i>n</i> = число промеров)	ДЛИ	ина		расстояние		
промеров)	длинные	короткие	ширина	между выростами	высота	толщина
Hippobosca equina (30)	$324.0\pm2.5$	$136.0\pm6.3$	$116.0\pm25.0$	$2.7\pm0.4$	$12.8\pm0.5$	$1.0 \pm 0.2$
Lipoptena fortisetosa (33)	$193.3\pm4.6$	$64.6\pm2.1$	$45.7\pm5.2$	$2.4\pm0.8$	$13.7\pm1.3$	$1.8\pm0.4$
Lipoptena cervi (24)	$295.9\pm2.9$	$123.9\pm11.5$	$85.3\pm5.0$	$3.9 \pm 1.2$	$17.5\pm2.7$	$1.4 \pm 0.4$



**Рис. 3.** Коготки, пульвиллы, эмподиум мух-кровососок родов *Hippobosca*, *Icosta* и *Lipoptena*. a - H. *equine*; b - I. ordea; b - L. cervi; c - L. fortisetosa. Macштаб: a - 200 мкм, b, b - 50 мкм, c - 100 мкм.

 $R^2 = 0.68$ ) пульвилл. Анализ MANOVA подтвердил различия между видами ( $\lambda w = 0.00004$ ; p < 0.000) и родами ( $\lambda w = 0.0085$ ; p < 0.000).

Изучение эмподия показало, что у видов *C. hirundinis*, *O. stipeturi*, *O. turdi*, *O. unicolor*, *Or. avicularia*, *Or. chloropus*, *Or. comosa*, *Or. fringillina*, *P. canariensis* эмподий покрыт продольными рядами одинаковых длинных щетинок (рис. 1, 2).

На основе размерных характеристик щетинок эмподиев (табл. 3) дискриминантный анализ позволяет правильно определить эти виды с вероятностью 81% и роды с вероятностью 65.5%. Плохо идентифицировались виды *Or. comosa* (67%), *O. unicolor* (67%), *O. turdi* (20%) и р. *Pseudolinhia*, Bequaert, 1926 (0%). При определении видов и родов важен как размер щетинок ( $\lambda p = 0.029$ ; F = 188, p < 0.000,  $R^2 = 0.019$  и  $\lambda p = 0.47$ ; F = 19, p < 0.000,  $R^2 = 0.26$  соответственно), так и расстояние между ними ( $\lambda p = 0.1$ ; F = 49, p < 0.000,  $R^2 = 0.019$  и  $\lambda p = 0.74$ ; F = 6, p < 0.001,  $R^2 = 0.26$ ). Анализ МАNOVA подтвердил значимые различия между видами ( $\lambda w = 0.002$ ; p < 0.000) и родами ( $\lambda w = 0.34$ ; p < 0.000). У вида *O. turdi* ни по одному из показателей не было значимых отличий от *Or. fringillina*, а у *Or. comosa* — от *Or. chloropus*. Длина щетинок у *O. unicolor* совпадает с *Or. fringillina*. У р. *Pseudolinhia* по данным морфометрическим показателям не выявлено значимых различий с р. *Ornithomya*, Latreille, 1802.

У представителей р. *Ornithoica*, Rondani, 1878 на эмподии кроме щетинок имеются поперечные складки (рис.  $2\delta$ ), а сами щетинки имеют ребристую поверхность. На основе размерных характеристик поперечных складок (табл. 4) дискриминантный анализ позволяет правильно определить виды с вероятностью 100%. При этом важны как ши-



**Рис. 4.** Щетинковидные выросты с крючками на пульвиллах лапок мух-кровососок. *a* – *H. equine*; *б* – *L. fortisetosa*; *в* – *Or. avicularia*; *e* – *Or. chloropus*; *д* – *O. stipeturi*; *e* – *P. canariensis*. К – крючок, Щ – щетинковидный вырост, BHE – внешняя сторона крючка, BHУ – внутренняя сторона крючка. Масштаб: 20 мкм.

рина складок ( $\lambda p = 0.85$ ; F = 48, p < 0.000,  $R^2 = 0.68$ ), так и расстояние между ними ( $\lambda p = 0.107$ , F = 36, p < 0.000,  $R^2 = 0.68$ ). Анализ МАNOVA подтвердил различия между видами ( $\lambda w = 0.0117$ ; p < 0.000).

Щетинки на эмподии у представителей *Icosta*, Speiser, 1905 могут быть разделены на короткие и длинные (рис. 36). У представителей *Lipoptena* в базальной части эмподия расположены длинные

	Пульн	зиллы	Щети	ковидные вырос	сты
Вид ( <i>n</i> = число промеров)	длина	ширина	расстояние между выростами	высота	толщина
Crataerina hirundinis (24)	$131.0 \pm 0.9$	$39.5\pm2.0$	$2.7\pm0.7$	$16.0 \pm 1.5$	$1.0 \pm 0.1$
Icosta ordea (24)	$142.1\pm7.0$	$33.0\pm3.6$	$2.3\pm0.6$	$9.3\pm1.8$	$0.9\pm0.2$
Ornithoica stipeturi (24)	$107.9\pm5.0$	$44.5\pm6.0$	$2.0 \pm 0.5$	$11.2\pm1.3$	$0.8 \pm 0.1$
<i>O. turdi</i> (18)	$113.0\pm3.0$	$40.0\pm2.0$	$1.4 \pm 0.1$	$11.4\pm1.0$	$1.0 \pm 0.3$
O. unicolor (18)	$142.8\pm2.9$	$40.0\pm2.0$	$2.3 \pm 0.5$	$9.0 \pm 1.6$	$0.8\pm0.2$
Ornithomya avicularia (24)	$213.0\pm4.7$	$81.2\pm4.0$	$2.4 \pm 0.3$	$20.0\pm2.0$	$1.7 \pm 0.4$
Or. chloropus (24)	$230.5\pm3.9$	$81.1\pm5.5$	$2.1 \pm 0.4$	$18.6 \pm 1.5$	$1.2\pm0.4$
Or. comosa (24)	$229.9\pm3.0$	$75.8\pm3.0$	$1.5 \pm 0.2$	$14.0\pm3.5$	$0.8 \pm 0.3$
Or. fringillina (28)	$171.0\pm6.0$	$49.9\pm1.8$	$2.0 \pm 0.3$	$16.6 \pm 1.1$	$1.2 \pm 0.3$
Pseudolinhia canariensis (20)	$224.0\pm1.8$	$50.6\pm3.0$	$5.4 \pm 1.1$	$31.7\pm3.0$	$1.3 \pm 0.3$

**Таблица 2.** Размерные показатели пульвилл ( $X_{cp} \pm Sx_{cp}$ , мкм)

**Таблица 3.** Размерные показатели щетинок эмподиев ( $X_{cp} \pm Sx_{cp}$ , мкм)

Вид ( <i>n</i> = число промеров)	Длина щетинок	Расстояние между щетинками
Crataerina hirundinis (104)	53.0 ± 1.4	7.7 ± 1.2
Pseudolinhia canariensis (144)	$56.0 \pm 2.4$	$13.2 \pm 0.7$
Ornithomya avicularia (120)	$62.9 \pm 1.7$	$19.8 \pm 1.6$
Or. chloropus (94)	$55.2 \pm 3.98$	$10.35 \pm 1$
Or. comosa (64)	$52.4 \pm 1.5$	$12.2 \pm 1.5$
Or. fringillina (102)	$31.0 \pm 1.9$	$11.4 \pm 1$
Ornithoica stipeturi (54)	$23.95 \pm 1.5$	$7.4 \pm 0.4$
<i>O. turdi</i> (100)	$30.7 \pm 2.3$	$10.9 \pm 0.6$
O. unicolor (60)	$30.6 \pm 2.4$	$13.75 \pm 1$

**Таблица 4.** Размерные показатели поперечных складок на эмподиях у представителей Ornithoica ( $X_{cp} \pm Sx_{cp}$ , мкм)

Вид ( <i>n</i> = число промеров)	Ширина поперечных складок	Расстояние между поперечными складками
<i>O. turdi</i> (60)	$30.2 \pm 4$	$55.2 \pm 12.8$
O. stipeturi (58)	$3.0 \pm 0.3$	$3.75 \pm 0.5$
O. unicolor (61)	$9.2 \pm 1.99$	$12.6 \pm 1.99$

щетинки, а в апикальной части — короткие треугольные щетинки, плотно прилегающие к поверхности эмподия (рис. 3*в*, *г*). У *Н. еquina* эмподии имеет сплющенную форму. Краевые щетинки эмподия длинные, стоящие торчком, щетинки, располагающиеся в центре, — короткие, прилегающие к поверхности (рис. 3*a*).

На основе размерных характеристик данной структуры (табл. 5) дискриминантный анализ позволяет правильно различить эти виды и три рода с вероятностью 100%. При определении видов и родов важны все показатели: размер длин-

ных щетинок ( $\lambda p = 0.06$ ; F = 116.5, p < 0.000,  $R^2 = 0.23$ и  $\lambda p = 0.07$ ; F = 153, p < 0.000,  $R^2 = 0.12$  соответственно), расстояние между ними ( $\lambda p = 0.27$ ; F = 20, p < 0.002,  $R^2 = 0.13$  и  $\lambda p = 0.5$ ; F = 12, p < 0.000,  $R^2 = 0.76$ ), размер коротких щетинок ( $\lambda p = 0.57$ ; F = 5, p < 0.004,  $R^2 = 0.1$  и  $\lambda p = 0.7$ ; F = 4.7, p < 0.019,  $R^2 = 0.19$ ) и расстояние между ними ( $\lambda p = 0.18$ ; F = 34, p < 0.000,  $R^2 = 0.23$  и  $\lambda p = 0.3$ ; F = 26.6, p < 0.000,  $R^2 = 0.78$ ). Анализ МАNOVA подтвердил наличие значимых различий между видами ( $\lambda w = 0.00019$ ; p < 0.000) и родами ( $\lambda w = 0.0028$ ; p < 0.000).

Вид ( <i>n</i> = число промеров)	Длина длинных щетинок	Расстояние между длинными щетинками	Длина коротких щетинок	Расстояние между короткими щетинками
Hippobosca equina (130)	$30.0 \pm 1.5$	$9.6\pm0.8$	$6.6 \pm 1.5$	$6.0 \pm 1.8$
Icosta ordea (102)	$38.9 \pm 1.99$	$20.8\pm2$	$13.3\pm0.96$	$5.6\pm0.8$
Lipoptena fortisetosa (133)	$18.5 \pm 1.4$	$14.3 \pm 1$	$11.5\pm0.92$	$11.8\pm0.9$
Lipoptena cervi (120)	$19.0 \pm 1.5$	$7.3 \pm 1$	$9.8 \pm 1.3$	$18.3 \pm 1.5$

**Таблица 5.** Размерные показатели щетинок эмподиев ( $X_{cp} \pm Sx_{cp}$ , мкм)

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Способ прикрепления мух-кровососок к покровам своего хозяина определяется морфологией лапок. Коготки представляют собой структуру для первичного прикрепления к покровам, а для более прочного сцепления с ними служат пульвиллы. Ранее на примере C. pallida Latreille, 1812 было показано, что бороздки на коготках вместе с работой коготков по принципу зажимов создают огромную силу трения. Щетинковидные выросты с двулопастными крючками ориентированы поразному в зависимости от их местоположения на пульвилле. Было показано, что такая сложная система позволяет мухе спокойно перемещаться не только в покровах хозяина, но и по другим субстратам. Несмотря на то, что эмподий имеет удлиненные щетинки и мог бы работать как аналог коготков. было высказано прелположение. что эмподий имеет функцию очищения коготков и возвращения двулопастных крючков в состояние готовности к прикреплению, а основным механизмом прикрепления к покровам хозяина являются коготки (Petersen et al., 2018).

Результаты наших исследований показали, что пульвиллы всех исследованных видов снабжены щетинковидными выростами, на конце которых располагаются двулопастные крючки, различающиеся по морфологии. Мы предполагаем, что пульвиллы позволяют кровососкам прикрепляться к перьям или шерсти хозяина с помощью этих крючков по принципу специфичной для основного хозяина "ленты-липучки", а эмподии, которые также имеют специфичную морфологию, в свою очередь, дополнительно захватывают волоски на теле хозяина.

Известно, что у других групп мух прикрепительный аппарат также включает в себя когти, пульвиллы и эмподии, однако морфология этих структур имеет отличия от кровососок. Так, у Таbanidae эмподий имеет вид еще одной подушечки-пульвиллы (Chainey, 1993). Это может говорить о том, что именно пульвиллы являются у мух основной структурой для прикрепления к субстратам. При этом эмподий напрямую участвует в процессе прикрепления и не несет функцию очищения когтей и пульвилл. Щетинковидные выросты на пульвиллах у представителей Muscidae (Niederegger, Gorb, 2003), Calliphoridae (Gorb et al., 2012) и Syrphidae (Gorb et al., 2001) оканчиваются плоскими пластинами-присосками, на которых выделяется адгезирующее вещество, позволяющее мухам передвигаться по любым поверхностям. Плотность расположения щетинок на пульвиллах у разных видов может различаться. Например, у Syrphidae это связано с размерами особей (Gorb et al., 2001). Когти, имеющие более простую форму, нежели когти кровососок, как показано в работе по Muscidae (Niederegger, Gorb, 2003), используются не только для сцепления с макроскопическими неровностями субстратов, но в некоторых случаях и для отсоединения пульвилл от поверхностей. На фотографиях, приведенных в той же работе, эмподий не имеет длинных щетинок. Таким образом, у мух прослеживается специализация пульвилл и эмподиев под особенности среды обитания.

На основе морфологии двулопастных крючков щетинковидных выростов пульвилл исследованные нами виды кровососок были разделены на четыре морфотипа:

1) Крючки длинные со скругленными внутренними сторонами: *C. hirundinis*, *I. ordea*, *O. turdi*, *O. stipeturi*, *O. unicolor*, *Or. avicularia*, *Or. fringillina* и *Or. comosa*;

2) Крючки длинные со скругленными внешними сторонами: Or. chloropus;

3) Крючки длинные со скругленными внутренними сторонами, щетинковидные образования собраны в пучки: *P. canariensis*;

4) Крючки с короткими лопастями: *H. equina*, *L. cervi* и *L. fortisetosa*.

По морфологии эмподиев у исследованных видов кровососок можно выделить пять морфотипов:

1) Эмподий покрыт длинными одинаковыми щетинками: представители родов *Crataerina*, *Ornithomya* и *Pseudolinhia*;

2) Эмподий покрыт длинными одинаковыми щетинками и поперечными складками, вероятно обеспечивающими дополнительные возможности для прикрепления: р. Ornithoica;

But May	BUTTLEVOZGAD	Морф	отипы
Бид мух	Биды лозясь	эмподий	пульвиллы
Crataerina hirundinis	Ласточки	1	1
Hippobosca equina	Очень широкий круг хозяев: лошади, верблюды, свиньи, кролики, сыч, лятел, коршун, голубь и т.л.	5	4
Icosta ordea	Цаплевые	4	1
Lipoptena cervi	Копытные, иногда птицы	3	4
L. fortisetosa	Копытные, иногда птицы	3	4
Ornithoica stipeturi	Очень широкий круг хозяев-птиц	2	1
O. turdi	Соколообразные, курообразные, голубеобразные, кукушкообразные, совообразные, козодоеобразные, ракшеобразные, дятлообразные, воробьинообразные	2	1
O. unicolor	Соколообразные, голубеобразные, воробьинообразные. Предпочитает совообразных	2	1
Ornithomya avicularia	Крупные птицы: ворона, грач, лунь	1	1
Or. chloropus	Воробьинообразные	1	2
Or. comosa	Ласточки	1	1
Or. fringillina	Воробьинообразные	1	1
Pseudolinhia canariensis	Голубеобразные	1	3

Таблица 6. Морфотипы кровососок по отношению к кругу хозяев

 Щетинки базальной и апикальной частей эмподия различаются по морфологии и длине: p. *Lipoptena*;

4) На эмподиях есть как короткие, так и длинные щетинки, расположенные вперемешку: *I. ordea*;

5) На эмподиях существуют краевые и центральные зоны, щетинки на которых имеют разную морфологию и длину: *H. equina*.

Статистический анализ размерных характеристик морфологических структур пульвилл и эмподиев показал, что, основываясь на них, можно идентифицировать большинство исследованных видов и родов Hippoboscidae.

Одним из наиболее значимых показателей при разделении видов, наравне с размерами щетинковидных выростов и расстоянием между ними, является длина самих пульвилл. То же касается и родов.

При идентификации видов и родов по размерным характеристикам структур эмподия важны все показатели. При этом для р. Ornithoica одними из главных показателей при разделении видов являются размеры поперечных складок. Наиболее хорошо размерные показатели щетинок работают при определении видов из Crataerina, Icosta, Lipoptena и Hippobosca и самих родов.

Известно, что первые насекомые, паразитирующие в шерстяных и перьевых покровах хозяев, появились еще в меловом периоде (Gao et al., 2019). Среди современных насекомых, живущих внутри шерсти и перьев хозяина, наиболее из-

вестны блохи (Siphonaptera Latreille, 1825) и вши (Anoplura Leach, 1815). В отряде блох, в основном паразитирующих на млекопитающих, реже специализирующихся на птицах, преобладают виды, способные паразитировать на нескольких видаххозяевах. Адаптации блох для жизни среди шерстяного и перьевого покровов включают как общую морфологию тела, так и хорошо развитые коготки на лапках и щетинки, позволяющие им прикрепляться к покровам. Число и размер этих щетинок изменяется в зависимости от типа хозяина (норные млекопитающие, млекопитающие без постоянных убежищ, особо подвижные (в том числе хищные) млекопитающие, птицы, морские птицы). На основе морфотипов по перечисленному комплексу признаков было выделено шесть групп блох, соответствующих типам их хозяев (Medvedev, 2017).

Аналогичная биологическая значимость элементов прикрепительного аппарата, позволяющая классифицировать виды, выявлена нами для мух-кровососок.

В табл. 6 приведены данные по видам кровососок, выделенным нами морфотипам и данные по видам их хозяев согласно работам Т.Н. Досжанова (2003), А.В. Матюхина и С.И. Гашкова (2020). Как видно из таблицы, морфология эмподия характеризует родовой уровень. Широта круга хозяев больше связана с морфологией именно этой структуры. Наиболее заметные морфологические отличия отмечены между родами кровососок, обитающих только на птицах, и родами, имеющими широкий круг хозяев.

Морфология крючков щетинковидных выростов пульвилл более консервативна, поскольку половина исследованных видов имеет длинные крючки со скругленными внутренними сторонами. Некоторый уровень специализации выявлен для *Or. chloropus*.

Род *Нірровоsca* имеет наиболее широкий круг хозяев, что, возможно, связано с морфологией эмподиев, отличной от других родов. Особая морфология крючков на пульвиллах позволяет *H. equina*, а также представителям р. *Lipoptena* (*L. cervi* и *L. fortisetosa*) прикрепляться к шерсти млекопитающих и паразитировать на них.

Представители р. *Ornithoica*, связанные с очень широким кругом хозяев, имеют на эмподиях дополнительные поперечные складки.

Более простое устройство эмподиев у представителей родов *Crataerina*, *Ornithomya* и *Pseudolinhia* предположительно связано с небольшим кругом их хозяев. Узкоспециализированные виды *P. canariensis* (паразитирующие на голубеобразных) и *Or. chloropus* (на воробьинообразных) имеют, кроме того, небольшие отличия от прочих видов по морфологии крючков пульвилл. Однако для *Or. fringillina*, предпочитающих тех же хозяев из отряда воробьинообразных, таких морфологических особенностей не обнаружено. Также не отмечено морфологической специализации для паразитирования на ласточках у *Or. comosa* и *C. hirundinis*.

Отсутствие статистических различий размерных характеристик щетинок на эмподиях между несколькими видами и родами может быть связано не столько с совпадением видов-хозяев, сколько со слабой изменчивостью данных морфологических структур. Так, хотя виды *Or. comosa* и *Or. chloropus* предпочитают разных основных хозяев, морфология их эмподиев совпадает, а морфология крючков на щетинковидных выростах пульвилл имеет лишь небольшие различия.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные специфичные признаки по строению пульвилл и эмподиев для родов и видов кровососок, в том числе подробно описанные щетинковидные выросты на пульвиллах и поперечные складки на эмподиях, позволяют выделить морфотипы мух-кровососок по структурным элементам лапок. Результаты настоящей работы, как и в случае с изучением строения лапок блох, свидетельствуют о биологической значимости изучаемых структур, связанных с развитием связей "паразит—хозяин". Использование морфометрических показателей может существенно облегчить работу при идентификации поврежденных экземпляров.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов какихлибо исследований с использованием теплокровных животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балашов Ю.С., 2005. Экологические ниши эктопаразитов // Паразитология. Т. 39. № 6. С. 441–454.
- Балашов Ю.С., 2011. Паразитизм и экологическая паразитология // Паразитология. Т. 45. № 2. С. 81–93.
- Досжанов Т.Н., 1980. Мухи-кровососки (Diptera, Hippoboscidae) Казахстана. Алма-Ата: Наука КазССР. 280 с.
- Досжанов Т.Н., 2003. Мухи-кровососки (Diptera, Hippoboscidae) Палеарктики. Алматы: КазгосИНТИ. 277 с.
- Матюхин А.В., Гашков С.И., 2020. Первые сведения о мухах кровососках (Diptera, Hippoboscidae) Томска // XI Всероссийский диптерологический симпозиум (с международным участием), Воронеж, 24–29 августа 2020 г. / Отв. ред. Овчинникова О.Г., Шамшев И.В. СПб.: ЛЕМА. С. 132–134.
- Хаметова А.П., Пичурина Н.Л., Забашта М.В., Романова Л.В., Орехов И.В. и др., 2018. Биоценотическая структура природного очага иксодового клещевого боррелиоза в Ростовской области // Мед. паразитол. и паразит. болезни. № 4. С. 33–39.
- Чайка С.Ю., 2015. Значение трофической специализации членистоногих в эволюции возбудителей инфекционных заболеваний // Евразийский союз ученых. Т. 2. № 11. С. 70–72.
- Andreani A., Sacchetti P., Belcari A., 2020. Evolutionary adaptations in four hippoboscid fly species belonging to three different subfamilies // Med. Vet. Entomol. V. 34. № 3. P. 344–363.
- *Bequaert J.C.*, 1954. The Hippoboscidae or louse-flies (Diptera) of mammals and birds. Part II. Taxonomy, evolution and revision of America genera and species // Entomol. Am. V. 34. P. 1–232.
- Chainey J.E., 1993. Horse-flies, deer-flies and clegs (Tabanidae) // Medical Insects and Arachnids / Eds Lane R.P., Crosskey R.W. Dordrecht: Springer. P. 310–332.
- *Dick C.W.*, 2006. Checklist of world Hippoboscidae (Diptera: Hippoboscoidea). Department of Zoology, Field Museum of Natural History, Chicago. https://www.researchgate.net/publication/322578992
- Farajollahi A., Crans V.J., Nickerson D., Bryant P., Wolf B., et al., 2005. Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae) // J. Am. Mosq. Control Assoc. V. 21. № 4. P. 474–476.

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ том 83 № 1 2022

- Ganez A.Y., Baker I.K., Lindsay R., Dibernardo A., McKeever K., Hunter B., 2004. West Nile virus outbreak in North American owls, Ontario, 2002 // Emerg. Infect. Dis. V. 10. № 12. P. 2135–2142.
- Gao T., Yin X., Shih C., Rasnitsyn A.P., Xu X. et al., 2019. New insects feeding on dinosaur feathers in mid-Cretaceous amber // Nat. Commun. V. 10. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13516-4
- Gorb S., Gorb E., Kastner V., 2001. Scale effects on the attachment pads and friction forces in syrphid flies (Diptera, Syrphidae) // J. Exp. Biol. V. 204. P. 1421–1431.
- Gorb S.N., Schuppert J., Walther P., Schwarz H., 2012. Contact behaviour of setal tips in the hairy attachment system of the fly *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae): a cryo-SEM approach // Zoology. V. 115. P. 142– 150.
- Maa T.C., Peterson B.V., 1987. Hippoboscidae // Manual of Nearctic Diptera. V. 2 / Eds McAlphine J.F., Peterson B.V.,

Shewell G.E., et al. Ottawa: Research Branch, Agriculture Canada. P. 1271–1281.

- *Medvedev S.*, 2017. Adaptations of fleas (Siphonaptera) to parasitism // Entomol. Rev. V. 97. P. 1023–1030.
- Niederegger S., Gorb S., 2003. Tarsal movements in flies during leg attachment and detachment on a smooth substrate // J. Insect Physiol. V. 49. P. 611–620.
- Obona J., Sychra O., Greš S., Heřman P., Manko P. et al., 2019. A revised annotated checklist of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) from Slovakia // ZooKeys. V. 862. P. 129–152.
- Petersen D.S., Kreuter N., Heepe L., Büsse S., Wellbrock A.H.J. et al., 2018. Holding tight to feathers – structural specializations and attachment properties of the avian ectoparasite Crataerina pallida (Diptera, Hippoboscidae) // J. Exp. Biol. V. 221. https://doi.org/10.1242/ieb.179242

# The morphotypes of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) based on the morphology of pulvillae and empodia in the context of host range

A. A. Yatsuk<sup>a</sup>, \*, A. F. Safonkin<sup>a</sup>, A. V. Matyukhin<sup>a</sup>, and T. A. Triseleva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution Leninskij pr., 33, Moscow, 119071 Russia \*e-mail: sasha djedi@mail.ru

The morphology of pulvillae and empodia as well as their morphometric parameters (length, width of pulvillae, length and distance between empodia setae) was studied in detail in 13 species belonging to 7 genera of louse flies (*Crataerina hirundinis*, L., 1758, *Hippobosca equine*, L., 1758, *Icosta ordea*, Macquart, 1835, *Lipoptena cervi*, L., 1758, *L. fortisetosa*, Maa, 1965, *Ornithoica stipeturi*, Schinner, 1868, *O. turdi*, Latreille, 1812, *O. unicolor*, Speiser, 1900, *Ornithomya avicularia*, L., 1758, *Or. chloropus*, Bergroth, 1901, *Or. comosa*, Austen, 1930, *Or. fringillina*, Curtis, 1836, *Pseudolinhia canariensis*, Macquart, 1840). Bristle-like formations on pulvillae were described for these species for the first time. The height, thickness and distance between them have been determined. It has been hypothesized that pulvillae allow the louse flies to attach to the host's feathers or hair using the principle of Velcro specific for the main host. Four morphotypes were identified using the morphology of bilobed hooks on the bristle-like formation of the pulvillae and five morphotypes were identified by the morphology of empodia. Comparison of morphotypes with the host range was carried out. Hook morphology has been found to be rather conservative. The discriminant analysis of the structures under study makes it possible to identify the species and genus of Hippoboscidae with probability from 65.5 to 100%. The specific features of pulvillae and empodia of genera and species of louse flies make it possible to classify the species while the morphometric parameters can be used to identify the damaged specimens. УДК 581.557.24

## СВЕТ И <sup>13</sup>С: ОТЛИЧАЮТСЯ ЛИ ОРХИДЕИ ОТ ДРУГИХ СОСУДИСТЫХ РАСТЕНИЙ ПО РЕАКЦИИ НА ЗАТЕНЕНИЕ?

#### © 2022 г. В. Г. Онипченко<sup>1,</sup> \*, Дж. Х. Корнелиссен<sup>2</sup>, <u>М. Г. Вахрамеева</u><sup>1</sup>, Л. Д. Захарова<sup>3</sup>, А. А. Ахметжанова<sup>1</sup>, М. И. Хомутовский<sup>1</sup>, Р. ван Логтестин<sup>2</sup>, Н. А. Судзиловская<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра экологии и географии растений

Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

<sup>2</sup>Амстердамский свободный университет, факультет наук о Земле и жизни, отделение экологических наук

Де Белелаан, 1085, Амстердам, 1081 HV Нидерланды

<sup>3</sup>Государственный Дарвиновский музей ул. Вавилова, 57, Москва, 117292 Россия

<sup>4</sup>Лейденский университет, Институт наук об окружающей среде (CML) Эйнштейнвег, 2, Лейден, 2333 СС Нидерланды

> \**E-mail: vonipchenko@mail.ru* Поступила в редакцию 15.10.2021 г. После доработки 26.10.2021 г. Принята к публикации 01.11.2021 г.

Орхидеи имеют симбиотические отношения с эктомикоризными или сапротрофными ("ризоктония") грибами, которые обеспечивают растения питательными веществами. Степень зависимости растений от грибов в плане обеспечения органическим веществом отражается в показателях величины  $\delta^{13}$ С в тканях растений. Мало что известно о том, насколько широко распространена частичная микогетеротрофия (ЧМГ) среди орхидей в природе, и вопрос о том, обладают ли орхидеи, ассоциированные с ризоктонией, микогетеротрофией, остается открытым. Используя орхидеи с эктомикоризными грибами и виды орхидей, ассоциированные с ризоктонией, мы проверили гипотезу о том, что наземные зеленые орхидеи снижают свои значения  $\delta^{13}$ C в ответ на затенения меньше, чем соседние сосудистые растения, не относящиеся к орхидным (доказательство ЧМГ). Мы исследовали восемь пар видов растений (орхидея в паре с эталонным автотрофным растением, растущим рядом) в условиях хорошо освещенного и затененного участков на площадках в европейской части России. На каждом участке регистрировали уровень освещенности и исследовали листья растений на величины  $\delta^{13}$ C. Обнаружено, что все протестированные орхидеи показали сходную более слабую реакцию содержания <sup>13</sup>С на относительную освещенность в отличие от значимо более сильной реакции у контрольных (не орхидных) растений, что свидетельствует о широком распространении ЧМГ среди орхидей. У орхидей с эктомикоризными грибами и орхидей, ассоциированных с ризоктонией, не отмечено существенной разницы в реакции  $\delta^{13}$ С на тень, что подтверждает микогетеротрофные механизмы переноса углерода к растениям у орхидей, ассоциированных с "ризоктониевыми" грибами. Доля углерода, полученного от грибов, для отдельных видов орхидей варьировала от 3 до 50%. Орхидеи снижали плотность устьиц в ответ на затенение меньше или так же, как автотрофные растения, что позволяет предположить, что микогетеротрофные растения могут быть несколько менее лимитированы доступностью воды, чем автотрофные виды, что, возможно, связано с поступлением воды от грибов. Наши данные подтверждают широкую распространенность ЧМГ среди орхидей и существование ЧМГ у орхидей, ассоциированных с "ризоктониевыми" грибами. Полу-ченные результаты расширяют представления о важном экологическом значении микоризных ассоциаций в подземных пишевых сетях.

DOI: 10.31857/S0044459622010067

Для растений из сем. Orchidaceae Juss. характерен микоризный симбиоз, по крайней мере на ранних стадиях онтогенеза (Dearnaley, 2007). Типичная микориза — это симбиотические отношения между растениями и грибами, при которых растения обеспечивают грибы углеводами, а грибы снабжают растения элементами минерального питания и водой (Allen, 1991). Однако многие фотосинтезирующие орхидеи могут также получать органический углерод (С) из внешних источников через микоризные грибы и поэтому могут рассматриваться как частичные микогетеротрофы (ЧМГ) или миксотрофы (Girlanda et al., 2011; Sommer et al., 2012; Merckx, 2013; Selosse, Martos, 2014; Gebauer et al., 2016; Selosse et al., 2017; Suetsugu et al., 2018; Těšitel et al., 2018). Грибной углерод часто обогащен <sup>13</sup>С (Billings, Richter, 2006; Bowling et al., 2008: Merckx et al., 2010, но см. Selosse, Martos. 2014) по сравнению с автотрофными растениями, поэтому растения, получающие углерод через грибной путь, имеют более высокое содержание <sup>13</sup>С в тканях (Mayor et al., 2009: Hynson et al., 2013). Например, в бореальном лесу в Эстонии ЧМГ орхилеи имеют значения  $\delta^{13}$ С в лиапазоне от -30 до -27.8‰, т.е. промежуточные между полными автотрофами, которые обычно имеют диапазон значений  $\delta^{13}$ С от -32 до -30.5%, и полностью микогетеротрофными растениями, например, диапазон  $\delta^{13}$ С от -26.1 до -25.5‰ у *Monotropa* hypopithys из сем. Ericaceae (Tedersoo et al., 2007).

При выращивании в тени автотрофные С<sub>3</sub>-растения обычно снижают плотность устьиц (Salisbury, 1928). Это приводит к уменьшению устьичной проводимости, увеличению отношения мольной доли межклеточного СО<sub>2</sub> к мольной доле СО<sub>2</sub> в окружающей среде (ci/ca) и снижению  $\delta^{13}$ С в листьях (Brooks et al., 1997; Duursma, Marshall, 2006; Preiss et al., 2010; Zhu et al., 2010; Zhou et al., 2011; Cernusak et al., 2013). Тенденция к снижению  $\delta^{13}$ C в тени ожидается и для орхидей, но благодаря их способности получать обогащенные <sup>13</sup>С органические вещества от грибов, снижение значения  $\delta^{13}$ С в тканях орхидей в условиях тени может быть меньше, чем снижение  $\delta^{13}$ С в тканях полностью автотрофных растений. Действительно, для отдельных растений орхидей было показано (Hynson et al., 2013), что (1) из-за поглощения углерода, обогащенного  $\delta^{13}$ C, из грибов листья орхидей с ЧМГ имеют более высокие значения  $\delta^{13}$ С, чем полностью автотрофные растения, и (2) доля углерода, полученного из грибов, увеличивается у орхидей в условиях тени (Preiss et al., 2010). Однако сохраняются ли такие связи между несколькими видами орхидей и другими сосудистыми видами, и выдерживают ли они полевые условия, где другие факторы динамики углерода могут нарушить закономерности, обнаруженные в лабораторных исследованиях? В данном исследовании мы описываем метод проверки частичной микогетеротрофии in situ, основанный на сравнении содержания <sup>13</sup>С у хорошо освещенных растений и в тени.

Орхидеи образуют специфический тип микоризы, названный "орхидным" типом, с широким спектром ассоциированных микоризных грибов, которые могут быть эктомикоризными с другими растениями и/или сапротрофными (с так называемыми ризоктониевыми) грибами (Smith, Read, 2008). Ризоктонивые грибы включают несколько филогенетически разнообразных групп (Dearnaley et al., 2012). Если в более ранних исследованиях считалось, что орхидеи, образующие микоризные ассоциации с эктомикоризными (Martos et al., 2009; Lallemand et al., 2019) грибами (орхидеи с ЭМГ, но они часто содержат и ризоктониевые грибы), обладают миксотрофными свойствами, то Селоссе и Мартос (Selosse, Martos, 2014) предположили, что орхидеи, ассоциированные с ризоктонией (R-орхидеи), также являются ЧМГ. Однако у R-орхидей микогетеротрофию трудно обнаружить, поскольку она не отражается в высоких абсолютных значениях  $\delta^{13}$ C в тканях, как у орхидей с ЭМГ. Это связано с тем, что абсолютные значения  $\delta^{13}$ C в тканях R-орхидей низкие (Stöckel et al., 2014) из-за более низких величин  $\delta^{13}$ С грибов ризоктонии по сравнению с таковыми в ЭМГ (Selosse, Martos, 2014). Это приводит к тому, что значения  $\delta^{13}$ C R-орхидей довольно близки к значениям δ<sup>13</sup>С автотрофных С<sub>3</sub>-растений. Учитывая сложность обнаружения микогетеротрофии по содержанию δ<sup>13</sup>С в тканях, альтернативный метод с использованием изотопа <sup>2</sup>Н (дейтерия) был предложен Гебауэр с соавт. (Gebauer et al., 2016) и Швайгер с соавт. (Schweiger et al., 2018), которые подтвердили микогетеротрофию R-орхидей. Швайгер с соавт. (Schweiger et al., 2018) подтвердили частичную микогетеротрофию нескольких R-орхидей путем сравнения изотопного состава между подземными проростками, взрослыми орхидеями и автотрофными растениями. Другим сильным, хотя и косвенным, источником доказательств микогетеротрофии орхидей является реакция <sup>13</sup>С на тень: разница в содержании  $\delta^{13}$ С между растениями в хорошо освещенной и затененной среде должна быть меньше у (частично) микогетеротрофных орхидей по сравнению с разницей у соседних полностью автотрофных растений (Hynson et al., 2013). Здесь мы предполагаем, что реакция  $\delta^{13}$ C на тень у R-орхидей так же мала, как и у других орхидей, что является дополнительным полевым доказательством (частичной) микогетеротрофии R-орхидей.

Таким образом, мы проверим гипотезу о том, что наземные зеленые орхидеи в ответ на тень снижают свои значения  $\delta^{13}$ С меньше, чем соседние "неорхидные" сосудистые растения.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые растения и отбор проб. Восемь пар видов растений, т.е. по одной орхидее и одному эталонному "неорхидному" виду, растущему рядом, были изучены в полевых условиях в нескольких местах европейской части России (табл. 1). Растения каждой пары собирали в пределах популяций как на свету, так и в тени. Для одной пары видов (*Dactylorhiza fuchsii* и *Convallaria majalis*) со-

брали растения из пяти популяций в пределах трансекты в 5 км, для других пар видов (каждая пара была отобрана пять раз на свету и пять раз в тени) расстояния между точками отбора составляли несколько сотен метров. В данной точке отбора проб орхидею и соответствующее контрольное растение собирали как можно ближе друг к другу, всегда на расстоянии 20-100 см друг от друга, чтобы убедиться, что они развивались в схожих условиях освещения. Для оценки <sup>13</sup>С (нефотосинтезирующих) полностью микогетеротрофных (МГ) растений в качестве эталона собирали листья Neottia nidus-avis (n = 6) в тех же точках отбора проб, что и пары *D. fuchsii* и *C. majalis*. Рядом с другими исследованными видами не было жизнеспособных полностью МГ растений, но  $\delta^{13}$ С лля *N. nidus-avis* был похож на значения лля полностью МГ растений в других умеренных регионах (Gebauer, Meyer, 2003; Tedersoo et al., 2007). Поэтому мы использовали полученные значения для приблизительной оценки доли углерода, получаемого орхидным растением от грибов, с помощью линейной смешанной модели с двумя источниками (Gebauer, Meyer, 2003).

Обычный метод сравнения изотопного состава целевого вида с эталонными заключается в том, что вместе с целевым видом отбирают по крайней мере три соседних автотрофных эталонных вида, чтобы отобразить происходящую вариацию в автотрофных растениях (Gebauer, Meyer, 2003). Этот подход имеет очевидные достоинства, но не очень точен, когда межвидовые и пространственные вариации высоки. Но у нас не было специальной задачи сравнить содержание <sup>13</sup>С между орхидными и "неорхидными" видами, а разница между освещенными и затененными растениями (популяциями) локальна. Для такого сравнения было практически невозможно использовать более одного эталонного вида, чтобы охватить сходные условия освещения с целевыми растениями орхидей.

С каждого растения был собран один хорошо развитый типичный стеблевой лист (без черешков, кончиков и базальных частей). Произвольная половина листа была высушена на воздухе для дальнейшего анализа <sup>13</sup>С.

Оценка открытого неба (освещенности). Для оценки условий освещенности в точках отбора проб были сделаны цифровые фотографии кустарников или полога деревьев над изучаемыми особями растений. Камера Panasonic Lumix DMC-FZ100 (14000 Мп) была установлена на палке на высоте 25 см от поверхности почвы (т.е. примерно на высоте листьев орхидеи). Было сделано по пять фотографий из каждой точки: зенит (Z), 45° от зенита на юг (S), запад (W), восток (E) и север (N) соответственно. Фотографии были сделаны в конце июня—июле 2012 г. Фотографии были изучены с помощью программы ImageJ для расчета процента открытого неба. В центрально-западной части России прямое солнечное и диффузное излучение неба приблизительно равны (Абакумова и др., 2012), поэтому мы использовали следующее уравнение для расчета общего процента открытого неба для каждой точки:

$$T = (Z + E + W + 1.5S + N/1.5)/5$$

где Z, E, W, S, N – процент открытого неба для соответствующих направлений. Из-за различной структуры полога кустарника/дерева некоторые значения немного превышали 100%; они были скорректированы до 100% (табл. 1).

<sup>13</sup>С-анализ. Изотопный состав углерода исследовали с помощью элементного анализатора (NC2500, ThermoQuest Italia, Родана, Италия), соединенного с масс-спектрометром (Delta Plus, Thermo-Quest Finnigan, Бремен, Германия). Для калибровки использовались USGS 40 и USGS 41 (L-глутаминовая кислота; Геологическая служба США). Воспроизводимость анализа  $\delta^{13}$ С была определена путем повторного анализа внутреннего стандарта (растительный материал с 45.7% С и  $\delta^{13}$ С = -28.50%), который изменялся только в пределах 0.15% (*n* = 3). Содержание стабильных изотопов определяли с помощью формулы:

$$\delta^{13}$$
C (‰) = ( $R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}$ )/ $R_{\text{standard}} \times 1000$ ,

где  $R_{\text{sample}}$  и  $R_{\text{standard}}$  обозначают отношения <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C образца и стандарта Vienna PeeDee Belemnite (VPDB) соответственно.

Статистика. Мы проверили гипотезу с помощью двух взаимодополняющих тестов. Сначала подвергли данные по  $\delta^{13}$ С трехстороннему полнофакторному ANOVA с затенением (да или нет), типом растения (орхидея или контроль) и идентичностью пары видов орхидея—контроль (восемь пар видов), проверяя значимость взаимодействия между факторами "затенение" и "тип растения" (орхидея или контроль). Затем исследовали корреляции Пирсона между  $\delta^{13}$ С и интенсивностью света для орхидей и автотрофных растений соответственно.

Среди изученных растений некоторые виды орхидей рассматриваются как частичные микогетеротрофы, имеющие симбиотические связи с эктомикоризными грибами (*Epipactis atrorubens*, *Platanthera bifolia*, *Listera ovata* – Tedersoo et al., 2007; *E. helleborine*, *L. ovata* – Selosse, Roy, 2009). Для *Dactylorhiza* spp. и *Gymnadenia conopsea* в качестве микоризных грибов были отмечены в основном *Rhizoctonias* s.l. Мы сравнили реакцию на тень для этих R-орхидей с другими изученными орхидеями, подвергнув видовые средние значения  $\delta^{13}$ С орхидей и парных автотрофных растений трехфакторному дисперсионному анализу (ANO-VA) для изучения значимости взаимодействия

	omicanno j nacina, openino je					acting radius can	
Популяция Nº*	Местоположение**	Местонахождение	Сообщество	% открытого неба – свет	% открытого неба – тень	Орхидея и контрольный вид	ТМГ орхидей***
1 (50)	МО, Приокско-террасный заповелник	54°54' с.ш. 37°37' в л	Смешанные болеатъные теса	43.1	19.8	Dactylorhiza fuchsii	R
						Convallaria majalis	
2 (10)	ВО, Национальный парк "Русский Север"	59°53' с.ш. 38°17' в п	Разнотравный луг с кустарниками	100	62.9	Listera ovata	ш
						Fragaria vesca	
3 (10)	ВО, Национальный парк "Русский Север"	59°53' с.ш. 38°17' в п	Разнотравный луг с кустарниками	100	72.2	Gymnadenia conopsea	R
			C NYCI GPT I NGWI			Fragaria vesca	
4 (10)	КО, Национальный парк "Кулпиская коса"	55°06' с.ш. 20°44' в л	Сосновый лес на песчаной почве	76.3	36.5	Epipactis atrorubens	ш
		-				Hieracium umbellatum	
5 (10)	МО, Звенигородская биологи- ческая станния Плиино.	55°42' с.ш. 36°46' в п	Разнотравный луг с кустарниками	94.6	43	Platanthera bifolia	ш
		t a of	C NYCI april Nawr			Taraxacum officinale	
6 (10)	ВО, Национальный парк "Русский Севел"	59°53' с.ш. 38°17' в п	Разнотравный луг с кустарниками	100	37.8	Epipactis helleborine	ш
						Fragaria vesca	
7 (10)	МО, Пущино	54°49' с.ш. 37°36' в п	Вторичный березовый лес	22.3	12.5	Epipactis helleborine	ш
		tra oc lo				Convallaria majalis	
8 (10)	КЧР, Тебердинский государ- ственный заповелник	43°26' с.ш. 41°42' в.л	Субальпийское болото	92.4	18.6	Dactylorrhiza euxina	R
	2400 м над ур. м.					Carex nigra	
Примечание.	* – в скобках указано количество	о образцов растений	на пару. ** – Московская обла	сть (МО), Воло	годская области	, (BO), Калининградская	область (КО),

Таблина 1. Описание участка: средние условия освещенности для "световой" и "теневой" и исследованные пары видов

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ том 83 Nº 1 2022

СВЕТ И <sup>13</sup>С: ОТЛИЧАЮТСЯ ЛИ ОРХИДЕИ

65

Карачаево-Черкеская Республика (КЧР). Тип микоризных грибов (ТМГ) орхидей на основе молекти имот, ролюгодская ооласть (ВО), Калининградская область (КО), работах (Hadley, 1970; Rasmussen, 1995; Tedersoo et al., 2007; Selosse, Roy, 2009, и др.). \*\*\* R – R-орхидеи, E – орхидеи с ЭМГ, но, возможно, имеющие также некоторые ризоктонии.

ОНИПЧЕНКО и др.



**Рис. 1.** Характеристики  $\delta^{13}$ С растений в ответ на затенение для видов орхидей и их парных автотрофных видов сосудистых растений (средние значения и стандартные ошибки). Светло-голубой –  $\delta^{13}$ С у контрольного автотрофного растения, растушего в тени; розовый –  $\delta^{13}$ С у контрольного автотрофного растения, растущего в светлых условиях; темно-синий –  $\delta^{13}$ С у орхидеи, растущей в тени; красный –  $\delta^{13}$ С у орхидеи, растущей в хорошо освещенной среде. Столбики срезаны при значении  $\delta^{13}$ С = –25‰, что близко к значению  $\delta^{13}$ С, зарегистрированному для полностью микогетеротрофных растений (Gebauer, Meyer, 2003; Tedersoo et al., 2007).

микоризных грибов (R-орхидеи против орхидей с ЭМГ), типа растения (орхидея против автотрофного растения) и доступности света (свет против условий затенения).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Трехфакторный дисперсионный анализ выявил значимое взаимодействие между затенением и принадлежностью растений к орхидеям (орхидея против контроля;  $F_{df = 1.223} = 4.19$ , P = 0.041), указывающее на то, что орхидеи реагировали на затенение иначе, чем контрольные растения, демонстрируя лишь незначительное снижение значений  $\delta^{13}$ C на 0.84 ± 0.39‰ (среднее ± SE по восьми видам), по сравнению с восемью парными автотрофными видами растений, которые снизили средние значения  $\delta^{13}$ C на 2.38 ± 0.40‰ (рис. 1).

При объединении средних значений для всех восьми пар изученных видов обнаружена значительная, но довольно слабая положительная корреляция между процентом открытого неба и значениями  $\delta^{13}$ С листьев для орхидей ( $r^2 = 0.44$ , P = 0.0017), в то время как для контрольных растений корреляция была намного сильнее ( $r^2 = 0.74$ ,



**Рис. 2.** Значения  $\delta^{13}$ С растений в ответ на затенение для R-орхидей и орхидей с ЭМГ и их парных автотрофных сосудистых растений. Светло-голубой –  $\delta^{13}$ С у контрольного автотрофного растения, растущего в тени; розовый –  $\delta^{13}$ С у контрольного автотрофного растения, растущего в хорошо освещенных условиях; темно-синий –  $\delta^{13}$ С у орхидей, растущих в тени; красный –  $\delta^{13}$ С у орхидей, растущих в хорошо освещенных условиях.

P < 0.0001). Таким образом, полученные данные подтвердили ожидания более сильной корреляции между  $\delta^{13}$ С и относительной освещенностью для контрольных растений, чем для орхидей.

Реакция R-орхидей на тень была довольно похожа на реакцию орхидей с ЭМГ. Значения  $\delta^{13}$ С в ответ на тень у R-орхидей (три вида) снижались немного больше, чем у орхидей с ЭМГ (пять видов), но все же меньше, чем у их парных автотрофных растений (рис. 2). Взаимодействие между типом микоризы, типом растения и доступностью света не было значимым ( $F_{1.28} = 0.091, P = 0.8$ ), что подтверждает предположение о том, что R-орхидеи реагируют на тень аналогично другим орхидеям и оба типа орхидей отличаются по реакции от автотрофных растений.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

#### 13С в тени

Мы продемонстрировали на широком спектре видов орхидей в сравнении с другими сосудистыми видами и в полевых условиях, что частично микогетеротрофные орхидеи снижают содержание  $\delta^{13}$ С в тканях меньше, чем полностью автотрофные растения (не орхидеи), в ответ на теневые условия. Это сильное косвенное доказательство предположения о том, что частично микогетеротрофные орхидеи зависят от углерода почвенных грибов в условиях, когда их собственная фотосинтетическая продукция ограничена. Некоторые предыдущие исследования продемонстрировали аналогичные закономерности для отдельных видов орхидей. Например, Прайс и соавторы (Preiss et al., 2010) отметили положительную корреляцию между  $\delta^{13}$ С и перехватом света для "неорхидных" автотрофов, но не обнаружили такой же корреляции для видов р. *Серhalanthera* (ЧМГ).

Полностью микогетеротрофные растения в лесах умеренной зоны имеют относительно схожие значения  $\delta^{13}$ C. Neottia nidus-avis в нашем исследовании имела значение  $\delta^{13}$ С  $-24.67 \pm 0.27\%$ (n = 6), что несколько выше, чем у МГ *Monotropa hypopithys* ( $\delta^{13}$ C  $-25.9 \pm 0.2\%$ ), о котором сообщали Тедерсу с соавт. (Tedersoo et al., 2007), но ниже, чем у *N. nidus-avis* в Баварии ( $\delta^{13}$ C  $-22.8 \pm 0.2\%$ ; Gebauer, Meyer, 2003). Согласно линейной смешанной модели с двумя источниками (Gebauer, Mever, 2003), в хорошо освещенной среде в нашем исследовании доля углерода грибного происхождения колебалась для двух популяций *E. helleborine* от 4 до 27%, в то время как для *E. at*rorubens это значение составляло 16%. В тенистых условиях расчетные значения доли углерода грибного происхождения были следующими: D. euxina – 3%, E. atrorubens – 49%, E. helleborine – 36%, G. conopsea – 25%, L. ovata – 9%. Доля углерода, полученного с помощью грибов, была выше в тени, чем при хорошем освещении.

Чтобы уменьшить потерю воды через диффузию из устьиц, сосудистые растения обычно уменьшают плотность устьиц в тенистых условиях, где фотосинтез ограничен доступностью света, а не скоростью поглощения CO<sub>2</sub> (Peat, Fitter, 1994). Орхидеи, благодаря частичной микогетеротрофии, менее зависимы от собственного фотосинтеза, чем полностью автотрофные растения, особенно в условиях тени, где они увеличивают долю углерода, получаемого от грибов (Preiss et al., 2010). Поэтому ожидается, что в тени они будут снижать плотность устьиц даже сильнее, чем полностью автотрофные растения. Действительно, полностью гетеротрофные растения обычно не имеют или имеют очень ограниченное число устьиц из-за независимости от собственного фотосинтеза (Leake, 1994). Мы провели дополнительное исследование плотности устьиц в двух парах растений: D. fuchsii -C. majalis и E. atrorubens – Н. umbellatum. В обоих случаях мы наблюдали снижение устьичной плотности в условиях затенения, но вопреки ожиданиям это снижение было выше или сходным у контрольных растений, чем у орхидей: не было значительных различий для пары E. atrorubens – H. umbellatum, a D. fuchsii даже показал меньшее снижение устьичной плотности в ответ на затенение, чем C. majalis (F<sub>196</sub> = 9.5273, P = 0.003). Таким образом, предварительные данные не подтвердили априорные ожидания о более выраженном сокращении устьиц у орхидей по сравнению с другими видами в условиях затенения. Это может быть объяснено меньшей пластичностью растений ЧМГ по сравнению с полностью автотрофными растениями в отношении устьичной плотности. Таким образом, на пути к полной микогетеротрофии плотность устьиц является относительно консервативным признаком. Наблюдения за полностью гетеротрофными альбиносными (т.е. нефотосинтезирующими) формами Cephalanthera damasonium показали сходную плотность устьиц для зеленых и альбиносных растений (Roy et al., 2013). Более того, у растений-альбиносов этого вида устьичная проводимость была в 2 раза выше (Julou et al., 2005) по сравнению с автотрофными растениями. Таким образом, плотность устьиц, с одной стороны, в целом эволюционно относительно консервативна, а с другой – менее пластична у орхидей по сравнению с другими растениями. Мы предполагаем, что последнее может быть связано с обеспечением растений водой от симбиотических грибов. Известно, что арбускулярная микориза, а также эктомикоризные грибы могут улучшать водный режим своих растений-хозяев (Augé, 2001; Smith et al., 2010). Транспорт воды микоризными грибами орхидей изучен недостаточно хорошо (Smith, Read, 2008), но мы не обнаружили никаких признаков ингибирования такого транспорта. Если грибы поставляют значительное количество воды растениям, транспирация орхидей может быть менее ограниченной, чем у контрольных растений, и может привести к меньшему снижению плотности устьиц в более затененных условиях.

#### Орхидеи, ассоциированные с ризоктонией, в сравнении с другими орхидеями

Согласно Селоссе и Мартосу (Selosse, Martos, 2014). ЧМГ орхидеи могут не изменять  $\delta^{13}$ С по сравнению с другими растениями, если они образуют симбиоз с грибами ризоктонии, которые не обогашены  $\delta^{13}$ С. Наши результаты согласуются с предположением о том, что реакция на тень (разница в  $\delta^{13}$ С между растениями в хорошо освещенной и затененной среде) у R-орхидей сходна с реакцией орхидей с ЭМГ (из-за меньшей зависимости от фотосинтеза) и отличается от "неорхидных" видов. Когда свет становится ограничивающим фактором, некоторые, но не все зеленые орхидеи могут увеличить поступление углерода от грибов: обнаружено для двух видов Cephalanthera (Preiss et al., 2010), не обнаружено для Goodyera (Liebel et al., 2015) и Cypripedium calceolus (Preiss et al., 2010). Среди исследованных нами видов некоторые орхидеи считаются частично микогетеротрофными (E. atrorubens, P. bifolia, L. ovata – Tedersoo et al., 2007; E. helleborine, L. ovata - Selosse, Rov. 2009; E. helleborine, G. conopsea, P. bifolia – Schiebold et al., 2018). На основании полученных результатов можно поддержать мнение Селоссе и Мартоса (Selosse, Martos, 2014) о том, что в условиях затенения все изученные наземные орхидеи могут быть ЧМГ, но иногда это может быть не распознано по значениям  $\delta^{13}$ С из-за сходства  $\delta^{13}$ С у симбиотических грибов ризоктонии и зеленых растений. Наш метод (сравнение разницы в содержании  $\delta^{13}$ С между более и менее освешенными растениями в природе) позволил получить доказательства микогетеротрофии всех изученных орхидей. Таким образом, наше исследование предоставило эмпирические доказательства в поддержку точки зрения Штокеля с соавт. (Stöckel et al., 2014, р. 606) о том, что "частичная микогетеротрофия может быть гораздо более широко распространена среди орхидей, чем предполагалось до сих пор", и дает новое понимание экологического значения микоризных ассоциаций у орхидей.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят М.-А. Селоссе за полезное обсуждение и ценные замечания.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-04-00544).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов какихлибо исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абакумова Г.М., Горбаренко Е.В., Незваль Е.И., Шиловцева О.А., 2012. Климатические ресурсы солнечной энергии Московского региона. Москва: URSS. 310 с.
- *Allen M.F.*, 1991. The Ecology of Mycorrhizae. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 200 p.
- Augé R.M., 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis // Mycorrhiza. V. 11. P. 3–42.
- Billings S.A., Richter D.D., 2006. Changes in stable isotopic signatures of soil nitrogen and carbon during 40 years of forest development // Oecologia. V. 148. № 2. P. 325– 333.
- Bowling D.R., Pataki D.E., Randerson J.T., 2008. Carbon isotopes in terrestrial ecosystem pools and CO<sub>2</sub> fluxes // New Phytol. V. 178. № 1. P. 24–40.
- Brooks J.R., Flanagan L.B., Buchmann N., Ehleringer J.R., 1997. Carbon isotope composition of boreal plants: Functional grouping of life forms // Oecologia. V. 110. № 3. P. 301–311.
- Cernusak L.A., Ubierna N., Winter K., Holtum J.A.M., Marshall J.D., Farquhar G.D., 2013. Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants // New Phytol. V. 200. № 4. P. 950–965.
- Dearnaley J.D.W., 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research // Mycorrhiza V. 17. P. 475–486.
- *Dearnaley J.D.W., Martos F, Selosse M.-A.*, 2012. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects // Fungal Associations. The Mycota IX / Ed. Hock B. Berlin: Springer Verlag. P. 207–230.
- *Duursma R., Marshall J.*, 2006. Vertical canopy gradients in δ<sup>13</sup>C correspond with leaf nitrogen content in a mixed-species conifer forest // Trees Struct. Funct. V. 20. № 4. P. 496–506.
- *Gebauer G., Meyer M.*, 2003. <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association // New Phytol. V. 160. № 1. P. 209–223.
- Gebauer G., Preiss K., Gebauer A.C., 2016. Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed // New Phytol. V. 211. № 1. P. 11–15.
- Girlanda M., Segreto R., Cafasso D. et al., 2011. Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations // Am. J. Bot. V. 98. № 7. P. 1148–1163.
- Hadley G., 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza // New Phytol. V. 69. № 4. P. 1015– 1023.
- Hynson N.A., Madsen T.P., Selosse M.-A., Adam I.K.U., Ogura-Tsujita Y. et al., 2013. The physiological ecology of mycoheterotrophy // Mycoheterotrophy: The Biolo-

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ том 83 № 1 2022

gy of Plants Living on Fungi / Ed. Merckx V.S.F.T. N.-Y.: Springer. P. 297–342.

- Julou T., Burghardt B., Gebauer G., Berveiller D., Damesin C., Selosse M.-A., 2005. Mixotrophy in orchids: Insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic mutants of *Cephalanthera damasonium* // New Phytol. V. 166. № 2. P. 639–653.
- Lallemand F, Figura T, Damesin C., Fresneau C., Griveau C. et al., 2019. Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs // New Phytol. V. 221. № 1. P. 12–17.
- Leake J.R., 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants // New Phytol. V. 127. № 2. P. 171–216.
- Liebel H.T., Bidartondo M.I., Gebauer G., 2015. Are carbon and nitrogen exchange between fungi and the orchid *Goodyera repens* affected by irradiance? // Ann. Bot. V. 115. № 2. P. 251–261.
- Martos F., Dulormne M., Pailler T., Bonfante P., Faccio A. et al., 2009. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids // New Phytol. V. 184. № 3. P. 668–681.
- Mayor J.R., Schuur E.A.G., Henkel T.W., 2009. Elucidating the nutritional dynamics of fungi using stable isotopes // Ecol. Lett. V. 12. № 2. P. 171–183.
- Merckx V.S.F.T., 2013. Mycoheterotrophy: an introduction // Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi / Ed. Merckx V.S.F.T. N.-Y.: Springer. P. 1–17.
- *Merckx V., Stockel M., Fleischmann A., Bruns T.D., Gebauer G.,* 2010. <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C natural abundance of two mycoheterotrophic and a putative partially mycoheterotrophic species associated with arbuscular mycorrhizal fungi // New Phytol. V. 188. № 2. P. 590–596.
- Peat H.J., Fitter A.H., 1994. A comparative study of the distribution and density of stomata in the British flora // Biol. J. Linn. Soc. V. 52. № 4. P. 377–393.
- Preiss K., Adam I.K.U., Gebauer G., 2010. Irradiance governs exploitation of fungi: Fine-tuning of carbon gain by two partially myco-heterotrophic orchids // Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci. V. 277. № 1686. P. 1333– 1336.
- Rasmussen H.N., 1995. Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 444 p.
- Roy M., Gonneau C., Rocheteau A. et al., 2013. Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ // Ecol. Monogr. V. 83. № 1. P. 95–117.
- Salisbury E.J., 1928. On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora // Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B. V. 216. P. 1–65.
- Schiebold J.M.-I., Bidartondo M.I., Lenhard F., Makiola A., Gebauer G., 2018. Exploiting mycorrhizas in broad daylight: Partial mycoheterotrophy is a common nutritional strategy in meadow orchids // J. Ecol. V. 106. № 1. P. 168–178.
- Schweiger J.M.-I., Bidartondo M.I., Gebauer G., 2018. Stable isotope signatures of underground seedlings reveal the organic matter gained by adult orchid from mycorrhizal fungi // Funct. Ecol. V. 32. № 4. P. 870–881.
- Selosse M.-A., Martos F., 2014. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? // Trends Plant Sci. V. 19. № 11. P. 683–685.
- Selosse M.-A., Roy M., 2009. Green plants that feed on fungi: Facts and questions about mixotrophy // Trends Plant Sci. V. 14. № 2. P. 64–70.

- Selosse M.-A., Charpin M., Not F, 2017. Mixotrophy everywhere on land and in water: The grand ecart hypothesis // Ecol. Lett. V. 20. № 2. P. 246–263.
- Smith S.E., Read D., 2008. Mycorrhizal Symbiosis. L.: Elsevier. 800 p.
- Smith S.E., Facelli E., Pope S., Smith F.A., 2010. Plant performance in stressful environments: Interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas // Plant Soil. V. 326. № 1. P. 3–20.
- Sommer J., Pausch J., Brundrett M.C., Dixon K.W., Bidartondo M.I., Gebauer G., 2012. Limited carbon and mineral nutrient gain from mycorrhizal fungi by adult Australian orchids // Am. J. Bot. V. 99. № 7. P. 1133–1145.
- Stöckel M., Tesitelova T., Jersáková J., Bidartondo M.I., Gebauer G., 2014. Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature // New Phytol. V. 202. № 2. P. 606–615.
- Suetsugu K., Ohta T., Tayasu I., 2018. Partial mycoheterotrophy in the leafless orchid Cymbidium macrorhizon // Am. J. Bot. V. 105. № 9. P. 1595–1600.

- Tedersoo L., Pellet P., Koljalg U., Selosse M.-A., 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: Ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae // Oecologia. V. 151. № 2. P. 206–217.
- Těšitel J., Těšitelová T., Minasiewicz J., Selosse M.-A., 2018. Mixotrophy in land plants: Why to stay green? // Trends Plant Sci. V. 23. № 8. P. 656–659.
- Zhou Y., Fan J., Zhang W., Harris W., Zhong H., et al., 2011. Factors influencing altitudal patterns of C<sub>3</sub> plant foliar carbon isotope composition of grasslands on the Qinghai-Tibet Plateau, China // Alp. Bot. V. 121. № 2. P. 79–90.
- Zhu Y., Siegwolf R.T.W., Durka W., Körner C., 2010. Phylogenetically balanced evidence for structural and carbon isotope responses in plants along elevational gradients // Oecologia. V. 162. № 4. P. 853–863.

## Light and <sup>13</sup>C: Are orchids different from other vascular plants in their response to shade?

## V. G. Onipchenko<sup>*a*, \*</sup>, J. H. C. Cornelissen<sup>*b*</sup>, M. G. Vakhrameeva<sup>*a*</sup>, L. D. Zakharova<sup>*c*</sup>, A. A. Akhmetzhanova<sup>*a*</sup>, M. I. Khomutovskiy<sup>*a*</sup>, R. van Logtestijn<sup>*b*</sup>, and N. A. Soudzilovskaia<sup>*d*</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Department of Ecology and Plant Geography Leninskiye Gory, 1, bld. 12, Moscow, 119234 Russia

<sup>b</sup>Vrije Universiteit Amsterdam Systems Ecology, Faculty of Earth and Life Sciences, Department of Ecological Science De Boelelaan, 1085, Amsterdam, 1081 HV Netherlands

> <sup>c</sup>State Darwin Museum Vavilova, 57, Moscow, 117292 Russia

<sup>d</sup>Leiden University, Institute of Environmental Sciences (CML) Einsteinweg, 2, Leiden, 2333 CC Netherlands

\*e-mail: vonipchenko@mail.ru

Orchids have symbiotic relationships with ectomycorrhizal or saprotrophic ("rhizoctonia") fungi, which provide plants with nutrients. The extent of plant dependency on fungi for carbon supply is reflected by plant tissue  $\delta^{13}$ C abundance values. Little is known about how wide-spread partial mycoheterotrophy (PMH) is among orchids in nature and it is debated whether rhizoctonia-associated orchids possess mycoheterotrophy. Using orchids with ectomycorrhizal fungi and rhizoctonia-associated orchid species, we tested one hypothesis: terrestrial green orchids decrease their  $\delta^{13}$ C values in response to shade less than neighboring non-orchid vascular plants (evidence for PMH). We examined eight pairs of plant species (orchid paired with reference autotrophic plant growing close-by) in well-lit versus shady field conditions in replicated sites across the European part of Russia. In each site illumination level was recorded and plant material was examined for  $\delta^{13}$ C. We found that all tested orchids showed similar weaker response of tissue  $\delta^{13}$ C signature to relative light exposure in contrast to the stronger response in control plants, suggesting wide-spread PMH among orchids. There was no significant difference in orchids with ectomycorrhizal fungi and rhizoctonia-associated orchids in response of  $\delta^{13}$ C to shade, supporting mycoheterotrophic mechanisms of carbon transfer to plants in rhizoctonia-associated orchids. Proportions of fungi-derived carbon for individual orchid species ranged between 3 and 50%. Orchids reduced stomatal density in response to shade less or similarly to autotrophic plants, suggesting that mycoheterotrophic plants might be somewhat less water limited than autotrophic species due to fungal water supply. Our data provide support for broad prevalence of PMH among orchids and of the existence of PMH in rhizoctonia-associated orchids. These findings extend the ecological importance of mycorrhizal associations in belowground food webs.

УДК 581.5

## АДАПТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ (AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA L., ASTERACEAE) В СВЯЗИ С ЕЕ ПРОДВИЖЕНИЕМ НА СЕВЕР: ОПЫТ БИОКЛИМАТИЧЕСКОГО И ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И МОДЕЛИРОВАНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ИНВАЗИВНОГО ВИДА

© 2022 г. А. Н. Афонин<sup>1,</sup> \*, О. Г. Баранова<sup>2</sup>, Ю. Ю. Кулакова<sup>3</sup>, Ю. А. Федорова<sup>4</sup>, Д. Р. Владимиров<sup>5</sup>, А. В. Герус<sup>6</sup>, Е. Ю. Герус<sup>6</sup>, А. Я. Григорьевская<sup>5</sup>, Т. Ю. Закота<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия <sup>2</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376 Россия <sup>3</sup>Всероссийский центр карантина растений ул. Пограничная, 32, р. п. Быково, Раменское, 140150 Россия <sup>4</sup>Уфимский Институт Биологии УФИЦ РАН просп. Октября, 69, Уфа, 450054 Россия <sup>5</sup>Воронежский государственный университет ул. Хользунова, 40, Воронеж, 394068 Россия <sup>6</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений ш. Подбельского, 3, Санкт-Петербург, 196608 Россия \*E-mail: acer737@yandex.ru Поступила в релакцию 13.10.2021 г. После доработки 03.11.2021 г. Принята к публикации 26.11.2021 г.

В основе оперативной генотипической адаптации растений к недостатку тепла лежит регуляция перераспределения ресурсов тепла между вегетативной и генеративной фазами развития. У короткодневных растений, цветущих при сокращающейся длине дня, перераспределение ресурсов тепла между фазами регулируется механизмом фотопериодической чувствительности. Растения, зацветающие при более длинном дне, переходят в генеративную фазу развития раньше и тем самым получают больше ресурсов тепла на созревание семян. При этом сокращается продолжительность и теплообеспеченность вегетативной фазы. в результате чего уменьшается вегетативный рост растений и потенциальная семенная продуктивность. Это приводит к снижению конкурентоспособности растений в ценозах. Оптимальный баланс между продолжительностью вегетативной и генеративной фаз в каждой зоне индивидуален и достигается в процессе естественного отбора генотипов на оптимальный для условий зоны порог фотопериодической чувствительности. В статье рассмотрены особенности порогов фотопериодической чувствительности растений амброзии полыннолистной Атbrosia artemisiifolia (Asteraceae) с южной и северной границ вторичного ареала в связи с особенностями динамики фотопериода и температурных условий их местообитаний. Дается прогноз возможности продвижения ареала к северу, которая связана как с потенциальной вариабельностью генотипов, так и с тенденциями потепления климата.

DOI: 10.31857/S0044459622010080

Условием выживания популяций однолетних видов растений является их способность стабильно из года в год формировать за период вегетации число семян, достаточное для перманентного возобновления популяции. Перманентность воспроизводства достигается сбалансированностью сезонной и многолетней динамики развития растений с локальной динамикой экологических факторов среды — абиотических и биотических. В условиях дефицита ресурсов тепла цикл онтогенеза растений должен укладываться в период вегетации, возможный на территории их распространения. Потребности растений натурализовавшейся популяции в тепле не могут выходить за пределы теплообеспеченности территории.

Жизненный цикл однолетних растений подразделяется на периоды вегетативного и репродуктивного развития. В вегетативный период происходит рост растений и формирование их габитуса. При этом решаются задачи конкуренции с другими растениями в ценозе и формируется потенциал для последующего продуцирования семян. В репродуктивный период, если рассматривать его от начала пыления и завязывания семян, прекращается вегетативный рост растений, и основные потоки ассимилятов перенаправляются на созревание семян. Оптимальный баланс в распределении ресурсов тепла между вегетативной и репродуктивной фазами может быть разным для разных климатических зон. Удлинение продолжительности и, соответственно, теплообеспеченности одной фазы снижает теплообеспеченность другой. Удлинение продолжительности репродуктивной фазы гарантирует большую вероятность вызревания семян даже в самые холодные годы, но при этом замедляется вегетативный рост растений, в связи с чем, в частности, снижается их конкурентоспособность.

Дата перехода от вегетативного к репродуктивному развитию определяется настройкой чувствительности растений к внешним сигнальным факторам. Для короткодневных видов сигнальным фактором является сокращение длины дня до определенного порогового значения. Зацветание растений при более длинном дне увеличивает период их репродуктивного развития, при более коротком — увеличивает период вегетативного развития.

В основе адаптивной стратегии инвазивных видов растений при продвижении их на север лежит прежде всего модификация систем чувствительности к пороговым значениям сигнальных факторов среды. Генетически обусловленные различия порога фотопериодической чувствительности у растений одной популяции и вариация этих порогов у разных популяций позволяют синхронизировать динамику развития растений с разнообразными локальными особенностями сезонной динамики экологических факторов среды в зоне инвазии. При оптимальном пороге фотопериодической чувствительности растения локальной популяции переходят от вегетативной к репродуктивной фазе развития в оптимальные даты. Оптимальной для перехода к генеративному развитию считается дата, которая обеспечивает наилучший баланс вегетативного и генеративного развития растений популяции, и в итоге как успешное противодействие биоценотическому прессу, так и стабильное и достаточное для перманентного существования популяции воспроизводство фертильных семян.

Амброзия полыннолистная (Ambrosia artemisiifolia L.) – вредоносный вид, засоряющий поля

и вызывающий приступы астмы у людей, страдающих аллергией на его пыльцу. Амброзия была занесена в Евразию из Америки и начала свое распространение более столетия назад. В настоящее время северная граница ее массовой натурализации на европейской территории России проходит по Курской, Воронежской, Саратовской областям. Вторичный ареал амброзии до сих пор не стабилизировался. Поэтому перспективы расширения ареала вида вызывают большой интерес и тревогу. A. artemisiifolia - короткодневное растение, и ее цветение приходится на конец лета, когда длина дня уменьшается до порогового значения, которое является сигналом для начала цветения (Allard, 1945). Порог зацветания растений северных популяций амброзии приходится на более длинный день, чем южных, т.е. на более ранние даты (Dickerson, Sweet, 1971). Это увеличивает продолжительность репродуктивного периода и предоставляет дополнительные ресурсы тепла, необходимые завязавшимся семенам для созревания. Поэтому потенциал продвижения амброзии на север характеризуется прежде всего размахом вариации особей и популяций вида по значениям порога фотопериодической чувствительности.

В ранее проведенных географических опытах с популяциями амброзии полыннолистной разного происхождения были выявлены различия в сроках зацветания северных и южных популяций (Genton et al., 2005; Leiblein-Wild et al., 2014; Li et al., 2015; Scalone et al., 2016). Было установлено, что растения северных популяций в условиях более высоких широт переходят в генеративную фазу раньше, чем растения южных популяций. При этом связь потенциала распространения и натурализации растений, характеризующихся разными фотопериодическими порогами, с температурными условиями разных климатических зон количественно не оценивалась.

Цель нашего исследования — изучить вариацию порогов фотопериодической чувствительности растений популяций *A. artemisiifolia* разного происхождения, связав ее с региональной динамикой фотопериода и температурных условий периода созревания семян. На основе выявленных закономерностей определить экологический потенциал распространения *A. artemisiifolia* на север.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наблюдения за динамикой развития растений популяций *А. artemisiifolia* проводили в 2019—2020 гг. в четырех регионах России: г. Славянск-на-Кубани (Краснодарский край), г. Воронеж, г. Москва и г. Уфа.

Растения местных популяций изучали в естественных условиях в Славянске-на-Кубани (45.23° с.ш., 38.16° в.д.), расположенном в зоне
экологического оптимума амброзии, и в Воронеже (51.72° с.ш., 39.21° в.д.) – вблизи современной северной границы натурализации вида. Изучаемые растения отмечали бирками. В Краснодарском крае изучено 16 нумерованных растений, в Воронеже – 30. Фенологические наблюдения и биометрические измерения проводили на индивидуальных маркированных растениях по единой методике с интервалом в одну неделю. Наблюдения начинали проводить с начала июля – до перехода самых ранних растений в генеративную фазу. Измеряли высоту растений, динамику развития – число пар листьев на главном побеге, регистрировали даты перехода растений в генеративную фазу, начало и интенсивность пыления. дату появления первых зрелых плодов. С начала созревания плодов еженедельно оценивали динамику семенной продуктивности. Для этого проводили сбор созревших плодов со всего растения или, если растение крупное, с модельного среднего по семенной продуктивности побега. В последнем случае семенную продуктивность всего растения рассчитывали перемножением числа созревших плодов на модельном побеге на число побегов на растении.

Кроме наблюдений за местными популяциями, в 2020 г. по аналогичной метолике в вегетационных опытах был изучен одинаковый географический набор, включающий растения южной и северных популяций. Изучение проводили на стационарах в Москве (55.64° с.ш., 38.10° в.д.) и Уфе (54.76° с.ш., 56.13° в.д.), расположенных несколько севернее границы натурализации амброзии. Для посева были использованы семена, собранные в 2019 г. Семена растений южной популяции были собраны в Славянске-на-Кубани на дамбе р. Протоки, координаты 45.25° с.ш., 38.16° в.д. Семена растений трех популяций с северной границы вторичного ареала (северные популяции) были собраны на пустыре в Воронеже (51.72° с.ш., 39.21° в.д.) и на обочинах автомобильных дорог вблизи с. Каплино (Белгородская обл.; 51.35° с.ш., 37.82° в.д.) и п. Горшечного (Курская обл.; 51.52° с.ш., 37.99° в.д.). Наблюдения проводили за 10 растениями популяций разного происхождения, выращиваемыми в естественных климатических условиях.

Перевод фенологических дат в градусо-дни (суммы активных температур выше 10°С) производили по среднесуточным температурным данным ближайших метеостанций. Корректность использования метеостанционных данных для конкретных условий стационаров поверялась данными, снятыми с логгеров, которые закладывали на стационарных площадках. За порог активной вегетации амброзии принимали температуру выше 10°С. При оценке связи динамики развития амброзии с температурным фактором рассчитывали кумулятивные показатели сумм активных температур с порогом выше  $10^{\circ}$ C (CAT<sub>10</sub>). По аналогичной методике проводили наблюдения и в географических опытах на стационарах.

Примененная при оценке экологического потенциала продвижения *A. artemisiifolia* на север методика эколого-географического анализа и моделирования описана в работе А.Н. Афонина и Ю.В. Соколовой (2018). Для проведения экологогеографического моделирования были составлены карты сумм температур за период созревания семян — от даты начала пыления (переход через фотопериодические пороги 14, 15 и 15.5 ч) до окончания активной вегетации: карты САТ<sub>10</sub>фп<sub>14</sub>, САТ<sub>10</sub>фп<sub>15</sub>, САТ<sub>10</sub>фп<sub>15.5</sub>.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММ ТЕМПЕРАТУР, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ СОЗРЕВАНИЯ СЕМЯН *А. ARTEMISIIFOLIA*

Продолжительность созревания семян обусловлена температурным фактором. Считается, что длина дня не оказывает влияния на продолжительность созревания семян от момента их завязывания (Deen et al., 1998). Завязывание семян происходит при попадании пыльцы на рыльце пестика. В качестве маркера начала завязывания семян была принята фенологическая дата начала пыления. Суммы температур, необходимые для созревания первых семян маркированных растений, определяли как разницу между накопленными CAT<sub>10</sub> на дату появления первых зрелых плодов на растении и CAT<sub>10</sub> на дату начала пыления.

Средние значения САТ<sub>10</sub> за период созревания семян отличались у исследованных южных и северных популяций в их естественных местообитаниях (табл. 1).

Для успешной адаптации к условиям северной зоны начало пыления амброзии должно приходиться на дату, сумма температур от которой до конца вегетации гарантированно составляет не менее достаточных значений для вызревания минимального пула семян. Для северной воронежской популяции минимальное количество САТ<sub>10</sub>, достаточных для появления первых зрелых семян, составляет по нашим наблюдениям 608°С.

# РОЛЬ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ В АДАПТАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ *А. ARTEMISIIFOLIA* К ЛОКАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ ТЕПЛООБЕСПЕЧЕННОСТИ

Пыление амброзии растянуто во времени и начинается, как правило, с раскрывания нескольких цветков самых нижних корзинок терминальной кисти. В последующие дни последовательно раскрываются и пылят остальные цветки корзинки. Одновременно, по мере созревания верхних

	Суммы активных температур, °С			
Параметры	южная (славянская)	северная (воронежская)		
Среднее	716	608		
Минимальное	374	503		
Максимальное	1009	794		
Стандартное отклонение (SD)	167.6	68.1		
Количество растений	16	30		

**Таблица 1.** Суммы активных температур (САТ<sub>10</sub>), необходимые для появления первых зрелых семян *A. artemisiifolia* на растениях двух популяций разного происхождения в их естественных местообитаниях

корзинок кисти, их цветки также переходят к последовательному пылению. Боковые кисти дифференцируются и переходят к цветению позднее, чем терминальная. Все это в итоге приводит к растянутости периода пыления особи.

Отдельные особи популяции несколько различаются по порогу чувствительности к фотопериодическому сигналу, что приводит к неодновременности их зацветания и еще большей растянутости периода пыления в целом. Например, по наблюдениям Славянском на стационаре  $(45.2^{\circ} \text{ с.ш.})$ , самое раннее из отмеченных растений местной популяции начало пылить 7 августа при 14.5-часовом дне (т.е. при длине дня 14 ч 30 мин) и завершило пыление 4 сентября. Самые поздние из отмеченных в Славянске растений начинали пыление в начале сентября (13.1-часовой день) и закончили пылить в конце сентября. Таким образом, пыление особи может быть растянуто на месяц, а для популяции в целом этот период может длиться до двух месяцев и более. Средняя для всех изученных растений местной славянской популяции дата начала пыления пришлась на 20 августа. Длина дня на эту дату составила 13.9 ч. Эту длину дня можно считать фотопериодическим порогом пыления местной популяции амброзии, хотя понятно, что фотопериодический сигнал был принят растениями еще раньше, и переход в пылящее соцветие потребовал некоторого времени.

В Славянске подобная настройка механизма фотопериодического порога пыления приводит к тому, что первые завязи семян у растений местной популяции начинают образовываться в среднем с 20 августа, и до окончания периода активной вегетации на созревание семян популяция имеет CAT<sub>10</sub> порядка 1158°C за среднемноголетний период (рис. 1).

Учитывая, что на юге для формирования зрелых плодов *A. artemisiifolia* от момента их завязывания достаточно порядка 716°С (табл. 1), а физиологические CAT<sub>10</sub> от даты появления первых зрелых плодов до массового плодоношения составляют порядка 300°С, ориентация на 13.9-часовой день гарантирует популяции амброзии полыннолистной в условиях южной зоны стабильную теплообеспеченность периода вызревания не только самых ранних завязей, но и самой массо-

вой когорты семян, завязавшихся в период пика пыления.

Однако подобная настройка механизма фотопериодической чувствительности не универсальна в экологическом отношении для условий других зон. В географическом опыте 2020 г. растения южной славянской популяции, посеянные на более северных стационарах – в Москве (55.6° с.ш.) и Уфе (54.7° с.ш.), – перешли к пылению при длине дня, близкой к той, при которой они начинали пылить в Славянске – 13.6- и 13.5-часовой день соответственно (табл. 2). Но такая длина дня в Москве, в отличие от Славянска, приходится не на вторую декаду августа, а на 4 сентября. По среднемноголетним данным сумма активных температур выше 10°С от этой даты до конца активной вегетации составляет в Москве всего 238°С. Поэтому ресурсов тепла в Москве в среднемноголетнем аспекте недостаточно для созревания семян даже самых раннеспелых растений славянской популяции. Условия осени конкретного 2020 г. в Москве были аномально теплыми, и сумма активных температур от 4 сентября до конца вегетации составила 499°С. Но и этой суммы температур хватило на формирование только сравнительно небольшого количества зрелых семян у самых раннеспелых растений славянской популяции (табл. 3).

Как происходила адаптация A. artemisiifolia к условиям более северной зоны? Продвижение амброзии полыннолистной на север происходило постепенно из южного очага - предположительно, из Предкавказья и/или Крыма (Марьюшкина, 1986; Afonin et al., 2018) с начала 20-го столетия. Возможность продвижения обеспечивалась естественным отбором адаптированных к северным условиям генотипов из первоначальной инвазивной популяции и, возможно, дополнительным внешним заносом генотипов, еще более адаптированных к условиям северных зон (Genton et al., 2005). К настоящему времени некоторые из самых северных натурализовавшихся популяций A. artemisiifolia отмечены на севере Курской и Воронежской областей.

Стационарное изучение местной популяции амброзии в Воронеже показало, что растения с северной границы вторичного ареала отличаются



**Рис. 1.** Теплообеспеченность (50-процентная) периода созревания семян местной популяции *A. artemisiifolia* в Славянске-на-Кубани за период 1989–2018 гг. Ориентация начала пыления на 13.9-часовой день в условиях Славянска-на-Кубани за среднемноголетний период предоставляет местной популяции сумму активных температур 1158°C с порогом выше 10°C на созревание семян от начала их завязывания до окончания периода вегетации. САТ<sub>10</sub> периода вегетативного роста при этом составляет 2817°C (соответствует площади фигуры между осью абсцисс, линией графика и отрезками, спроецированными из соответствующих пограничных точек графика на ось абсцисс).

от растений южных популяций прежде всего порогом фотопериодической чувствительности. Самые ранние растения местной популяции начинали пыление в Воронеже 31 июля, т.е. при 15.5-часовом дне, самые поздние 20 августа – при 14.4-часовом дне. Средняя по отмеченным растениям местной воронежской популяции дата начала пыления пришлась в 2020 г. на 10 августа, длина дня на эту дату (фотопериодический порог завязывания семян местной популяции) составила 14.9 ч. В условиях Воронежа среднемноголетняя 50-процентная теплообеспеченность периода от начала пыления местных популяций, если оно ориентировано на 14.9-часовой день, составляет до окончания активной вегетации  $CAT_{10} = 819^{\circ}C$ (рис. 2).

Учитывая, что для созревания первых семян от даты начала пыления воронежской популяции необходима CAT<sub>10</sub> =  $608^{\circ}$ C (табл. 1), а CAT<sub>10</sub> от даты начала плодоношения до массового плодоношения составляет порядка 300°C, ориентация на

14.9-часовой день гарантирует воронежской популяции амброзии полыннолистной в местных условиях стабильную теплообеспеченность периода вызревания семян только ранних генотипов. Вероятность вызревания семян, завязавшихся в пик пыления изученной местной популяции, составляет в условиях Воронежа менее 50%. Смещение пика пыления на дату негарантированного вызревания семян может быть обусловлено как недолгой историей распространения A. artemisiifolia в Воронежской области, так и эффективностью механизма твердосемянности, позволяющего надежно депонировать семена более урожайных позднеспелых генотипов в почвенном банке. В такой ситуации механизм адаптации, базирующийся на производстве большего числа семян при меньшей гарантии, может иметь преимущество перед механизмом, основывающимся на гарантированном во всем ряде лет вызревании небольшого числа семян.

Таблица 2. Длина дня на даты начала пыления южной и северных популяций *A. artemisiifolia* в местах натурализации и при высаживании их на северных стационарах

Место		Славянская (Краснодарский край, 45.2° с.ш.)	Воронежская (Воронежская обл., 51.6° с.ш.)	Горшечное (Курская обл., 51.5° с.ш.)	Каплино (Белгородская обл., 51.4° с.ш.)
В местных условиях	Дата	20 августа	10 августа	-	—
	Длина дня, ч	13.9	14.9	—	—
В Москве (55.6° с.ш.)	Дата	4 сентября	15 августа	13 августа	10 августа
	Длина дня, ч	13.6	15.1	15.2	15.4
В Уфе (54.7° с.ш.)	Дата	4 сентября	16 августа	12 августа	1 августа
	Длина дня, ч	13.5	14.8	14.9	15.8

Параметры	Славянская (Краснодарский край, 45.2° с.ш.) ( <i>n</i> = 10)		Воронежская (Воронежская обл., 51.6° с.ш.) ( <i>n</i> = 10)		Каплино (Белгородская обл., 51.4° с.ш.) ( <i>n</i> = 10)		Горшечное (Курская обл., 51.5° с.ш.) ( <i>n</i> = 7)	
	среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD
САТ <sub>10</sub> от начала пыле- ния до конца активной вегетации, °С	499	58.6	845	51.0	927	126.9	877	173.4
Средняя семенная продуктивность на растение	264	458.4	1083	429.1	1399	410.3	1210	410.8

**Таблица 3.** Семенная продуктивность растений популяций *A. artemisiifolia* разного происхождения на Московском стационаре в связи с количеством тепла (CAT<sub>10</sub>) за период созревания их семян (стационар ВНИИКР, Москва,  $55.6^{\circ}$  с.ш., 2020 г.)

Аналогичными фотопериодическими порогами, способствующими раннему началу пыления, характеризуются растения и других популяций с северной границы распространения *A. artemisiifolia* на европейской территории России: Горшечное (Курская обл.) — 14.9—15.2-часовой день, Каплино (Белгородская обл.) — 15.4—15.8-часовой день (табл. 2).

Отметим, что растения одной популяции в условиях разных зон зацветают при примерно одинаковой длине дня, и что растения северных популяций зацветают при более длинном дне, чем южных.

Отбор генотипов, ориентированных на зацветание при более длинном дне, в условиях северного предела распространения *A. artemisiifolia* приводит к удлинению репродуктивного периода за счет сокращения периода вегетативного роста. В Воронежской области среднемноголетняя теплообеспеченность периода вегетативного роста для местной натурализовавшейся популяции составляет САТ<sub>10</sub> = 1994°С по сравнению с 2817°С для местной популяции, натурализовавшейся в Славянске-на-Кубани (рис. 1 и 2). Сокрашение периода вегетативного роста приводит к уменьшению теплообеспеченности этого периода и формированию упрощенного габитуса растений, а, следовательно, к падению конкурентоспособности растений в фитоценозе. Конкурентоспособность может снижаться как непосредственно из-за замедления вегетативного роста, а значит высоты растений, проективного покрытия листьев, мощности корневой системы, так и из-за сокращения потенциала семенной продуктивности, которая может быть связана с уменьшением перечисленных параметров и числа плодоносящих побегов. В Краснодарском крае мощные растения A. artemisiifolia конкурентоспособны в по-



**Рис. 2.** Теплообеспеченность (50%-ная) периода созревания семян местной популяции *A. artemisiifolia* в Воронеже за период 1998–2018 гг. Ориентация начала пыления на 14.9-часовой день в условиях Воронежа предоставляет местной популяции в среднем за многолетний период сумму активных температур CAT<sub>10</sub> = 819°C на созревание семян от начала их завязывания до окончания периода вегетации.

Метеостанции	Москва (27612)					Ворон	еж (34123)	
	14 ч/30.08*	15 ч/16.08	15.5 ч/9.08	16 ч/2.08	14 ч/24.08	15 ч/9.08	15.5 ч/31.07	16 ч/21.07
1989-1998	0	2	5	8	2	10	10	10
1999-2008	0	6	10	10	3	10	10	10
2009-2018	0	7	10	10	7	10	10	10

**Таблица 4.** Теплообеспеченность периода созревания семян *A. artemisiifolia* по десятилетиям в Москве и Воронеже с 1989 по 2018 год (выражена в числе лет из 10 с  $CAT_{10} \ge 608^{\circ}C$ )

\* В условиях Москвы дата перехода длины дня через 14 ч приходится на 30 августа.

севах подсолнечника и кукурузы. На севере Воронежской области амброзия уходит с полей и ее значительно более мелкие растения распространены преимущественно в рудеральных местообитаниях с нарушенным растительным покровом — на откосах дорог, участках строительства. Приспосабливаясь к условиям северной зоны увеличением продолжительности репродуктивного периода и, соответственно, повышая его теплообеспеченность, амброзия жертвует конкурентоспособностью в ценозах.

# ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОДВИЖЕНИЯ *А. ARTEMISIIFOLIA* НА СЕВЕР: ВПЕРЕДИ МОСКВА?

Насколько соответствует фотопериодическая настройка растений *A. artemisiifolia* с современной северной границы ареала возможности дальнейшего продвижения этого вида на север? Ответ на этот вопрос дает опыт выращивания растений *A. artemisiifolia* севернее современного предела распространения амброзии.

В проведенном нами в 2020 г. географическом опыте в Москве растения воронежской популяции начинали пыление 15 августа при 15.1-часовом дне — это примерно соответствует пороговой длине дня на дату начала пыления растений этой популяции и под Воронежем (14.9 ч). В условиях теплого 2020 г. сумма активных температур от этой даты до конца вегетации составила 845°С (рис. 3б), примерно столько, сколько характерно в среднем и для Воронежа. Такое количество тепла позволило растениям воронежской популяции образовать в 2020 г. в Москве существенное число зрелых семян – более тысячи на растение. В условиях аномально теплого года аналогичную высокую семенную продукцию в условиях Москвы продемонстрировали растения и других популяций амброзии с северных границ ее распространения – из Белгородской и Курской областей (табл. 3).

Однако средняя (50%-ная) за последние 30 лет теплообеспеченность в Москве за период от 15 августа до осеннего перехода среднесуточной температуры через  $10^{\circ}$ С составляет только 554°С (рис. 3*a*). Такое количество тепла является недостаточным для стабильного ежегодного вызревания семян воронежских генотипов.

Метеостанционные архивные данные позволяют проанализировать динамику теплообеспеченности периода созревания семян *A. artemisiifolia* в последние десятилетия. Если считать  $CAT_{10} = 608^{\circ}C$  (табл. 1) от начала пыления до конца активной вегетации минимумом, достаточным для вызревания необходимого для натурализации амброзии полыннолистной числа семян, то в Москве количество тепла, достаточное для вызревания самых раннеспелых из известных генотипов, приступающих к пылению при 15.5-часовом дне, в период 1989–1998 гг. отмечалось в 5 годах из 10 (табл. 4).

В последующие два десятилетия наблюдалось потепление климата, и теплообеспеченность последовательно возрастала. С 1999 г. для генотипов с порогом зацветания 15.5 ч все годы в Москве были достаточно теплыми для формирования того или иного числа семян. То, что такие генотипы до сих пор не получили распространения в Москве, может быть объяснено их редкостью (в популяции Горшечного таких растений примерно 1 из 10, в Каплинской популяции – 4 из 10), пониженной конкурентоспособностью раннеспелых генотипов, эффективной работой карантинных служб – массированные укосы обочин и рудеральных местообитаний в городской черте стали повсеместным в последнее десятилетие. Также это может быть обусловлено длительностью инвазионного процесса: отбора устойчивых генотипов, их размножения и распространения.

# КАРТОГРАФИРОВАНИЕ ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОДВИЖЕНИЯ *А. ARTEMISIIFOLIA* НА СЕВЕР

Биоэкологические исследования предоставляют данные, необходимые для прогноза распространения и сезонного развития видов. Ключевыми параметрами для биоклиматического прогноза распространения короткодневных видов растений являются вариации порогов чувствительности к сигнальным факторам среды и суммы температур, необходимые для прохождения ключевых фаз развития. Количественные параметры, полученные нами в результате стационарных гео-



**Рис. 3.** Теплообеспеченность (50%-ная) периода созревания семян популяций *A. artemisiifolia* из Воронежа (51.6° с.ш.) и Славянска-на-Кубани (45.2° с.ш.) в Москве за период 1998–2018 гг. (*a*), и количество тепла за период созревания семян этих популяций в 2020 году (*b*). Ориентация начала пыления южной славянской популяции на 13.6-часовой день в условиях Подмосковья предоставляет ей в среднем сумму активных температур 238°C с порогом выше 10°C на созревания семян от начала их завязывания — этого недостаточно для созревания семян. Более северная воронежская популяция, ориентированная на зацветание в условиях Подмосковья на 15.1-часовой день, имеет в среднем CAT<sub>10</sub> =  $554^{\circ}$ С, чего также недостаточно для формирования стабильного ежегодного урожая семян.

графических исследований и проведенного биоклиматического анализа популяций амброзии разного происхождения, позволяют уточнить эколого-географический потенциал продвижения на север генотипов *A. artemisiifolia* с разными фотопериодическими порогами пыления и представить потенциал натурализации амброзии в картографическом виде.

Мы рассмотрели перспективы продвижения на север генотипов с порогами начала пыления при 14-, 15-, 15.5- и 16-часовом дне. Были составлены четыре карты сумм активных температур с соответствующими фотопериодическими порогами:  $CAT_{\phi n14}$ ,  $CAT_{\phi n15}$ ,  $CAT_{\phi n15.5}$  и  $CAT_{\phi n16}$ . Пределом распространения считали изолинии сумм температур 608°С (см. табл. 1). Генотипы, переходящие к пылению при более коротком дне (более позднеспелые), имеют меньший потенциал распространения на север. Самые раннеспелые из известных к настоящему времени генотипы, переходящие к пылению при 15.5-часовом дне, имеют наибольший потенциал распространения и в условиях современного климата способны натурализоваться на европейской территории России и сопредельных стран: до северных границ Литвы, Минской, Могилевской, Брянской, Ульяновской и Тульской областей, юга Московской и севера Рязанской области, Мордовии, юга Татарстана и Башкортостана (рис. 4).



**Рис. 4.** Эколого-географический потенциал распространения на север европейской территории России экотипов *A. artemisiifolia* с разной фотопериодической чувствительностью. Синим цветом показана зона, к условиям теплообеспеченности которой могут адаптироваться растения, начало пыления которых ориентировано на 15–15.5-часовой день. Оранжевая зона оптимальна для экотипов, ориентированных на пыление при более чем 14-часовом дне. Зеленая зона по условиям теплообесспеченности периода созревания семян пригодна для экотипов с порогами фотопериодической чувствительностью. Синим цветом показана зона, к условиям теплообеспеченности периода созревания семян пригодна для экотипов с порогами фотопериодической чувствительности менее 14 ч. В отмеченной желтым зоне возможна натурализация предполагаемых генотипов с фотопериодической чувствительностью 15.5–16 ч или фотопериодически нейтральных. Следует отметить, что распространение амброзии на юго-восток сдерживается дополнительным лимитирующим фактором – недостаточной влагообеспеченностью. Пунктирной линией показана современная северная граница натурализации *А. artemisiifolia* в России.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показывает, что основным оперативным механизмом адаптации короткодневных видов растений при продвижении в высокие широты служит изменение порогов их фотопериодической чувствительности. Растения характеризуются широкой вариацией фотопериодической чувствительности как на меж-, так и внутрипопуляционном уровнях. Диапазон вариации фотопериодической чувствительности характеризует адаптивный потенциал видов при продвижении их в высокие широты.

Изучение диапазона порогов фотопериодической чувствительности популяций предоставляет исследователям инструмент для прогноза распространения видов на север.

Исследование фотопериодических порогов перехода к репродуктивной фазе популяций *A. ar-temisiifolia* показывает, что вид обладает потенци-

конкурентоспособности раннеспелых опериодичередоставляет ноза распросих порогов уляций *A. ar-* Работа выполнена при поддержке гра

климатизация самых раннеспелых генотипов в Москве тем более вероятна, поскольку город является островом тепла. Появление более раннеспелых (с 16-часовым порогом), в том числе фотопериодически нейтральных генотипов, и дальнейшее потепление климата могут продвинуть потенциальную границу распространения *A. artemisiifolia* еще дальше на север. Сдерживающим экспансию фактором может служить снижение конкурентоспособности раннеспелых генотипов *A. artemisiifolia* в фитоценозах и эффективная работа служб защиты растений.

алом распространения до широты Москвы. Ак-

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-05-00610А.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов какихлибо исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Афонин А.Н., Соколова Ю.В., 2018. Эколого-географический анализ и моделирование распространения биологических объектов с использованием ГИС. СПб.: Изд-во BBM. 121 с.
- Марьюшкина В.Я., 1986 Амброзия полыннолистная и основы биологической борьбы с ней. Киев: Наукова думка. 120 с.
- Afonin A.N., Luneva N.N., Fedorova Y.A., Kletchkovskiy Yu.E., Chebanovskaya A.F., 2018. History of introduction and distribution of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in the European part of the Russian Federation and in the Ukraine // EPPO Bull. V. 48. № 2. P. 266– 273.

- *Allard H.A.*, 1945. Flowering behavior and natural distribution of the Eastern ragweeds (*Ambrosia*) as affected by length of day // Ecology. V. 26. № 4. P. 387–394.
- Deen W., Hunt T., Swanton C.J., 1998. Influence of temperature, photoperiod, and irradiance on the phenological development of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) // Weed Sci. V. 46. P. 555–560.
- Dickerson C.T., Sweet R.D., 1971. Common ragweed ecotypes // Weed Sci. V. 19. № 1. P. 64–66.
- Genton B.J., Shykoff J.A., Giraud T., 2005. High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction // Mol. Ecol. V. 14. № 14. P. 4275–4285.
- Leiblein-Wild M., Tackenberg O., 2014. Phenologic variation of 38 European Ambrosia artemisiifolia populations measured in a common garden experiment // Biol. Invasions. V. 16. № 9. P. 2003–2015.
- Li X.-M., She D.-Y., Zhang D.-Y., Liao W.-J., 2015. Life history trait differentiation and local adaptation in invasive populations of *Ambrosia artemisiifolia* in China // Oecologia. V. 177. № 3. P. 669–677.
- Scalone R., Lemke A., Štefanić E., Kolseth A.-K., Rašić S., Andersson L., 2016. Phenological variation in Ambrosia artemisiifolia L. facilitates near future establishment at northern latitudes // PLoS One. V. 11. № 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166510

# Adaptive potential of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) in connection with its movement to the north: The experience of bioclimatic and ecological niche analysis of the invasive species

A. N. Afonin<sup>a,</sup> \*, O. G. Baranova<sup>b</sup>, Yu. Yu. Kulakova<sup>c</sup>, Yu. A. Fedorova<sup>d</sup>, D. R. Vladimirov<sup>e</sup>, A. V. Gerus<sup>f</sup>, E. Yu. Gerus<sup>f</sup>, A. Ya. Grigorjevskaja<sup>e</sup>, and T. Yu. Zakota<sup>f</sup>

<sup>a</sup>Saint-Petersburg State University Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia <sup>b</sup>Komarov Botanical Institute RAS Prof. Popov str., 2, St. Petersburg, 197376 Russia <sup>c</sup>All-Russian Plant Quarantine Center Pogranichnaya str., 32, Bykovo, Ramenskoe, 140150 Russia <sup>d</sup>Institute of Biology, Ufa Research Center of RAS October ave., 69, Ufa, 450054 Russia <sup>e</sup>Voronezh State University Kholzunova str., 40, Voronezh, 394068 Russia <sup>f</sup>All-Russian Research Institute of Plant Protection Podbelskogo, 3, Saint Petersburg, 196608 Russia \*e-mail: acer737@vandex.ru

The fast genotypic adaptation of plants to the heat resources deficiency is based on the regulation of heat reserve redistribution between the vegetative and generative stages of development. The mechanism of photoperiodic sensitivity launches the process of heat redistribution in short-day plants. The plants that begin blooming on longer day form a generative stage of development earlier and receive more heat resources for seeds ripening. Both the duration of the vegetative phase and heat supply during this period shorten, as a result the vegetative growth of plants and potential seed productivity decline. This causes a weakening of competitiveness in plant communities. The optimal balance between the duration of the vegetative and generative stages of development in each geographical areas is specific and can be achieved via natural selection of genotypes with an optimal threshold of photoperiodic sensitivity for certain zone. The features of photoperiodic sensitivity thresholds of ragweed plants occurring in the southern and northern boundaries of the secondary range in connection with the peculiarities of photoperiod dynamics and temperature conditions of their habitats are considered. The prediction of the possibility of ragweed range extension to the north that associated with both the potential variability of genotypes and trends of climate warming is made.