

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Коржавина Оксана Антоновна

**Паразитические копеподы рода *Sphaerippe*
(Cyclopoidea: Lamippidae) – вероятные возбудители
«синдрома множественных фиолетовых пятен» у кораллов**

Специальность 1.5.12 Зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** – *Иваненко Вячеслав Николаевич – кандидат биологических наук*
- Официальные оппоненты** – *Алексеев Виктор Ростиславович – доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Зоологический институт РАН, лаборатория пресноводной и экспериментальной гидробиологии, главный научный сотрудник*
- Котов Алексей Алексеевич – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова РАН, лаборатория экологии водных сообществ и инвазий, главный научный сотрудник*
- Лунина Анастасия Анатольевна – кандидат биологических наук, ФГБУН Институт океанологии им. П.П. Ширинова РАН, лаборатория структуры и динамики планктонных сообществ, старший научный сотрудник*

Защита диссертации состоится «16» декабря 2024 г. в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.8 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1/12, МГУ, Биологический факультет, аудитория М 1.

E-mail: ksenperf@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3245>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



К.С. Перфильева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Род *Sphaerippe* Grygier, 1980 (Cyclopoidea: Lamippidae) включает всего один вид эндопаразитов восьмилучевых кораллов. Адаптации к симбиозу сильно модифицировали его морфологию и сделали слабо похожим на типичных копепод: самки приобрели сферическую форму тела, а самцы – червеобразную. Обнаруженный случайно род был описан по одному самцу и одной самке, поэтому рисунки и описание имеют низкое качество (Grygier, 1980).

Недавние исследования показали, что ламиппиды рода *Sphaerippe* могут вызывать «синдром множественных фиолетовых пятен» у кораллов рода *Gorgonia* Linnaeus, 1758 (Ivanenko et al., 2017; Shelyakin et al., 2018). Ранее в качестве возбудителей заболеваний у восьмилучевых кораллов отмечали только одноклеточные организмы. Данный синдром впервые описан в 2005 году (Harvell et al., 2007). Но уже привел к значительной деградации популяций кораллов *Gorgonia*, эндемичных для Карибского региона (Weill et al., 2016; Tracy et al., 2018; Water et al., 2018).

Восьмилучевые кораллы обитают по всему миру: от тропиков до полярных регионов, от мелководий до абиссальных глубин (Cairns, 2007; Pérez et al., 2016; Poliseno, 2016; Schubert et al., 2017). Они участвуют в создании трехмерных рифовых структур и служат убежищем для многих организмов (Buhl-Mortensen, Mortensen, 2004a, b; McFadden et al., 2006). Однако 42 вида этих кораллов поражены 19 различными заболеваниями, и только для восьми известны возбудители. За последние 30 лет Карибский регион пострадал сильнее всего: в нем обитает 70% поражённых видов, и часто происходят эпидемии с высокой смертностью (Rosenberg, Ben-Haim, 2002; Weil, Rogers, 2010; Ruiz-Moreno et al., 2012; Weil et al., 2017).

Влияние копепод на восьмилучевые кораллы изучено слабо (Bouligand, 1960a, b; Williams et al., 2018; Lau et al., 2019). Род *Sphaerippe* входит в семейство Lamippidae (11 родов и 54 вида). Представители семейства – облигатные и сильно видоизмененные эндосимбионты восьмилучевых кораллов (Boxshall, Halsey, 2004; Kim, 2004, 2007, 2009; Williams et al., 2018). Изначальные находки ламиппид приводили учёных в замешательство, так как их не могли отнести ни к клещам, ни к паукообразным, ни к ракообразным (Bruzelius, 1858; Claparede, 1867; Joliet, 1882). Семейство трижды подвергали ревизии: количество родов уменьшали до двух и снова увеличивали до одиннадцати (Zulueta, 1908, 1910, 1911; Bouligand, 1966; Stock, 1973). Более 160 лет исследований не привели к окончательной классификации семейства, и его филогенетическое положение в отряде не определено (Bruzelius, 1858; Williams et al., 2018).

Всё это делает копепод рода *Sphaerippe*, вызывающих «синдром множественных фиолетовых пятен» у рода *Gorgonia*, привлекательным объектом для изучения биологического разнообразия и молекулярно-филогенетических связей.

Цель и задачи исследования

Целью работы является интегративное исследование копепод семейства Lamippidae, потенциальных инфекционных агентов «синдрома множественных фиолетовых пятен».

Основные задачи исследования: 1) Определить видовые границы копепод рода *Sphaerippe*, используя интегративный подход; 2) Исследовать особенности популяционно-генетического разнообразия и распространения копепод рода *Sphaerippe* и их хозяина рода *Gorgonia* в Карибском регионе; 3) Проанализировать распространение копепод рода *Sphaerippe* и его связь с распространением «синдрома множественных фиолетовых пятен»; 4) Определить филогенетическое положение

копепод рода *Sphaerippe* (Lamippidae), возбудителей «синдрома множественных фиолетовых пятен», в системе веслоногих ракообразных (Copepoda).

Научная новизна работы

Впервые для копепод рода *Sphaerippe* были получены последовательности ITS2 (59 образцов), COI (56 образцов) и 18S рРНК (два образца). Анализ молекулярных маркеров ITS2 и COI выявил три новых формы, потенциально обладающих видовым статусом. При этом морфологический анализ показал идентичность строения всех образцов *Sphaerippe*. Интегрировав эти результаты, мы получили первое свидетельство наличия криптических видов в семействе Lamippidae. Впервые установлены различия в зоогеографических паттернах копепод рода *Sphaerippe* и коралла *Gorgonia ventalina* Linnaeus, 1758 показана высокая изменчивость в популяциях симбионтов на фоне низкой изменчивости в популяциях их хозяина. Обновлено данные по фаунистике за счет проведения сбора материала в 18 точках Карибского региона. Подтверждена высокая вероятность связи «синдрома множественных фиолетовых пятен» с паразитированием копепод *Sphaerippe* на *Gorgonia ventalina*. Впервые с помощью ДНК-маркера 18S рРНК установлено филогенетическое положение копепод семейства Lamippidae и их близкое родство с группой семейств Anchimolgidae, Rhynchomolgidae и Харифиде, симбионтов склерактиниевых кораллов. Для семейств Lamippidae, Vahiniidae и Харифиде показана параллельная эволюция признаков, специализированных к обитанию в сходных экологических нишах. Разработана методика исследования разнообразия, степени изученности и хозяиноспецифичности многоклеточных симбиотических организмов. Проанализирована оригинальная база данных, включающая 966 находок по 233 видам копепод, обитающим на 183 видах восьмилучевых кораллах Мирового океана. Оценена степень их изученности, охарактеризованы и визуализированы данные по их распространению и хозяиноспецифичности. Установлены слабо исследованные регионы Мирового океана, глубины и группы хозяев.

Теоретическая и практическая значимость работы

Анализ популяционно-генетической структуры копепод рода *Sphaerippe* расширяет понимание механизмов видообразования и формирования криптических видов у эндосимбиотических копепод. Выявленный генетический поток между двумя операционными таксономическими единицами *Sphaerippe* представляет доказательства влияния морских течений на распространение личинок. Новые данные о распространении «синдрома множественных фиолетовых пятен» и участии копепод рода *Sphaerippe* в его развитии улучшают понимание болезней кораллов и их причин. Работа вносит вклад в инвентаризацию фауны морей Карибского бассейна и разработку мер по ее сохранению. Определение систематического положения семейства Lamippidae способствует дальнейшему изучению адаптивной эволюции копепод к их хозяевам. Объединение данных за два столетия в резюмирующие таблицы и графики уточняет распространение и хозяиноспецифичность семейства Lamippidae. Результаты анализа данных по копеподам, симбионтам восьмилучевых кораллов, полезны для планирования полевых экспедиций и мониторинга потенциальных эпидемий, вызываемых копеподами. Разработанная методика создания и анализа баз данных применима для изучения различных морских организмов и позволяет выявлять хозяиноспецифичность симбионтов. Методика допущена к преподаванию в виде учебно-методического комплекса для студентов-магистров на кафедре зоологии беспозвоночных.

Методология и методы исследования

Основные методы, использованные в работе: сбор материала с помощью легководозлазного снаряжения, изучение морфологии с помощью светового и сканирующего электронного микроскопов, выделение ДНК, амплификация и

секвенирование нескольких ДНК-маркеров, анализ ДНК-таксономии, специфичности к хозяину, географической изолированности и филогенетического положения. Используются также методы создания базы данных, обработки и анализа ее данных.

Положения, выносимые на защиту

1. В Карибском регионе существует ранее неизвестное видовое разнообразие паразитических копепоид, принадлежащих к роду *Sphaerippe*.
2. Заболевание широко распространенного в Карибском регионе горгониевого коралла *Gorgonia ventalina*, известное под названием «синдром множественных фиолетовых пятен», с высокой степенью вероятности вызывается паразитированием копепоид, принадлежащих к роду *Sphaerippe*.
3. Семейство Lamirpidae филогенетически близко к семействам Vahiniidae и Xarifiidae, и у них есть общие морфофункциональные адаптации к паразитическому образу жизни.
4. Представители семейства Lamirpidae более специализированы к симбиозу с восьмилучевыми кораллами по сравнению с представителями других семейств Poecilostomatoida.
5. Семейство Lamirpidae характеризует большая эврибатность и более широкое географическое распространение по сравнению с другими семействами Poecilostomatoida.

Личный вклад автора

Соискатель внес значительный вклад на всех этапах исследования, от планирования проекта до публикации результатов. Соискатель участвовал в сборе материала на Кубе в 2019 году, молекулярно-генетических экспериментах, обработке и филогенетическом анализе данных, интерпретации результатов, представлении результатов работы на всероссийских и международных конференциях, подготовке и публикации статей. Соискатель разработал и применил метод создания и анализа баз данных о симбиотических организмах.

Степень достоверности информации

Достоверность результатов гарантируется правильным применением современных методов исследования и учетом их ограничений. При выполнении морфологических исследований образцов использовались корректные и широко применяемые протоколы. В рамках молекулярных исследований взята репрезентативная выборка. Все эксперименты проводились с учетом необходимых контролей, чтобы исключить возможные загрязнения и ошибки.

Апробация работы

Основные результаты работы были доложены на пяти конференциях в виде двух устных и трех постерных докладов: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых ««Ломоносов-2018», Россия, Москва, 9-13 апреля 2018 (устный доклад); Юбилейная конференция в честь 160-летия кафедры зоологии беспозвоночных «Зоология беспозвоночных – новый век», Москва, Россия, 19-21 декабря 2018 (постерный доклад); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019», Россия, Москва, 11 апреля 2019 (постерный доклад); III Национальная научная конференция с международным участием «Информационные технологии в исследовании биоразнообразия», посвященная 100-летию со дня рождения академика РАН Павла Леонидовича Горчаковского, Россия, Екатеринбург, 5-10 октября 2020 (постерный доклад); VI Всероссийская научная конференция молодых ученых «Комплексные исследования Мирового океана» и IV научная школа «Плавучий университет», Россия, Москва, 18-23 апреля 2021 (устный доклад).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано четыре статьи, индексируемых в базах данных Scopus, WOS и RSCI. Личный вклад в каждую публикацию отражен в списке публикаций на стр. 24 автореферата.

Структура и объем диссертации

Текст изложен на 121 странице и состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 252 источника. Приложение I содержит 15 таблиц, а приложение II – четыре таблицы, представляющие структуру базы данных и ее основные данные.

Благодарности

Автор благодарит В. Н. Иваненко за научное руководство, ценные советы, наставления и помощь на всех этапах работы. Автор признателен М. А. Никитину за помощь в проведении молекулярно-генетических экспериментов и обработке данных в биоинформатических программах. Автор также благодарит Е. С. Герасимова за рекомендации по написанию работы и подготовке к защите.

Особую благодарность автор выражает В. В. Малахову за рекомендации по улучшению структуры диссертации и критические замечания по ее стилистике. Автор выражает благодарность А. С. Савченко за содействие в организации предзащиты и защиты диссертации, Н. Н. Марфенину за возможность пройти курс «Основы работы с научной литературой», А. Ю. Синеву и Д. А. Юриковой за полезные замечания по тексту и докладу. Автор также благодарит сотрудников кафедры зоологии беспозвоночных Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, однокурсников, коллег и друзей за поддержку и советы.

Совершенно бесценной была помощь А.А. Бреслава, чьи усилия помогли мне довести эту работу до конца. Благодарю его за напоминания о важности защиты, помощь в расстановке приоритетов, поддержании фокуса и мотивацию в сложные моменты.

Автор посвящает эту диссертацию своим родителям, их моральная и материальная поддержка значительно помогли при создании этой работы.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (22-24-00365, Иваненко В.Н., «Морфофункциональные и молекулярно-филогенетические особенности эволюционного успеха паразитических и комменсальных ракообразных (Copepoda)») и РФФИ (18-54-34007Куба_т, Иваненко В.Н., «Криптическое разнообразие, экологические особенности и эволюция ключевых таксонов мейофауны коралловых рифов Карибских островов»).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В литературном обзоре рассмотрены история открытия и последующие этапы исследования рода *Sphaerippe*, а также основные морфологические особенности этого рода. Оценено текущее состояние изученности рода *Sphaerippe* и семейства Lamiripidae, включая их систему, морфологию, анатомию, биологию и адаптации к жизни на кораллах.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Сбор материала. Всего собрано 30 колоний восьмилучевых кораллов рода *Gorgonia* Linnaeus 1758 (Alcyonacea: Gorgoniidae), все из них заражены «синдромом множественных фиолетовых пятен». Кораллы найдены на глубинах от одного до 20 метров на 18 рифах в Карибском море: Синт-Эстатиус (2015, 11 образцов), Кюрасао (в 2017 году, четыре образца), юго-западе и северо-западе Кубы (в 2019 году, четыре и девять образцов, соответственно) и в Бонайре (в 2019 году, четыре образца).

Фиолетовые пятна вскрывали под бинокулярным микроскопом Olympus SZX7 для поиска ракообразных. Копепод переносили в каплю глицерина на стеклянные слайды для морфологического исследования или в отдельные пробирки для молекулярного анализа. Небольшие куски здоровой ткани кораллов отбирали для ДНК-идентификации. Образцы кораллов сохраняли в формалине.

Всего проанализировано 75 образцов: 54 принадлежат веслоногим ракообразным из семейства Lamirridae и 21 образец – их хозяевам восьмилучевым кораллам из рода *Gorgonia*. Все материалы хранятся в личной коллекции авторов.

2.2. Морфологические методы. Для обнаружения копепод были препарированы галлы восьмилучевых кораллов рода *Gorgonia*. С помощью светового микроскопа были изучены препараты, в которых в каплю глицерина были помещены или целые копеподы, или их экзоскелеты, сохранившиеся после выделения ДНК мягким способом. Для изучения копепод с помощью сканирующей электронной микроскопии выполнена пробоподготовка по стандартному протоколу. При помощи сканирующей электронной микроскопии изучили 73 особи и сделали 212 снимков. В ходе исследования копепод использованы бинокуляры Olympus SZX и световые микроскопы Olympus CX41RF и Olympus BX 51 биологического факультета МГУ, а также ионно-распылительная установка IB-3 Ion Coater и сканирующие электронные микроскопы JSM-6380LA и Camscan-S2 Центра коллективного пользования МГУ. Подготовленные образцы сохранены в личной коллекции авторов на биологическом факультете МГУ.

2.3. Молекулярные и биоинформатические методы. Чтобы обеспечить сохранность экзоскелета, доработан протокол Д. Порко (D. Porco) и коллег (2010). Выделено ДНК из 69 образцов, из них 48 – копеподы и 21 – восьмилучевые кораллы. ПЦР, очистку продуктов ПЦР и их секвенирование проводили по стандартным методикам. Для изучения копепод в качестве маркеров использовали COI, ITS2 и 18S рРНК, а для восьмилучевых кораллов – ITS2 и msh1. При ПЦР и секвенировании использовали 13 праймеров, три из них были копеподоспецифичными, чтобы повысить качество амплификации и избежать наработки ДНК-хозяина. После секвенирования получено 259 последовательностей ДНК.

Последовательности копепод *Sphaerippe* sp. и других представителей семейства Lamirridae получены для 18S рРНК (1537-1658 п.н.) – два образца, для COI (618-695 п.н.) – 56 образцов, для ITS2 (441-575 п.н.) – 59 образцов. Последовательности восьмилучевых кораллов *Gorgonia* sp. извлечены для ITS2 (215-240 п.н.) – 20 образцов и для msh1 (781-857 п.н.) – 21 образец. Из базы данных Genbank выбраны 100 последовательностей 18S рРНК копепод: 53 вида принадлежат к Cyclopoidea, 44 – к «Pocilostomatoida» и три – к Misophrioidea. Из Genbank также взяты четыре последовательности: *Gorgonia flabellum* Bayer, 1961, *Gorgonia mariae* Bayer, 1961, *Gorgonia ventalina* и *Antillogorgia bipinnata* (Verrill, 1864). Моногенные выравнивания получены алгоритмом MUSCLE в Geneious (Edgar, 2004), а конкатенированные – алгоритмом MAFFT (Kuraku et al., 2013, Katoh et al., 2017). Дополнительно выравнивания корректировали вручную в Geneious (Kearse et al., 2012).

В ходе исследования генетического разнообразия копепод оценивали изменчивость COI (56 сиквенсов, 632-687 п.н.) и ITS2 (59 сиквенсов, 442-576 п.н.), тогда как у кораллов смотрели ITS2 (24 сиквенса, 215-240 п.н.) и msh1 (25 сиквенсов, 749-857 п.н.). Объединенное выравнивание COI и ITS2 копепод включало 66 последовательностей (498-1184 п.н.) для построения дерева и 51 последовательность (935-1185 п.н.) для анализа РТР. Генетическое разнообразие копепод и кораллов исследовали методами байесовского анализа (BA) и максимального правдоподобия (ML). BA применяли для моногенных и конкатенированных выравниваний, а ML – только для конкатенированных. Деревья строили с одинаковыми параметрами для всех

выравниваний. Единственное отличие было в оценке модели эволюции нуклеотидов. Ее проводили в MegaX для моногенных выравниваний и в PartitionFinder для конкатенированных. Чтобы проверить сделано ли достаточное количество поколений, рассчитывали сходимость счета в Tracer v1.7.1 (Rambaut, Drummond, 2007). Для автоматического разделения видов также использовали алгоритм «Automatic Barcode Gap Discovery» в программе ABGD (Puillandre et al., 2011) и алгоритм, основанный на модели пуассоновских процессов (PTP) на онлайн-платформе bPTP (Zhang et al., 2013).

Оценка состояния популяций и их нуклеотидного разнообразия проведена на основе анализа данных последовательностей COI и ITS2 копепод. Используя программу DNAsp (Rozas, 2009; Librado, Rozas, 2009), были выявлены гаплотипы в выравниваниях, устранены дублирующиеся последовательности и проведен статистический тест Fu's F (Fu, 1997). Полученные в DNAsp гаплотипы проанализированы в PopArt по методу Median Joining (Leigh, Bryant, 2015). Там же рассчитаны показатели нуклеотидного разнообразия и тестирование D-статистика Таджимы (Tajima, 1989).

Для определения положения семейства Lamirippidae на дереве веслоногих ракообразных использовано выравнивание 18S рДНК из 105 последовательностей длиной от 564 до 1866 пар нуклеотидов. Наиболее подходящая модель нуклеотидных замен определена в Mega X (Kumar et al., 2018). Филогенетические связи оценивали с помощью двух алгоритмов: BA в веб-интерфейсе CIPRES (Ronquist et al., 2012) и ML с помощью IQ-TREE (Nguyen et al. 2015). Стабильность узлов в BA оценивали с помощью постериорной вероятности (BA PP), в анализе по методу ML – с помощью метода бутстрэпов с 1000 повторений (BS UFB) (Minh et al., 2013).

2.4. Методика создания базы данных. Литературу с данными о находках копепод искали через Google Scholar, Scopus и Web of Science. Найденную информацию собирали в оригинальную базу данных Microsoft Access. Все упомянутые в публикациях названия организмов проверены с WoRMS Match Taxa. Все данные геореференцированы согласно WGS84 и проверены в GoogleMaps. Экорегions Мирового океана и типы батиметрического распределения определены согласно методикам М. Спалдинг (M. Spalding) и коллег (2007) и Дж. Уильямс (Williams, 2011), соответственно. По данным базы подготовлены резюмирующие таблицы и графики, дизайн которых сделан с учетом предыдущих исследований (Poulin, 1992; Bakke et al., 2002; Fontaneto et al. 2012; Smit et al., 2014; Ferrari et al., 2023; Lopez et al., 2023). Для автоматической обработки и визуализации данных написаны скрипты на языке программирования R. База данных конвертирована в набор данных со стандартом Darwin Core (Wieczorek et al., 2012, Garlasché и др. 2020). Для обработки иллюстраций использовали Adobe Photoshop CC.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Морфология рода *Sphaerippe*. Все образцы копепод *Sphaerippe* sp., в том числе из разных карибских регионов, демонстрируют морфологическое сходство (Рис. 1). Цвет тела желтый. Самцы имеют гладкое веретенообразное тело без сегментации. Самки обладают шарообразным телом с выступами и глубокими складками. Оба пола имеют одноветвистые антеннулы и антенны, конический рострум с треугольным ртом, две пары двуветвистых грудных ног и каудальные ветви. Антеннулы (A1) самца не членистые с восьмью или девятью щетинками. Антеннулы (A1) самок несут восемь шипиков. У самок и самцов антенны (A2) из четырех члеников: первый членик короткий, второй длиннее третьего, четвертый в виде когтя. Рострум самцов длиннее, чем у самок. Ротовое отверстие у обоих полов окружают слабо развитые мандибулы, но значительная редукция придатка затрудняет его идентификацию. Первая пара грудных конечностей (P1) имеет одинаковое строение у обоих полов. Эндоподиты первой пары ног (P1) несут две одинаковые по размеру щетинки, а экзоподиты вооружены восьмью

шипами, расположенными в два ряда. У самцов эндоподиты второй пары (P2) вооружены двумя щетинками и тремя шипами, а экзоподиты – восемью шипами, формирующими два ряда. У самок вторая пара ног (P2) и каудальные ветви усеяны пучками волосовидных выростов с шарообразными образованиями, неизвестной природы. У обоих полов на обеих парах ног эндо- и экзоподиты имеют плохо различимые границы. Каудальные ветви представляют округлые конусы, разделённые во фронтальной плоскости на две части: дорсальная часть несёт три пальцевидных выроста одинакового размера, а вентральная – два. Науплиусы обладают типичной морфологией с одноветвистыми антеннулами, двухветвистыми антеннами и мандибулами. Яйца сферические, диаметр 0,1 мм.

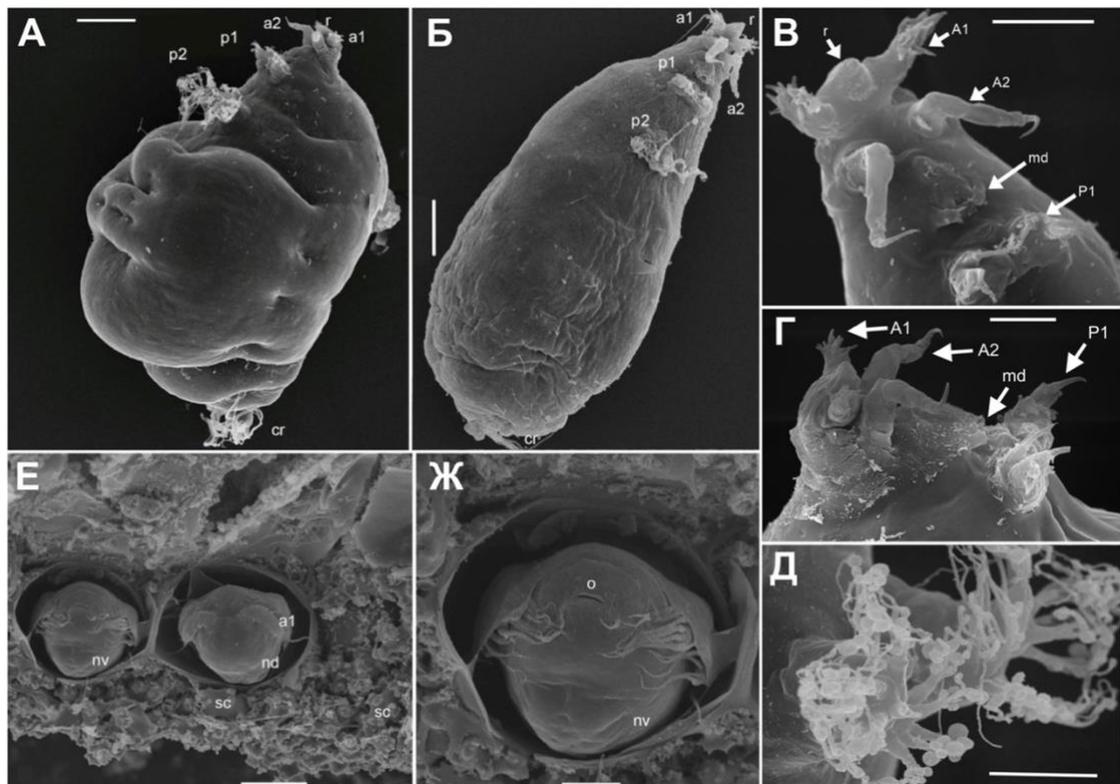


Рисунок 1. А – сферическая самка *Sphaerippe* sp.; Б – удлиненный самец *Sphaerippe* sp.; В – передний отдел самца; Г – передний отдел самки; Д – вторые ноги самки; Е, Ж – эмбриональные науплии в капсуле из тканей коралла; А1 – антеннула, А2 – антенна, cr – каудальные ветви, md – мандибулы, nd – науплиус, вид сверху, nv – науплиус, вид снизу, o – ротовое отверстие, P1 – первая пара грудных ног, P2 – вторая пара грудных ног, r – рострум, sc – склерит морского веера. Масштабные линейки: А – 100 мкм, Б, Е – 50 мкм, В-Д – 30 мкм, Ж – 20 мкм.

Длина тела у обнаруженных нами образцов *Sphaerippe* sp. составила 0,74 мм для самок и 0,475 мм для самцов. Для сравнения, длина тела самок ламиппид варьирует от 0,4 мм (*Enalcyonium pusillum* (de Zulueta, 1908)) до 9,5 мм (*Magnippe caputmedusae* Stock, 1978). Самки *Sphaerippe* относительно других ламиппид небольшие. Длина самцов варьирует от 0,2 мм (*Gorgonophilus canadensis* Buhl-Mortensen и Mortensen 2004b) до 1,4 мм (*Enalcyonium kohsiangi* Uyeno 2015). Самцы *Sphaerippe* близки к нижней границе диапазона длин, характерного для ламиппид. Самки рода *Sphaerippe* в два раза длиннее самцов. Самцы имеют меньшую длину тела, чем самки, в родах *Gorgonophilus*, *Isidicola*, *Linaresia*, *Ptilosarcoma* и *Sphaerippe*. Ширина тела у наших образцов *Sphaerippe* sp. составила 0,5 мм у самок и 0,17 мм у самцов. Для сравнения, ширина самок ламиппид варьирует от 0,1 мм (*Enalcyonium pusillum*) до 1,6 мм (*Linaresia magna* Grygier, 1980).

Ширина самок *Sphaerippe* sp. находится на среднем уровне относительно других представителей семейства. Ширина самцов варьирует от 0,1 мм (*Lamippula parva* (de Zulueta, 1908)) до 0,6 мм (*Linaresia mammillifera* de Zulueta, 1908). Самцы *Sphaerippe* имеют одни из минимальных значений в семействе. Самцы имеют меньшую ширину тела, чем самки, в родах *Isidicola*, *Lamippe*, *Linaresia*, *Ptilosarcoma* и *Sphaerippe*.

3.2. Биология рода *Sphaerippe* и синдром множественных фиолетовых пятен.

Основной симптом СМФП – многочисленные фиолетовые галлы диаметром 1-4 мм без отверстий на поверхности колонии (Рис. 2). Влияние СМФП на физиологию кораллов не установлено, но активный иммунный ответ кораллов указывает на потенциальную вредоносность этой инфекции.

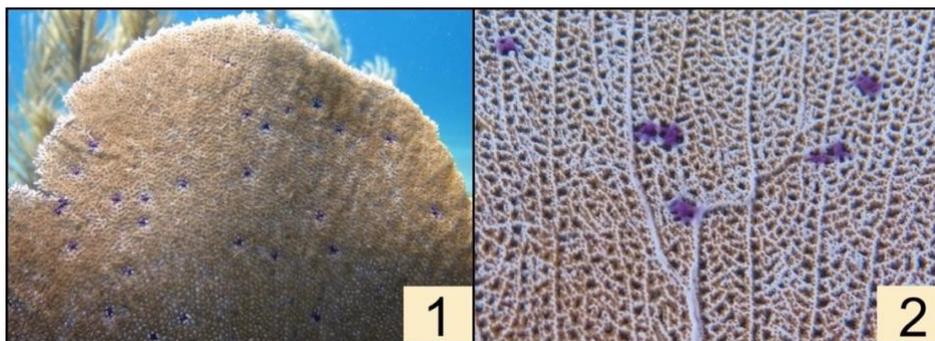


Рис. 2. Пример отобранного образца коралла рода *Gorgonia*. Проба Statia15-170. 1, 2 – общая и макроскопическая фотографии.

Копеподы рода *Sphaerippe* проникают в коралл, что приводит к образованию галла. Галл содержит одну или редко несколько камер. В каждой камере обитает одна, иногда две самки. Часто самок сопровождает самец, реже – два самца. После заражения коралла копеподы изменяют морфологию: самки становятся шарообразными, а самцы – червеобразными. Внутри галлов происходит рост, линька, размножение, откладывание яиц и развитие науплиусов. Иногда в камерах можно найти копеподитов, которые имеют удлиненное тело и меньшие размеры, чем самки и самцы. Вблизи галлов ткани насыщены яйцами и науплиусами. Мы предполагаем, что развитие ламиппид в яйце идет до стадии науплиуса или метанауплиуса. На поздних науплиальных или ранних копеподитных стадиях рачки разрывают ткани галла и выходят в окружающую среду. Затем они снова проникают в коралл через покровы или полипы, вызывая образование новых галлов. Но точный механизм заражения коралла еще не установлен. Причины, по которым самцы встречаются только в некоторых галлах и всегда с самками, также неизвестны. В некоторых галлах живые копеподы отсутствовали. В них мы обнаружили желтоватые склеротизированные структуры, вероятно, выделенные клетками коралла. Они содержали экзоскелеты мумифицированных копепод и сперматофоры, которые *G. ventalina* изолировал от здоровых тканей. Можно предположить, что продолжительность жизни самки определяет срок существования галла.

Ранее СМФП был зафиксирован вдоль побережья Флориды и Мексики, а также на островах Гранд-Кайман, Гренада и Пуэрто-Рико (Harvell et al., 2007; Weil, Hooten, 2008; Weil, Rogers, 2010; Burge et al., 2012; Weil et al., 2017; Tracy et al., 2018). Наши данные указывают на наличие СМФП у островов Бонейр, Куба, Кюрасао и Синт-Эстатиус. Анализ подводных фотографий с сайта iNaturalist позволяет предполагать, что СМФП присутствует и у островов Багамы, Виргинии, Синт-Китс и Невис (Рис. 3).



Рис. 3. Местоположения СМФП в Карибском море.

3.3. Молекулярные данные. Филогенетическое дерево ВА по COI *Sphaeripia* sp. (Рис. 4) показало разделение на три клады: первая у Синт-Эстатиуса (Восточный Карибский бассейн), Кюрасао и Бонейра (Южный Карибский бассейн), вторая – юго-западная Куба, третья – северо-западная Куба (вероятности 1, 0,76, 1, соответственно). Клада из северо-западной Кубы филогенетически родственна кладам из восточного и южного Карибского бассейна. ABGD выявил три видовые группы, соответствующие кладам с филогенетического дерева, с апостериорными межвидовыми расстояниями от 0,16 до 0,31. Модель РТР выделила три потенциальных вида: *Sphaeripia* sp. 1 из Синт-Эстатиуса, Кюрасао и Бонейра (поддержка 0,964), *Sphaeripia* sp. 2 из северо-западной Кубы (поддержка 0,977) и *Sphaeripia* sp. 3 из юго-западной Кубы (поддержка 0,966). Филогенетическое дерево ВА по ITS2 копепод *Sphaeripia* sp. (Рис. 4) показало монофилетические клады из Кубы (Большие Антильские острова) и из Восточного и Южного Карибского бассейна. Анализ ABGD выявил две группы с апостериорными межвидовыми расстояниями от 0,06 до 0,19. Модель РТР подтвердила две видовые группы с поддержками 1 и 0,99. Филогенетические деревья ВА и ML по конкатенированному выравниванию копепод (COI + ITS2) показали разделение на три клады. Модель РТР выделила в нем три вида: *Sphaeripia* sp. 1 с островов Синт-Эстатиус, Кюрасао и Бонейр (поддержка 0,847), *Sphaeripia* sp. 2 из юго-западной Кубы (поддержка 0,84) и *Sphaeripia* sp. 3 из северо-западной Кубы (поддержка 0,83).

Выравнивание ITS2 *Gorgonia* sp. имеет низкий уровень полиморфизма, что указывает на принадлежность всех образцов к одному виду. Последовательности GenBank *G. ventalina* и *G. flabellum* различает лишь две полиморфные замены. Ситуация в выравнивании msh1 кораллов аналогична, за исключением образца 19-32 с девятью нуклеотидными заменами. ABGD и РТР выявили в выравнивании ITS2 кораллов четыре вида: *A. bipinnata*, *G. mariae*, образец 19-32 и группа со всеми остальными образцами. В анализе РТР образец 19-32 имеет поддержку на уровне 0,79, а остальные образцы, включая *G. ventalina* и *G. flabellum*, – поддержку на уровне 0,64.

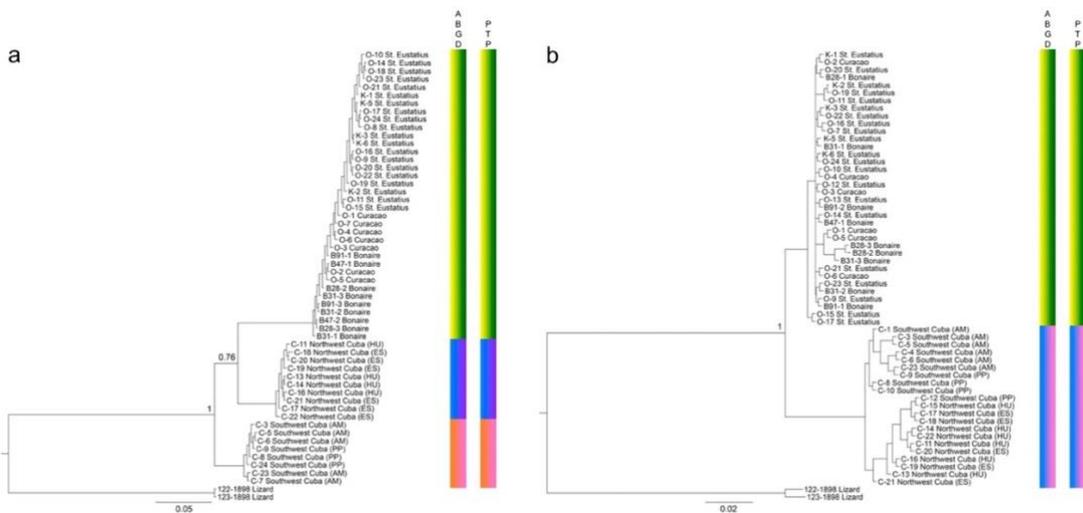


Рис. 4. Филогенетические деревья ВА по COI (a) и ITS2 (b) *Sphaerippe* sp. Модель эволюции нуклеотидов GTR + G + I. Числа на узлах – байесовские апостериорные вероятности. Цветные полосы – деление на виды.

Филогенетическая сеть по COI *Sphaerippe* sp. показывает разделение на три вида (Рис. 5). DNAsp выявил семь гаплотипов среди 36 особей *Sphaerippe* sp. 1., разделенных на два кластера: Бонейр и Кюрасао (Южный Карибский бассейн) и Синт-Эстатиус (Восточный Карибский бассейн). Соседние гаплотипы отличает одна нуклеотидная замена. Самый частый гаплотип найден на острове Синт-Эстатиус (нуклеотидное расстояние $n = 1,61$). DNAsp определил шесть гаплотипов среди десяти особей *Sphaerippe* sp. 2 ($n = 1,533$). DNAsp показал три гаплотипа среди восьми особей *Sphaerippe* sp. 3 ($n = 1,107$). Филогенетическая сеть по ITS2 *Sphaerippe* sp. показывает разделение на два вида (Рис. 5). Группа из 36 особей с островов Бонейр, Кюрасао и Синт-Эстатиус формирует один гаплотип. Нуклеотидные расстояния для нее не считали, так как последовательности полностью идентичны, кроме вариаций в микросателлитных повторах. DNAsp идентифицировал шесть гаплотипов среди 21 особи *Sphaerippe* sp. ($n = 1,867$). Параметры Tajima's D и Fu's F для всех видов *Sphaerippe* spp. и обоих ДНК-маркеров не показали достоверных отклонений от нуля ($p < 0,05$).

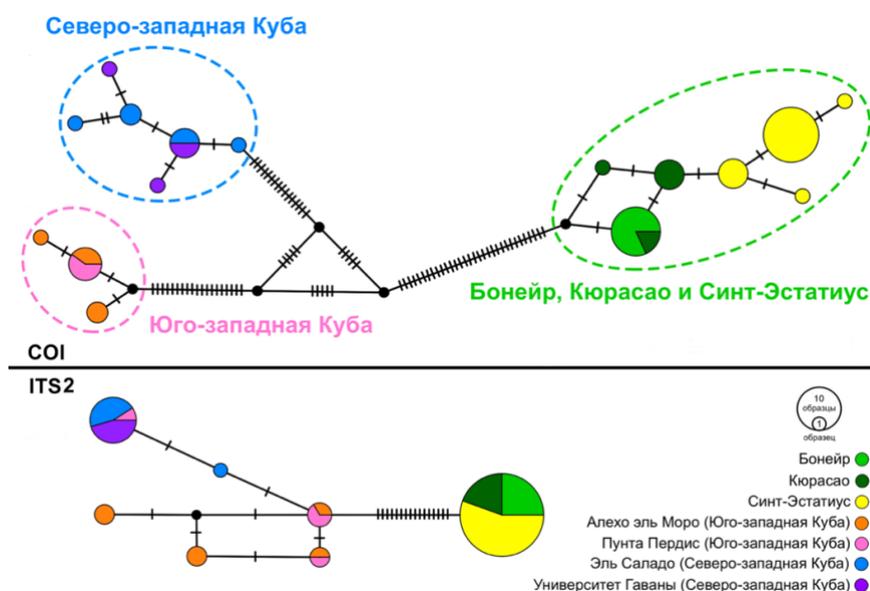


Рис. 5. Сеть гаплотипов COI и ITS2 у видов *Sphaerippe* spp. Размер кругов – частота гаплотипов, засечки на линиях – нуклеотидные замены между гаплотипами.

Анализ филогенетической сети ITS2 *Gorgonia* sp. выявил два гаплотипа: один эксклюзивен для *G. mariae*, а другой включает все наши образцы, *G. flabellum* и *G. ventalina*. Филогенетическая сеть msh1 *G. ventalina* показывает разделение на два вида. Один из видов формирует два гаплотипа с нуклеотидным расстоянием $n = 4$. Для этого вида значения параметров Tajima's D и Fu's F показали значительные отличия от нуля (-1,92207 и 2,499).

Филогенетический анализ ML и BA по 18S Cyclopoidea, «Poecilostomatoida» и Misophrioida надежно позиционировал род *Sphaerippe* и образцы неопределенных ламиппид из Австралии и GenBank в отряде «Poecilostomatoida» (Cyclopoidea). Уровень поддержки этих результатов имел 100% вероятность. Семейство Lamippidae встало рядом с группой семейств Anchimolgidae, Rhynchomolgidae, Xarifiidae. Это положение получило высокие поддержки: 97 и 1 на деревьях ML и BA, соответственно. Сестринская группа для всех этих семейств включает Vahiniidae, Sabelliphidae и Lichomolgidae с поддержкой 96 и 1 на деревьях ML и BA, соответственно.

3.4. Предполагаемое видовое разнообразие рода *Sphaerippe*. Все изученные образцы копепод рода *Sphaerippe* обладают схожими морфологическими чертами. Но имеют уникальные признаки, отличающие их от ранее описанного вида *Sphaerippe caligicola*. Это указывает на их принадлежность к новому виду. Генетический анализ показал разделение этих копепод на хорошо подтвержденные клады, они потенциально могут представлять отдельные виды. Однако различные ДНК-маркеры дают разные результаты: маркер ITS2 показывает две клады, а маркер COI – три. Таким образом, по морфологии можно выделить один потенциальный вид, по ITS2 – два (*Sphaerippe* №1 из Синт-Эстатиуса, Кюрасао и Бонейра, *Sphaerippe* №2 с юго-западной и северо-западной Кубы), а по COI – три (*Sphaerippe* №1 из Синт-Эстатиуса, Кюрасао и Бонейра, *Sphaerippe* №2 с юго-западной Кубы и *Sphaerippe* №3 с северо-западной Кубы). Морфологическое сходство при наличии генетических различий указывает на наличие криптических видов, или видов-двойников. Согласно Международному кодексу зоологической номенклатуры (ICZN), для описания новых видов необходимо наличие четких морфологических или других диагностических признаков. Ввиду неоднозначных данных по морфологии и генетике, мы не выделяем новые виды, а обозначаем их как операционные таксономические единицы (OTUs).

3.5. База данных по копеподам, симбионтам восьмилучевых кораллов. Состоит из семи таблиц: «Таксономия хозяев», «Синонимия хозяев», «Таксономия симбионтов», «Синонимия симбионтов», «Описания симбионтов», «Точки сбора» и «Источники» (Mendeley Data, 10.17632/729b2zpdjj.1). Их объединяет таблица «Находки», где каждая запись включает данные о таксономии хозяина и симбионта, географическое местоположение, глубину, дату сбора и ссылку на источник (Рис. 6). Основанные на базе наборы данных загружены в Глобальный информационный центр биоразнообразия (GBIF, 10.15468/msp4n8 и 10.15468/yuhgln).

База содержит данные о 966 находках с 233 видами копепод из 54 родов, 18 семейств и трех отрядов в симбиозе с 183 видами восьмилучевых кораллов из 72 родов, 28 семейств и двух отрядов. К семейству Lamippidae относятся 264 находки с 54 видами из 11 родов в симбиозе с 42 видами кораллов из 33 родов, 18 семейств и двух отрядов. Согласно данным базы, с 1858 по 2024 года опубликовано 92 статьи с исследованиями копепод, симбионтов восьмилучевых кораллов. Метод отбора проб с хозяевами указали в 44% находок: в 30% сбор проводили с аквалангом, а в 10% – с помощью донного траления. Метод обнаружения копепод на хозяевах отметили в 33% находок. Большинство копепод (305 находок) нашли с помощью смыва 5% раствором этанола, 10% или 4% формалина либо морской водой. В 19 находках копепод обнаружили при вскрытии галлов, а в 10 – при разрезании хозяев. Тип взаимодействия копепод с

хозяевами указали в 234 из 966 находок: 189 находок – эндосимбиоз, 45 – эктосимбиоз. Мы установили, что 29 видов копепод обитает в гастроваскулярной полости, восемь видов – на поверхности коралла, пять видов – в полипах, четыре вида – в галлах, один – в коэнхиме, один вид – в мезоглее.



Рис. 6. Схема базы данных Microsoft Access. Бордовый цвет – ключевые поля для связи таблиц. Голубой цвет – таблица, объединяющая данные из других таблиц.

Анализ данных показал, что копеподы с восьмилучевых кораллов принадлежат к трем отрядам: Cyclopoidea, Harpacticoida и Siphonostomatoida. Отряд Cyclopoidea включает 213 видов – это 90% от разнообразия копепод на восьмилучевых кораллах. Отряд Siphonostomatoida представлен 19 видами, составляющими 9% от общего количества. Отряд Harpacticoida с тремя видами представляет 1% от всего набора данных. Семейство Lamirridae занимает второе место по биоразнообразию среди копепод, симбионтов восьмилучевых кораллов, уступая только семейству Rhynchomolgidae. Остальные семейства менее представлены: Asterocheridae – четыре рода и 15 видов, Notodelphyidae – четыре рода и четыре вида, одиннадцать семейств – от одного до двух родов и видов. Известные хозяева копепод составляют 5% от общего числа восьмилучевых кораллов. Кораллы отряда Malacalcyonacea стали хозяевами копепод в 84% находок, а Scleralcyonacea – в 16%. В отряде Malacalcyonacea наибольшее разнообразие хозяев демонстрируют семейства Nephtheidae (29 видов), Lemnaliidae (16 видов), Sinulariidae (15 видов), Sarcophytidae (13 видов), Plexauridae (12 видов) и Xeniidae (11 видов). А в отряде Scleralcyonacea – кораллы семейства Pennatulidae (семь видов).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Видовая дифференциация копепод рода *Sphaerippe* и их хозяина *Gorgonia ventalina*. Копеподы рода *Sphaerippe* показали разделение на три клады, эндемичные для разных районов Карибского бассейна. Эти клады генетически удалены друг от друга, что позволяет выделить три новые OTUs. D-статистика Таджимы и F-статистика Фу указывают на активные эволюционные процессы в этих популяциях, которые характеризует дисбаланс между генетическим дрейфом и мутациями. Клада из восточных и южных Карибских морских экорегионов встречается вблизи островов Синт-Эстатиус, Кюрасао и Бонейр, охватывая около 900 км (Рис. 4). На значительных расстояниях эта клада демонстрирует минимальное генетическое разнообразие, что также наблюдали у рифовых рыб (Taylor, Hellberg, 2006; Rocha et al., 2008).

Филогеографическое сходство может объяснить влияние течений, проникающих с запада от Атлантики в восточные Карибы и на юг Карибского моря (Rocha et al., 2008). Клады западных Кариб демонстрируют разделение по ДНК-маркеру COI: одна связана с южным, другая – с северным побережьем Кубы. Анализ ITS2 выявил генетическое примешивание образцов из южной клады, что указывает на генетический поток между этими двумя OTUs и предполагает отсутствие презиготических морфологических барьеров для размножения. Это подтверждает гипотезу об облегчении личиночного расселения течениями Юкатанского пролива и подчеркивает влияние океанографических факторов на эволюцию и распространение этих видов *Sphaerippe*.

Наши результаты показали гибридизацию OTUs по ядерному ДНК-маркеру, но не выявили ее по митохондриальному. Поскольку митохондриальная ДНК наследуется только по материнской линии, это может быть связано со стерильностью гибридных самок. Стерильность гибридов – распространённая форма репродуктивной изоляции, чаще всего наблюдаемая у гетерогаметного пола (Olsen et al., 2023). У копепод гетерогаметными могут быть как самцы, так и самки. Гетерогаметность самок зафиксирована у свободноживущей копеподы *Oithona nana* Giesbrecht, 1893 и лососевой вши *Leprophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837). Определение пола также может зависеть от факторов окружающей среды. Например, копеподит *Pseudomyicola spinosus* (Raffaele & Monticelli, 1885) приобретает пол, противоположный полу особи, ранее заселившей мидию (Miller, 2023). Возможно, у копепод рода *Sphaerippe* происходит то же самое: если они заселяют галл с уже имеющейся самкой, то становятся самцами, а при самостоятельном заражении нового места – самками.

Существенные морфологические адаптации к эндопаразитизму и значимые генетические различия между OTUs по изученным ДНК-маркерам указывают на длительную адаптивную эволюцию копепод к их хозяевам. Обнаруженная разница в последовательностях возникла в ходе независимой эволюции в аллопатрических популяциях. Мы не обнаружили отличий в морфологии изученных представителей рода *Sphaerippe*, вероятно, это обусловлено их обитанием в похожих условиях. Сходная морфология образцов также может указывать на наличие генного потока между ними. Результаты исследования поднимают вопрос о критериях определения биологического вида. Что важнее: фенотипическая дискретность (морфологическая концепция) или репродуктивная изоляция (биологическая концепция) (Гриценко и др., 1983; Maug, 2000)? Морфологическая концепция предполагает, что высокая специфичность к хозяину обеспечивает однородность среды обитания, и стабилизирующий отбор поддерживает единый адаптивный фенотип со схожей морфологией, несмотря на генетические различия. В результате копеподы дают жизнеспособное гибридное потомство и принадлежат к одному виду, а их свободное скрещивание ограничивает только географическая изоляция. Биологическая концепция предполагает, что географическая изоляция приводит к репродуктивной изоляции и генетической дивергенции. Тогда один из видов со временем превратиться в два. Чтобы определить, какая концепция применима к нашим образцам, нужно провести эксперименты по скрещиванию копепод из разных популяций.

Морские веера *Gorgonia* демонстрируют разнообразие ветвления. Ранее данный признак имел важное значение для таксономии кораллов (Bayer, 1981; Pérez et al., 2016). Но он зависит от условий окружающей среды и может сильно меняться даже в пределах одного вида (Bayer, 1961, 1963; Pupier, 2020). В связи с этим для более точного определения видов стали использовать молекулярно-генетические признаки (Bayer, 1961; Sanchez, Wirshing, 2005). Анализ ДНК-маркеров показал, что последовательности большинства образцов *Gorgonia* совпадают и формируют монофилетическую группу, включающую *G. ventalina* и *G. flabellum*. Это подчеркивает ограничения текущих ДНК-

маркеров при различении видов кораллов (McFadden et al., 2010). Эти данные также могут указывать на близость генотипов у *G. ventalina* и *G. flabellum*, тогда выделение этих видов ошибочно. Учитывая влияние экологических факторов на морфологию кораллов (McFadden et al., 2010; Sanchez et al., 2005) и генетическую однородность наших образцов *Gorgonia*, мы определили их как вид *G. ventalina*.

4.2. Географическая гетерогенность популяций паразита и хозяина. Видовая дифференциация копепод рода *Sphaerippe* имеет значительные различия в регионах Карибского бассейна. Ее сопровождает сравнительно низкая внутривидовая изменчивость в популяциях их хозяев и других симбионтов, связанных с тем же хозяином (Рис. 4-5, Andras et al., 2011, 2013). Вероятная причина этого явления – ограниченная способность к расселению как у *Sphaerippe*, так и у *Gorgonia*. Мы выдвигаем гипотезу, что фаза расселения копепод рода *Sphaerippe* имеет короткий пелагический период, а личинки *Gorgonia* – длительный. Расселительная фаза *Sphaerippe* может быть представлена или науплиями, или первой копеподитной стадией, которая выступает таковой у многих паразитических копепод. В ходе полевых исследований мы часто замечали, что колонии с СМФП обитали рядом со здоровыми колониями морских вееров. Эта близость может указывать на способность копепод к самозаражению внутри колоний и на их активную роль в привлечении расселяющихся стадий к уже зараженным частям популяции. В отдаленные регионы личинки могут попадать за счет карибских течений, которые переносят их далеко за пределы нереста (Jossart, 2017). Но такие случаи относительно редки. В отличие от копепод, планктонные личинки *Gorgonia* spp., вероятно, имеют длительную пелагическую фазу, что позволяет им более эффективно расселяться (Andras et al., 2013). Различия в развитии веслоногих ракообразных *Sphaerippe* sp. и их хозяина *G. ventalina* объясняют разную дисперсионную способность и, как следствие, различия в их разнообразии. Наши данные подтверждают другие исследования карибских симбионтов, таких как краб-горох *Dissodactylus primitivus* и морской еж *Meoma ventricosa* (Jossart et al., 2017). В них тоже наблюдали географически изолированные популяции краба-симбионта и однородные популяции хозяина. Эти данные подчеркивают сложность симбиотических взаимодействий в морских экосистемах

4.3. Копеподы семейства Lamippidae и заболевания кораллов. В 2005 году у *G. ventalina* впервые описали СМФП (Harvell et al., 2007; Weil, Hooten, 2008). Заметные внешние признаки делают его удобной моделью для исследований. Изначально в галлах обнаружили протистов из класса Labyrinthulomycetes, родов *Aplanochytrium* Bahnweg & Sparrow, 1972 и *Thraustochytrium* Sparrow, 1936 (Burge et al., 2012, 2013; Water et al., 2018). Позднее мы препарировали галлы и нашли в них копепод рода *Sphaerippe* из семейства Lamippidae. Это первый случай, когда потенциальные возбудители болезни принадлежат к копеподам, а не к одноклеточным. Два возможных агента усложняют установление этиологии. Одна из гипотез: копеподы рода *Sphaerippe* служат векторами для протистов. Но исследование пары копепода *Sphaerippe* и коралл *G. ventalina* не выявило статистически значимых различий как между микробиомом здоровых и поврежденных тканей коралла, так и между микробиомом кораллов и копепод (Shelyakin et al., 2018). Эти данные не поддерживают гипотезу, но в исследовании было мало образцов, поэтому опровергать гипотезу пока рано (Shelyakin et al., 2018). Другая гипотеза: СМФП – группа заболеваний с похожими симптомами, но разной этиологией. В маленьких галлах обитают протисты, а в крупных – копеподы (Weill et al., 2016; Trasy et al., 2018; Water et al., 2018). Форма и размер пятен – важные диагностические признаки болезней кораллов. Галлы при СМФП имеют маленький размер, ровные края и равномерно фиолетовую окраску (Рис. 2). Это заметно отличается от вызванных

протистами пятен: они крупные, неправильной формы и имеют фиолетовую окраску лишь по краям (Weil, Hooten, 2008).

Распространение заболевания также важно для диагностики, поскольку зависит от путей передачи возбудителя (Jolles et al., 2002). СМФП наиболее распространен на мелководьях. Все пораженные колонии собраны нами на глубинах до 20 метров, с медианной глубиной около девяти метров. В то время как роды *Aplanochytrium* и *Thraustochytrium* чаще встречаются на больших глубинах, например, в заповеднике Ла Паргера у побережья Пуэрто-Рико (Burge et al., 2012; Tracy et al., 2018). Наличие копепод во всех галлах и заметные отличия между симптомами СМФП и протистными инфекциями указывают, что причина СМФП – паразитирование копепод *Sphaerippe*. СМФП широко распространен, его крайние точки удалены друг от друга более чем на 3500 км (Рис. 3). При этом данные о нем отсутствовали до 2005 года. Это можно объяснить либо недостаточным вниманием к его симптомам ранее, либо относительно недавним появлением болезни. Гипотезу о недавнем возникновении СМФП под влиянием климатических изменений поддерживают три факта: значительное потепление в Карибском бассейне за последние 25 лет, всплеск заболеваемости СМФП в летний период и увеличение числа зараженных колоний *Gorgonia* на 34% за семь лет после первого обнаружения (Rosenberg, Ben-Haim, 2002; Weil, Rogers, 2010; Chollet et al., 2012; Weil et al., 2017).

4.4. Филогенетическое положение семейства. Наш филогенетический анализ установил принадлежность семейства Lamippidae к «Роецилостоматоиды» (Cyclopoidea). Объединение «Роецилостоматоиды» с Cyclopoidea в качестве младшего синонима еще обсуждают. Повторный анализ данных С. Ходами (S. Khodami) и соавторов (2017) показал низкую воспроизводимость их филогенетических построений и слабую поддержку ключевых узлов дерева, что вызывает сомнения в сделанных ими выводах (Mikhailov, Ivanenko, 2019, 2021). Поэтому мы не использовали в работе предложенную ими филогению. Наши анализы показывают в этих отрядах согласованную и хорошо диагностируемую группу. Эта группа включает значительное количество семейств копепод, преимущественно симбиотических (Huys et al., 2006; Ferrari et al., 2010; Mikhailov, Ivanenko, 2019, 2021). Данный результат может служить доказательством валидности отряда «Роецилостоматоиды».

Наши результаты показывают положение семейства Lamippidae рядом с группой семейств Anchimolgidae, Rhynchomolgidae и Харифиды (Рис. 7). Семейства Anchimolgidae и Харифиды включают симбионтов шестилучевых кораллов, в то время как Rhynchomolgidae обитают на губках, шестилучевых и восьмилучевых кораллах, моллюсках и иглокожих (Boxshall, Halsey, 2004). Мы также выявили родственную связь Lamippidae с Vahiniidae, Sabelliphidae и Lichomolgidae. На основании имеющихся данных невозможно точно установить хозяина общего предка Lamippidae, Anchimolgidae, Rhynchomolgidae и Харифиды. Разнообразие хозяев у Rhynchomolgidae указывает, что смена хозяев среди симбиотических копепод происходит нередко. Вероятно, эволюция Lamippidae включала хотя бы одну смену хозяина.

Морфологически Lamippidae ближе всего к семействам Vahiniidae и Харифиды. Эндосимбиотический образ жизни привел к схожим изменениям у всех трех групп: исчезновению сегментации, упрощению тела, редукции антеннул и ряда других придатков. Семейства Lamippidae и Vahiniidae также объединяет упрощенное строение ротового аппарата и плавательных ног. Несмотря на близкое родство семейств Lamippidae, Anchimolgidae и Rhynchomolgidae согласно молекулярным данным, их морфологическое сходство выражается только в строении антенн. Вероятно, общий предок всех этих семейств имел преадаптации к жизни на кораллах. Полученные нами

результаты свидетельствуют о параллельной эволюции морфологических приспособлений к жизни в сходной экологической нише – эндосимбиозе с кораллами.

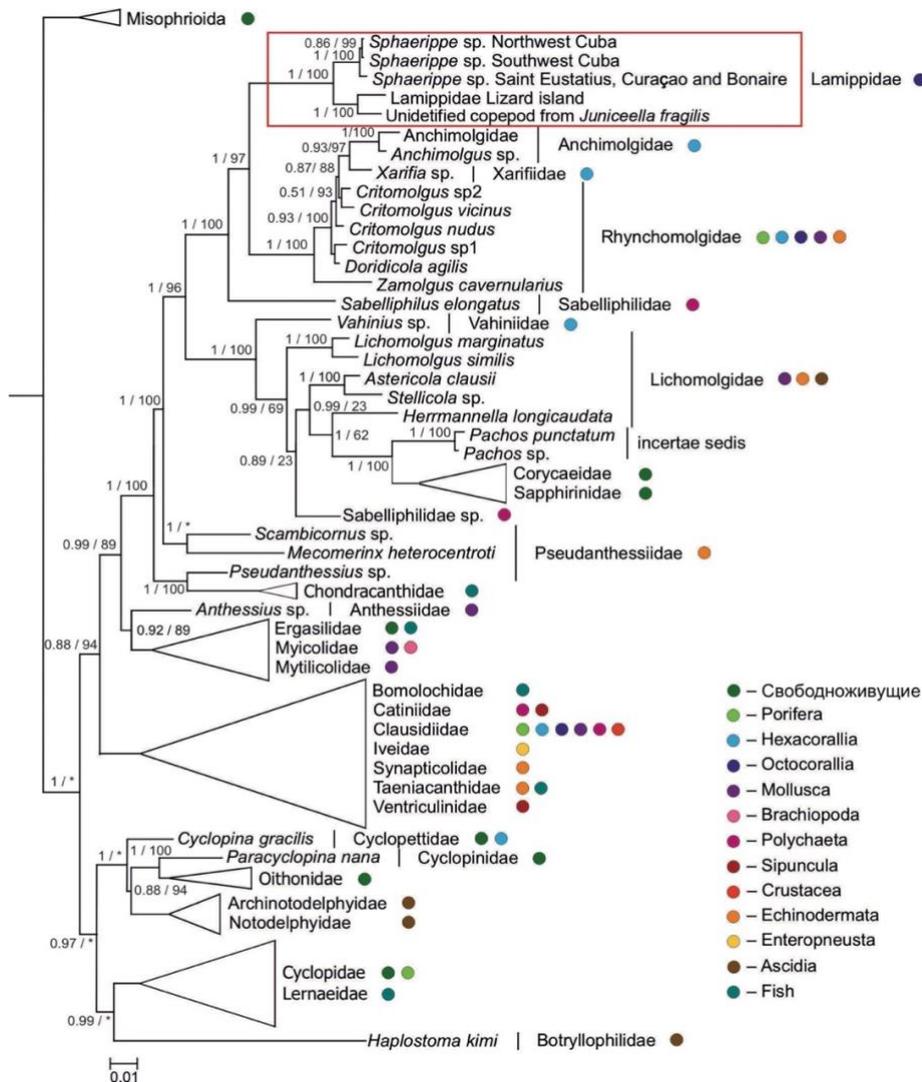


Рис. 7. Филогенетические деревья ВА и ML по 18S Cyclopoidea, Poesilostomatoidea и Misosphrioida. Модель нуклеотидной эволюции GTR + G + I. Номера узлов указывают постериорные вероятности (ВА) и поддержку бутстрапом (ML). Звездочки (*) отмечают узлы с различными топологиями в деревьях ML и ВА. Цвета кругов – таксоны хозяев, красная рамка – позиция семейства Lamirippidae.

4.5. Распространение семейства Lamirippidae. Большинство находок (75%) приходится на глубины до 25 метров, хотя большинство восьмилучевых кораллов (75%) обитает глубже 50 метров. Поэтому надежные выводы можно делать только по копеподам, обитающим на восьмилучевых кораллах с мелководных глубин. Для 14 из 17 семейств данные о глубинах основаны на единичных находках, поэтому поиск закономерностей в распределении возможен только для семейств Asteroheridae (34 находки), Lamirippidae (144 находки) и Rhynchomolgidae (601 находка). Семейство Lamirippidae обитает от мелководий до двух тысяч метров (медиана – 445 метров). В то время как Rhynchomolgidae (медиана – три метра) и Asteroheridae (медиана – 13,5 метров) предпочитают мелководья. Кроме Lamirippidae, на глубинах свыше 500 метров находили только Vuproridae и Lichomolgidae. Семейство Lamirippidae демонстрирует высокую экологическую пластичность, обитая в широком диапазоне глубин (Рис. 8).

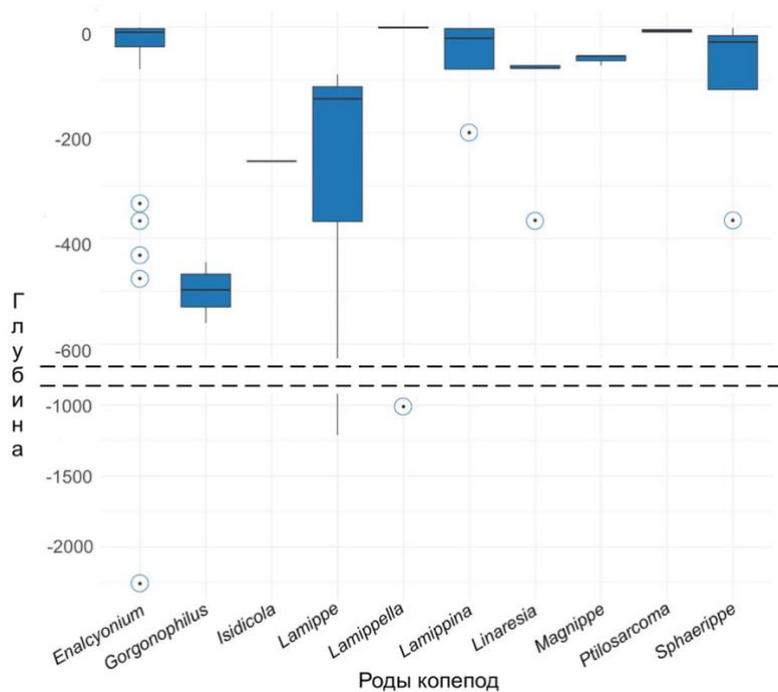


Рис. 8. Распространение семейства Lamippidae по глубинам.

Копеподы, симбионты восьмилучевых кораллов, обнаружены в 215 местах, расположенных в восьми из 12 экорегионов Мирового океана. Но значимое количество образцов зарегистрировано только в трех регионах Мирового океана: в Западном и Центральном Индо-Тихоокеанских регионах – 77 и 99 видов, соответственно, и в Тропической Атлантике – 19 видов. Симбиотические копеподы достигают пика своего разнообразия в тропических морях, что коррелирует с обилием видов их хозяев в данных районах (Weil et al., 2017). Отсутствуют данные из обширных регионов: тропического Восточного Тихого океана и умеренных зон Южной Америки, Южной Африки и Австралии. Скорее всего, недостаток научных станций и инфраструктуры привел к дефициту специалистов и исследований в этих местах (Fontaneto et al., 2012). Корреляция Пирсона между числом публикаций и известных видов в каждой стране составляет 0,86, что указывает на сильную связь и подтверждает значительное влияние выборочного отбора на представления о биоразнообразии и биогеографии копепод (Fontaneto et al., 2012; Ferrari et al., 2023). Поэтому географические закономерности распределения копепод можно уверенно обсуждать только для регионов с достаточным количеством находок.

Достаточные данные по географическому распределению есть только для семейств Asteroheridae, Lamippidae и Rhynomolgidae. Эти семейства найдены в нескольких регионах мирового океана: Asteroheridae – в пяти, Rhynomolgidae – в семи, Lamippidae – в восьми из 12 регионов. Семейства Asteroheridae и Rhynomolgidae особенно многочисленны в Центральном (6 и 86 видов соответственно) и Западном Индо-Тихоокеанских регионах (6 и 62 вида соответственно). Наибольшее видовое разнообразие Lamippidae (28 видов) зарегистрировано в северной умеренной зоне Атлантического океана (Рис. 9). Хорошо изученные регионы для Lamippidae (Рис. 7) включают Центральный Индо-Тихоокеанский регион и тропическую Атлантику, где зарегистрировано по девять видов. Lamippidae и Rhynomolgidae также обитают в Арктике, что говорит о их способности выживать в холодных условиях, тогда как Asteroheridae в этом регионе не встречены. Семейства Rhynomolgidae и Lamippidae демонстрируют высокую экологическую пластичность, обитая в различных регионах.

Rhynchomolgidae наиболее многочисленны в Индо-Тихоокеанском регионе, а Lamippidae – в Северной Атлантике. Asteroheridae представлены меньшим количеством находок и сосредоточены в основном в Индо-Тихоокеанском регионе.

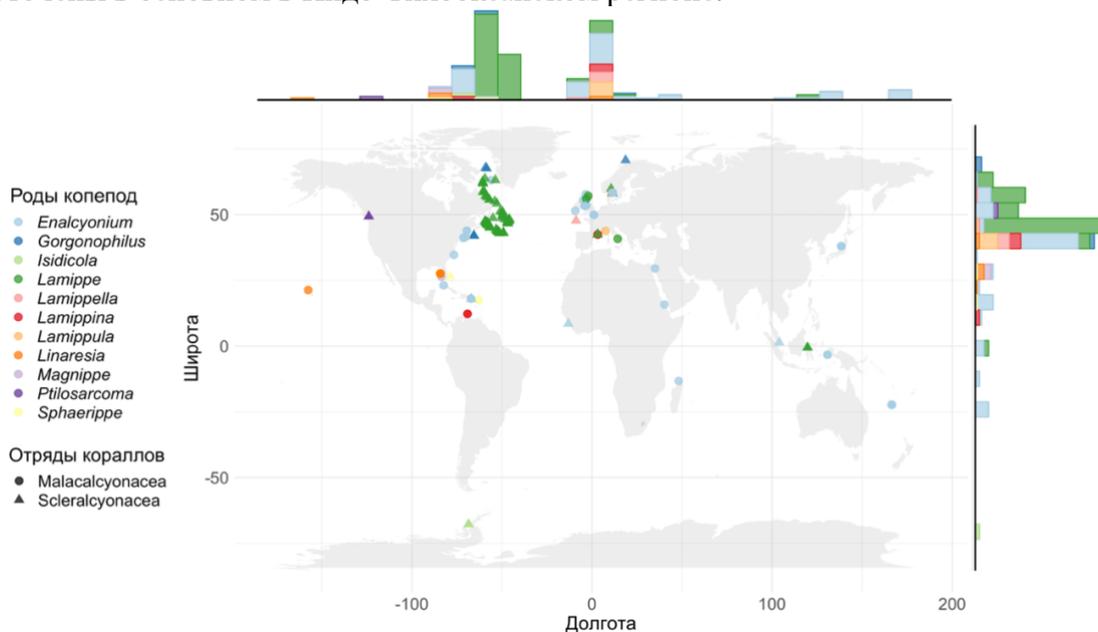


Рис. 9. Распространение семейства Lamippidae в Мировом океане.

4.6. Хозяиноспецифичность семейства Lamippidae. Семейства копепод, обнаруженные на восьмилучевых кораллах, обладают различной степенью специфичности к хозяевам. Циклопоиды из семейства Rhynchomolgidae обитают не только на восьмилучевых кораллах, но и на твердых кораллах, губках, иглокожих и моллюсках (Humes, Но, 1968; Voxshall, Halsey, 2004). Представители Lamippidae живут только на восьмилучевых кораллах (Voxshall, Halsey, 2004; Korzhavina et al., 2019, 2021; Penney et al., 2021; Buhl-Mortensen et al., 2022). Сифоностоматоиды из семейства Asterocheridae обитают на широком спектре хозяев: губках, твердых кораллах, моллюсках, иглокожих, мшанках и оболочниках (Humes, Voxshall, 1996; Ivanenko, Defaye, 2004; Voxshall, Halsey, 2004). Гарпактикоиды из семейства Miracidae, кроме восьмилучевых кораллов, живут на сипункулидах, ракообразных и асцидиях. Семейство Tegastidae встречается на других мелководных книдариях, моллюсках, асцидиях и в глубоководных хемосинтетических сообществах (Humes, 1984; Ivanenko, Defaye, 2004; Ivanenko et al., 2012). Диапазон хозяев часто указывает на исторические связи симбионта с хозяевами, хотя и не всегда позволяет определить предковый таксон хозяина (Huys, 2016). В отличие от других семейств с множественными случаями смены хозяев, семейство Lamippidae показывает исключительную специализацию на их хозяевах.

Тип взаимодействия копепод с их хозяевами известен в 25% находок (эндосимбионты – 19%, эктосимбионты – 6%), а для оставшихся 75% данных нет. Мы предполагаем, что большинство из них – эктосимбионты, поскольку их легче обнаружить стандартным методом смывов, хотя этим методом могут быть выявлены и эндосимбионты. Почти все эндосимбиотические копеподы принадлежат к семейству Lamippidae, а по одному виду эндосимбионтов найдено в семействах Rhynchomolgidae, Lichomolgidae и Vurporidae. Эктосимбионтами являются представители семейств Asterocheridae (два вида), Macrochironidae (один вид) и Rhynchomolgidae (18 видов). Жизнь внутри хозяина требует более серьезных изменений, чем обитание на его поверхности, поэтому эндосимбионты платят более высокую «цену адаптации» (Brockhurst et al., 2024). Все копеподы семейства Lamippidae являются эндосимбионтами

восьмилучевых кораллов, что делает их наиболее специализированными для жизни в таких условиях.

Уникальные взаимодействия между видами симбионтов и их хозяевами позволяют оценить степень хозяиноспецифичности. Анализ выявил 386 уникальных пар. Значительная часть (60%) пар отмечены по одной находке. С семейством Lamirridae связано 17% пар. Lamirridae – лишь одно из 18 семейств, обнаруженных на кораллах, поэтому это значительная доля, и она подтверждает высокую специализацию ламиппид на восьмилучевых кораллах. Ламиппиды также взаимодействуют с пятью малочисленными семействами отряда Scleractyonacea: Mopseidae, Anthoptilidae, Chrysogorgiidae, Keratoisididae и Primnoidae, на которых другие копеподы не были найдены. Но данные по всем этим семействам представлены единичными находками, исключение Anthoptilidae (84 находки), поэтому мы не можем полностью исключать, что другие копеподы на них не живут. Большинство пар симбионт-хозяин в семействе Lamirridae встречается на семействах Alcyoniidae (17 пар) и Gorgoniidae (семь пар) отряда Malacalcyonacea, а также на семействе Pennatulidae (восемь пар) отряда Scleractyonacea. Копеподы из других семейств предпочитают семейства Nephtheidae (72 пары), Sarcophytidae (43 пары), Cladiellidae (39 пар), Sinulariidae (32 пары) и Lemnaliadae (29 пар) из отряда Malacalcyonacea. Из этих семейств ламиппиды встречаются только на Nephtheidae (две пары) и Sarcophytidae (четыре пары). Эти семейства характеризует высокое видовое разнообразие (WoRMS, 2024), что делает их более доступными для изучения. Поэтому результаты могут демонстрировать не только предпочтения копепод, но и частоту исследований хозяев. Тем не менее, внутри этих хорошо изученных групп можно более уверенно обсуждать специфичность копепод, чем в случае семейств с меньшим разнообразием.

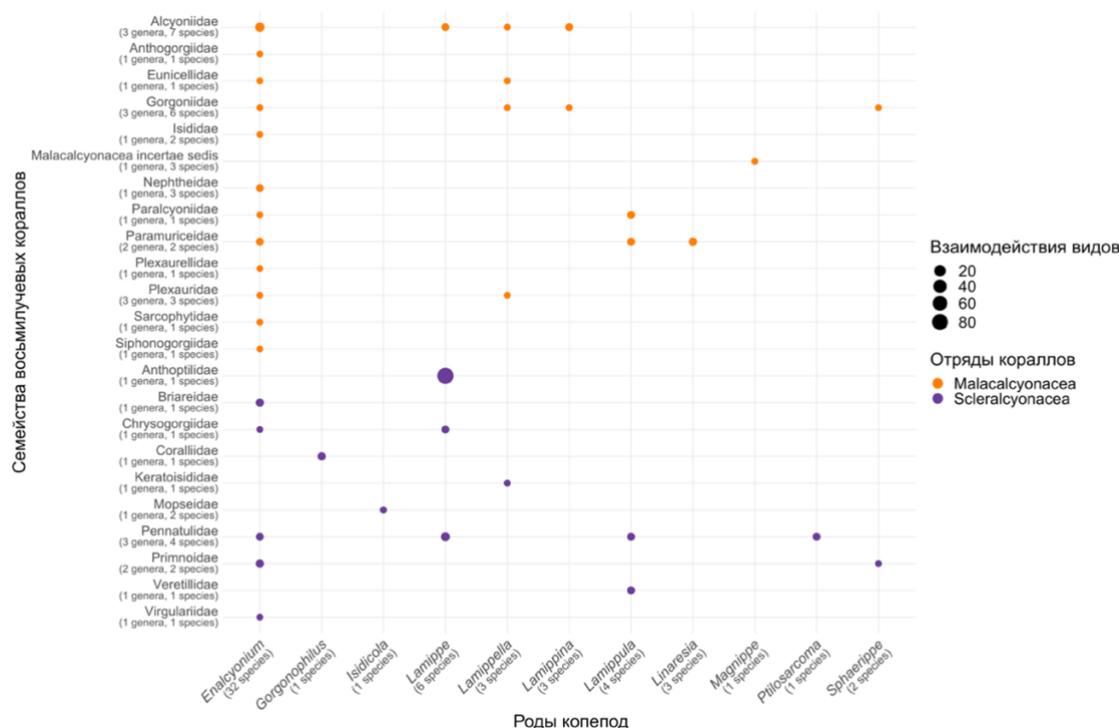


Рис. 10. Количество видовых взаимодействий Lamirridae с восьмилучевыми кораллами. Размер кругов – количество записей, цвет – отряд кораллов.

Хозяиноспецифичность описывает степень специализации паразита на определённых видах хозяев и важна для понимания их экологических и эволюционных взаимоотношений (Devictor et al., 2010; Doherty et al., 2021). Большинство видов

лампипид и других копепод (40 и 113 видов из 233, соответственно) обитают на одном виде восьмилучевых кораллов. На основании этого можно предположить, что они являются специалистами. Однако разнообразие восьмилучевых кораллов (Prada et al., 2010; Water et al., 2018; Lau et al., 2019; McFadden et al., 2019; Kessel et al., 2022) и их симбиотической фауны ещё недостаточно изучено (Buhl-Mortensen, Mortensen, 2004; Maggioni et al., 2020; Montano, 2020). Наше исследование также показывает, что копеподы найдены только у 5% известных видов восьмилучевых кораллов (Korzhavina et al., 2023). Отсутствие баз данных о симбиотических взаимодействиях между копеподами и большинством таксонов хозяев затрудняет проверку их специализации. Таким образом, недостаток данных может искажать результаты, и выводы о степени специализации копепод не могут быть окончательными. Противоположностью специалистов являются генералисты, которые могут обитать на широком диапазоне хозяев (Doherty et al., 2021). Копеподы семейства Lamippidae взаимодействуют со всеми отрядами восьмилучевых кораллов (Рис. 10). Помимо них на обоих отрядах живут семейства Artotrogidae, Asterocheridae, Entomolepididae и Rhynchomolgidae. На кораллах обоих отрядов обитают пять родов семейства Lamippidae: *Enalcyonium*, *Lamippe*, *Lamippella*, *Lamippula* и *Sphaerippe* (Рис. 34). Среди других копепод на обоих отрядах также живут семь (из 42) родов: *Acanthomolgus*, *Asterocheres*, *Critomolgus*, *Entomopsyllus*, *Orecturus*, *Paramolgus* и *Zamoligus*. Однако на основании имеющихся у нас данных мы не можем отличить истинных генералистов, которые одинаково хорошо взаимодействуют со многими хозяевами, от слабо специализированных организмов, которые предпочитают некоторых хозяев и допускают взаимодействия с другими (Doherty et al., 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что с высокой степенью вероятности СМФП – результат паразитирования копепод рода *Sphaerippe* на коралле *G. ventalina*. Используя интегративный подход, мы открыли три OTUs *Sphaerippe* без морфологических отличий и впервые выявили криптические виды в семействе Lamippidae. Мы обнаружили генетический поток между двумя OTUs, что может свидетельствовать о влиянии морских течений на личиночное расселение. Наш анализ показал, что три OTUs *Sphaerippe* являются эндемиками различных регионов Карибского бассейна. Мы также выявили различия в зоогеографических паттернах ядерных и митохондриальных маркеров этих копепод. Существенная генетическая неоднородность популяций *Sphaerippe* на фоне низкой генетической изменчивости в популяциях их хозяев, по-видимому, обусловлена различными способностями к расселению личиночных стадий у *Sphaerippe* и *G. ventalina*. Зафиксировав данное заболевание в 18 новых локациях, мы расширили представление о масштабах распространения СМФП.

Наш филогенетический анализ подтвердил принадлежность семейства Lamippidae к «Poecilostomatoida» (Cyclozoa). Мы показали наличие четко диагностируемой группы симбиотических копепод внутри отряда Cyclozoa, что подкрепляет гипотезу о валидности отряда «Poecilostomatoida». Мы установили родственные связи семейства Lamippidae с группой семейств Anchimoligidae, Rhynchomolgidae и Xarifidae – симбионтов склерактиниевых кораллов. Мы показали сестринское положение этой группы по отношению к семействам Vahiniidae, Sabelliphidae и Lichomolgidae. Мы получили свидетельство параллельной эволюции у Lamippidae, Xarifiidae и Vahiniidae, в ходе которой они развили схожие признаки для специализации к эндосимбиозу с кораллами.

Мы проанализировали данные о копеподах, симбионтах восьмилучевых кораллов в Мировом океане, и показали их слабую изученность копепод. Мы впервые

установили, что эта группа хорошо исследована лишь в трех регионах: умеренной Северной Атлантике, западном и центральном Индо-Тихоокеанском регионе. Мы обнаружили отсутствие данных из обширных регионов: тропического Восточного Тихого океана и умеренных зон Южной Америки, Южной Африки и Австралии. Мы показали, что достаточно изучены только мелководные виды восьмилучевых кораллов и что 95% потенциальных хозяев еще не исследованы на наличие симбионтов. Эти результаты подчеркивают значительное влияние выборочного отбора на представления о биоразнообразии и биогеографии копепод.

Мы установили, что представители семейства Lamirridae обнаружены в восьми из 12 географических регионов Мирового океана в диапазоне глубин от нуля до двух тысяч метров. Мы выявили, что семейство наиболее распространено на мелководьях в Центральном Индо-Тихоокеанском регионе и Тропической Атлантике и в глубоких водах Северной Умеренной Атлантики. Мы показали, что представители семейства – специализированные эндосимбионты, обитающие на 18 семействах из обоих отрядов (Malacalcyonacea, Scleralcyonacea) восьмилучевых кораллов.

ВЫВОДЫ

1. Исследование ДНК-маркеров (COI и ITS2) позволяет достоверно выявить две (по ДНК-маркеру ITS2) или три (по ДНК-маркеру COI) операционные таксономические единицы рода *Sphaerippe*, которые по уровню молекулярно-генетических отличий соответствуют самостоятельным видам. Обнаруженные криптические виды, достоверно отличаются по морфологическим признакам от единственного ранее описанного в Карибском регионе вида *Sphaerippe caligola* Grygier, 1980.

2. Анализ гаплосетей показывает, что в восточной части Карибского бассейна обитает полностью генетически обособленный вид рода *Sphaerippe*.

3. На северо-западном и юго-западном берегах Кубинского архипелага обитают две неполностью обособленные друг от друга популяции *Sphaerippe* (полностью изолированные по COI и неполностью изолированные по ITS2), которые в то же время полностью обособлены от вида, обитающего в восточной части Карибского бассейна.

4. Изучение изменчивости горгониевых кораллов – хозяев нескольких видов паразитических копепод рода *Sphaerippe* по ДНК-маркерам ITS2 и msh1 показывает, что в пределах всего Карибского бассейна распространен только один вид *Gorgonia ventalina* Linnaeus, 1758 с очень низкой генетической изменчивостью.

5. Заболевание, известное как «синдром множественных фиолетовых пятен» у *Gorgonia ventalina*, встречается только в тех районах и популяциях коралла, которые заражены копеподами рода *Sphaerippe*. Это позволяет с высокой степенью вероятности считать, что синдром является результатом паразитирования копепод *Sphaerippe* на коралле *Gorgonia ventalina*.

6. На основе изучения молекулярного маркера 18S рРНК определено положение семейства Lamirridae в системе Copepoda и показана его сестринское положение к семействам Vahiniidae и Xarifiidae. Полученные данные служат аргументом в пользу валидности отряда Poecilostomatoida.

7. Эндосимбиотический образ жизни привел к схожим морфологическим изменениям у Lamirridae, Vahiniidae и Xarifiidae, а именно: упрощению расчленения тела, редукции сегментации, редукции антеннул и других придатков, а в семействах Lamirridae и Vahiniidae – еще и к упрощению строения ротового аппарата и плавательных ног.

8. Семейство Lamippidae демонстрирует большую экологическую пластичность, обитая в широком диапазоне глубин от 0 м до 2000 м, по сравнению с близкими семействами Poesilostomatoidae, обитающими только на мелководье.

9. Представители семейства характеризуются наиболее широким географическим распространением. Lamippidae обнаружены в восьми из 12 регионов Мирового океана, тогда как представители других относительно хорошо изученных семейств Asteroheridae – в пяти, Rhynomolgidae – в семи.

10. Представители семейства Lamippidae – наиболее специализированная к обитанию на восьмилучевых кораллах отряда Scleralcyonacea группа эндоимбиотических копепод. Большинство пар симбионт-хозяин в семействе Lamippidae встречается на семействах Alcyoniidae (17 пар) и Gorgoniidae (семь пар) отряда Malacalcyonacea, а также на семействе Pennatulidae (восемь пар).

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

- **Korzhavina O. A.**, Hoeksema B. W., Ivanenko V. N. A review of Caribbean Copepoda associated with reef-dwelling cnidarians, echinoderms and sponges // Contributions to Zoology. – 2019. – Т. 88. – No. 3. – С. 297-349. DOI: 10.1163/18759866-20191411. 3,6 п.л./2,16 п.л. SJR: 0,702.
- **Korzhavina O. A.**, Reimer J. D., Ehrlich H., Ivanenko V. N. Global diversity and distribution of Lamippidae copepods symbiotic on Octocorallia // Symbiosis. – 2021. – Т. 83. – С. 265-277. DOI: 10.1007/s13199-021-00750-y. 1 п.л./0,6 п.л. SJR: 0,535.
- **Korzhavina O. A.**, Grishina D. Y., Chen X., Fontaneto D., Ivanenko V. N. Diving into Diversity: Copepod Crustaceans in Octocoral Associations // Diversity. – 2023. – Т. 15. – No. 11. – С. 1140. DOI: 10.390/d15111140. 3 п.л./1,5 п.л. SJR: 0,585.
- **Korzhavina O. A.**, Nikitin M. A., Hoeksema B. W., Armenteros M., Reimer J. D., Ivanenko V. N. Tracing geographic and molecular footprints of copepod crustaceans causing multifocal purple spots syndrome in the Caribbean sea fan *Gorgonia ventalina* // Diversity. – 2024. – Т. 16. – No. 5. – С. 280. DOI: 10.3390/d16050280. 2,8 п.л./1,4 п.л. SJR: 0,585.