

ISSN 2658-3518

# LIMNOLOGY & FRESHWATER BIOLOGY

**2024, No 1**

- > abiotic and biotic water components;
- > ecosystem-level studies;
- > systematics and aquatic ecology;
- > paleolimnology and environmental histories;
- > laboratory experiments and modeling

# Interstitial telomere sequences in chromosomes of Baikal planarians

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Koroleva A.G.<sup>1\*</sup>, Evtushenko E.V.<sup>2</sup>, Zaytseva E.P.<sup>3</sup>, Porfiriev A.G.<sup>4</sup>,  
Timoshkin O.A.<sup>1</sup>, Kirilchik S.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

<sup>2</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, 8/2 Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, 630090, Russia

<sup>3</sup>Baikal Museum, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, 1 Akademicheskaya Str., Listvyanka, 664520, Russia

<sup>4</sup>Department of Zoology and General Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 18 Kremlevskaya Str., Kazan, 420008, Russia

**ABSTRACT.** The presence of internal telomeric sequences (ITSs) in chromosomes typically indicates instances of genome reorganization. Changes in morphology and chromosome number can be sources of intraspecific polymorphism and also lead to speciation. Both variants are found in flatworms, but ITSs are rare in chromosomes, as is common in other invertebrate animals. Out of 23 flatworm species ITSs has been identified in only three parasitic species. Using FISH with telomeric probes, we found that ITSs are also present in the chromosomes of the endemic Baikal planarians *Baikalobia* Kenk, 1930 (Tricladida, Continenticola, Dendrocoelidae). This is the first time that ITSs has been identified in free-living flatworms. Like *Shistosoma* Weinland, 1858, the appearance of ITSs in the Baikal planarians could be associated with the process of speciation. There is no data yet on ITSs in other dendrocoelids, and the question remains whether ITSs are a specific feature of Baikal planarians or a special feature of all dendrocoelids.

**Keywords:** internal telomeric sequences, ITSs, FISH, flatworms, planarians, Lake Baikal

## 1. Introduction

Internal telomeric sequences (ITSs) are telomeric DNA located anywhere on the chromosome except the terminal regions (Meyne et al., 1990). They can arise for several reasons, including as a result of chromosomal rearrangements during genome evolution, repair of double-strand DNA breaks, and the introduction of extrachromosomal telomeric DNA into chromosomes and its amplification (Bolzán and Bianchi, 2006; Ruiz-Herrera et al., 2008; Bolzán, 2012). As a rule, ITSs are not associated with telomere functions, unless one takes into account their specific role in maintaining genome plasticity, since they are known to induce mutations and are localized at fragile sites where chromosome breaks occur (Moore et al., 2018; Lin and Yan, 2008).

There are four groups of ITSs: short ITSs, subtelomeric ITSs, fusion ITSs (resulting from the fusion of chromosomes) and heterochromatic ITSs (Bolzán, 2017). They differ in size, location and nucleotide environment, and also arise through different mechanisms. Short ITSs have a size of 100-120 bp and can be surrounded by both unique sequences and SINE,

LINE, LTR retrotransposons. The length of subtelomeric ITSs is measured in hundreds of nucleotides and may include degenerate telomeric repeats. The ITSs fusions have a head-to-head orientation and are flanked by subtelomeric DNA, indicating instances of two chromosomes joining at telomeric regions. Their sizes can vary from several kilobases (kb) to several tens of kb. Heterochromatic ITSs are the largest sequences, up to several hundred kb in size. They are often found in pericentromeric regions, but can also occur on chromosome arms and also form microchromosomes (Bolzán, 2017).

The sensitivity of conventional Fluorescence in situ hybridization (FISH) allows the visualization of sequences 1000 bp or longer (Poon et al., 1999), i.e. it is difficult to detect short and subtelomeric ITSs using this method. However, this method is capable of recording the most significant chromosomal rearrangements in the evolution of the karyotype, which can affect telomeric regions. In the chromosomes of vertebrates, ITSs larger than 1000 bp are quite common and are located mainly near centromeres (Meyne et al., 1990; Bolzán et al., 2017; Vicari et al., 2022). Usually, this is a consequence

\*Corresponding author.

E-mail address: [ankor-2015@yandex.ru](mailto:ankor-2015@yandex.ru) (A.G. Koroleva)

**Received:** December 26, 2023; **Accepted:** February 05, 2024;

**Available online:** February 29, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



of Robertsonian translocations (Slijepcevic, 1998), although such chromosomal mutations do not always lead to the appearance of ITSs (Souza et al., 2016). ITSs longer than 1000 bp are not so widespread among invertebrates (Vítková et al., 2005; Traut et al., 2007; Vicari et al., 2022). For example, among mollusks, such ITSs were found in only two of 23 species studied in this regard (Nomoto et al., 2001; Godwin et al., 2012). Among flatworms, FISH data with telomeric probes are known for 23 species, most of them parasites (Table 1), and ITSs were found only in the sex chromosomes of two trematode species (Hirai, 2014) and one cestode species (Špakulová et al., 2019). ITSs have not yet been identified in free-living flatworms.

We used FISH with telomeric TTAGGG probes to identify the localization of telomeric repeats in the chromosomes of two species of endemic planarians of the genus *Baikalobia*, an autochthonous group of Baikal Dendrocoelidae. ITSs were found in both worm species. Also in this work, we analyzed the phylogenetic relationships of flatworms taking into account ITSs in their chromosomes.

## 2. Materials and methods

Planarians were manually collected in the Listvyanichny Bay of Lake Baikal (51°52'02.4"N 104°49'55.2"E) in September 2011. The material was collected on the outside of stones at the depth of about 1 m. After that, worms were placed in a thermal container with Baikal water and taken to the laboratory, where they were kept until analysis. Tissues from two *Baikalobia* species were used for FISH: *B. guttata* Gerstfeldt, 1858 and *B. variegata* Korotneff, 1912 (3 individuals of each species). Species included in the phylogenetic analysis are presented in Table 1.

### 2.1. Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Chromosome preparations were prepared from homogenized worm tissues. Tissues were placed in 0.56% KCl, minced and left at 37°C for 15 min. Then they were fixed with a mixture of methanol and acetic acid (3:1), kept at +5°C for 15 minutes, centrifuged, the supernatant was removed, and the procedure was repeated three times. A cell suspension was dropped onto glass slides cooled to -20°C over water vapor (70-80°C) and dried for 10 minutes. Before hybridization, the preparations were kept at room temperature for several days.

The telomeric probe was generated by template-free PCR (Ijdo et al., 1991) and labeled with Bio-11-dUTP by PCR with primers for telomeric regions. FISH of the telomere probe on the preparations was carried out in accordance with the protocol (Joffe et al., 1998) with some modifications. After washing in 1 × PBS containing 50 mM Mg<sup>2+</sup>, the preparations were treated with 0.12% trypsin for 20 s. Next, the preparations were fixed in 0.5% formaldehyde and 1 × PBS for 10 min, washed in 2 × SSC, and dehydrogenated

in ethanol. The hybridization mixture (20 µl) contained 50% formamide, 2xSSC and a telomeric probe. Before hybridization, the mixture was denatured for 5 min at 96°C, cooled in ice, and applied to the preparation. Hybridization proceeded overnight at 42°C. Detection of the biotinylated probe was carried out using fluorescently labeled streptavidin (Streptavidin-Cy3, Sigma, USA). The preparations were stained with DAPI fluorochrome (4,6-diamino-2-phenylindole, 0.5 µg/ml) in Vectashield medium (Vector laboratories, UK) and analyzed on an Olympus BX51 fluorescence microscope. Chromosomes were photographed at 100x magnification (DP70 camera, X-Cite 120Q light source).

### 2.2. Phylogenetic analysis

DNA extraction, PCR of the 18S rRNA gene and sequencing were carried out as described in article by Porfiriev and coauthors (Porfiriev et al., 2018). The alignment of the resulting nucleotide sequences was carried out in the ClustalW1.6 program (Thompson et al., 1994). The execution of phylogenetic reconstruction was done using MrBayes 3.2.7 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) in accordance the GTR+G model. The calculation of Markov chains (MCMC) involved 10 000 000 generations (4 chains in parallel) and the recording of parameters every 1000 generations. The likelihood method was stabilized by using the first 25% of generations, while the rest was used to estimate the posterior probability. The reliability criterion was a posterior probability exceeding 95%. MEGA7 (Kumar et al., 2016) was also used to reconstruct trees, which was accomplished by using both Neighbor-Joining and K2P models, which were tested in 1000 replications using a bootstrap test. The implementation of graphic editing of the tree was done in FigTree version 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and MEGA7.

## 3. Results

### 3.1. FISH

*B. guttata* and *B. variegata*, two species of Baikal planarians, were the targets of this method's using (Fig. 1). Their haploid set is the same and amounts to 15 chromosomes, that was shown by T. M. Umylina in the 70s (Umylina, 1973; 1976; 1977). Figure 1 shows that TTAGGG repeats are present not only at the ends, but also inner of chromosomes, which indicates the presence of ITSs in the analyzed species. Moreover, in the species *B. guttata* they are located on one chromosome (Fig. 1 c, d), and in the species *B. variegata* ITSs they are probably located on two different chromosomes (Fig. 1 h).

### 3.2. Phylogenetic analysis and ITSs

To carry out phylogenetic analysis, nucleotide sequences of the 18S rRNA gene were obtained for *B. guttata* and *B. variegata*; for other species of flatworms, the sequences of this gene were taken from the GenBank database (Table 1). The length of the analyzed regions after the alignment was about 2000 bp. 655 informative

**Table 1.** The analyzed species with/without ITSs and the sequenced 18S rRNA gene

Species	2n	ITSs (FISH)	Accession number 18S rRNA (GenBank)
TRICLADIDA			
<i>Baikalobia guttata</i> Gerstfeldt, 1858	30	yes <sup>1</sup>	KY848668.1
<i>B. variegata</i> Korotneff, 1912	30	yes <sup>1</sup>	OR758633.1
<i>Polycelis tenuis</i> Ijima, 1884	14	no <sup>2</sup>	Z99949.1
<i>Dugesia ryukyuensis</i> Kawakatsu, 1976	14	no <sup>2</sup>	AF050433.1 (type II)
MONOGENEA			
<i>Paradiplozoon homoion</i> Bychowsky et Nagibina, 1959	14	no <sup>3</sup>	KY640614.1
CESTODA			
<i>Caryophyllaeus laticeps</i> Pallas, 1781	20	no <sup>4</sup>	AJ287488.1
<i>Caryophyllaeides fennica</i> Schneider, 1902	20	no <sup>4</sup>	KF990172.1
<i>Nippotaenia mogurndae</i> Yamaguti et Miyata, 1940	28	no <sup>4</sup>	AJ287545.1
<i>Atractolytocestus huronensis</i> Anthony, 1958	24 (3n)	yes <sup>9</sup>	OM972659.1
TREMATODA			
<i>Schistosoma mansoni</i> Sambo, 1907	16	yes <sup>5</sup>	U65657.1
<i>S. haematobium</i> Bilharz, 1852	16	yes <sup>5</sup>	Z11976.1
<i>S. japonicum</i> Katsurada, 1904	16	no <sup>5</sup>	Z11590.1
<i>S. sinensium</i> Pao, 1959	16	no <sup>5</sup>	AY157225.1
<i>Clonorchis sinensis</i> Looss, 1907	14	no <sup>6</sup>	JF823988.1
<i>Metorchis xanthosomus</i> Creplin, 1846	14	no <sup>6</sup>	OK384552.1
<i>M. bilis</i> (Braun, 1790) Odening, 1962	14	no <sup>6</sup>	OK384551.1
<i>M. orientalis</i> Tanabe, 1920	-	-	JF314771.1
<i>Opisthorchis viverrini</i> (Poirier, 1886) Stiles & Hassal, 1896	14	no <sup>6</sup>	JF823987.1
<i>O. felineus</i> Rivolta, 1884 Blanchard, 1895	14	no <sup>6</sup>	MF077357.1
<i>Bucephalus minimus</i> (Stossich, 1887) Nicoll, 1914	14	no <sup>7</sup>	-
<i>B. australis</i> (Szidat, 1961) Yamaguti, 1971	14	no <sup>7</sup>	-
<i>Monascus filiformis</i> (Rudolphi, 1819) Looss, 1907	18	no <sup>7</sup>	-
<i>Cercaria longicaudata</i> Tang, 1990	16	no <sup>7</sup>	-
<i>Bacciger bacciger</i> (Rudolphi, 1819) Nicoll, 1914	12	no <sup>7</sup>	-
MACROSTOMORPHA			
<i>Macrostomum lignano</i> Ladurner, Schärer, Salvenmoser, & Rieger, 2005	8	no <sup>8</sup>	FJ715306.1
ACOELOMORPHA			
<i>Hofstenia miamia</i> Correa 1960	-	-	AM701817.1

**Note:** 1 - gene sequences and FISH results were gave by us; 2 - Joffe et al., 1996; 3 - Tasaka et al., 2013; 4 - Bombarová et al., 2009; 5 - Hirai et al., 2000, Hirai, 2014; 6 - Zadesenets et al., 2012; 7 - García-Souto and Pasantes, 2015; 8 - Zadesenets et al., 2016; 9 - Špakulová et al., 2019. Dash means absent of complete information.

sites were identified. Both MrBayes 3.2.7 and MEGA7 programs produced trees of similar topology. Figure 2 shows the phylogenetic tree obtained in MrBayes. In general, representatives of different orders cluster into separate clades with high statistical support; the representative of Macrostomorpha forms a separate branch, along with the outgroup *Hofstenia miamia*.

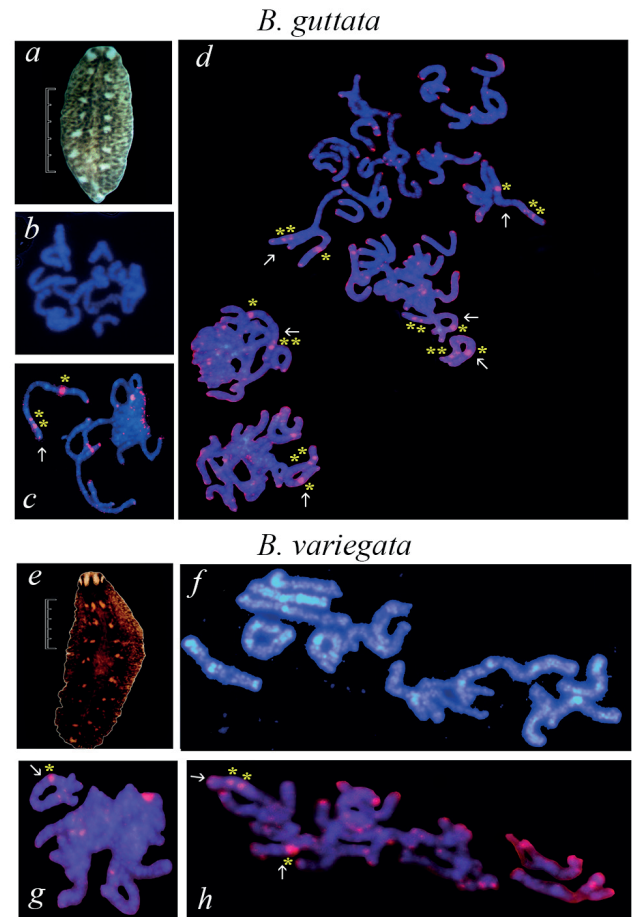
#### 4. Discussion and conclusions

##### 4.1. ITSs in parasitic and free-living flatworms

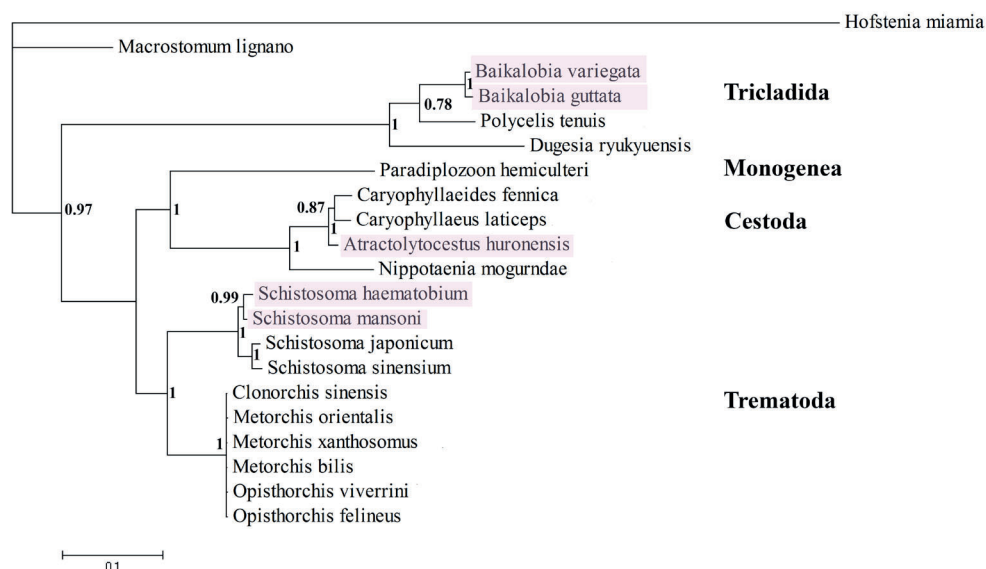
In the evolution of some groups of animals, intra- or interchromosomal rearrangements, as well as genomic mutations, played a decisive role (Trifonov

et al., 2012; 2016; Dehal and Boore, 2005). In this regard, tracking chromosomal mutation markers such as ITSs makes it possible to assess the contribution of chromosomal rearrangements to speciation.

During the evolution of flatworms, numerous karyotype transformations also occurred. As in the case of nematodes and other types of invertebrate animals (Stein et al., 2003; Ghedin et al., 2007; Dubinin et al., 1936), a significant contribution of intrachromosomal rearrangements was noted for flatworms (Swain et al., 2011), which is probably due to the presence of a large number of repeating sequences in their genome, including LTR retroelements (Grohme et al., 2018). ITSs data were obtained for a small number of representatives of different orders/classes (Table 1). Based on these data, we can conclude that ITSs are not typical for the chromosomes of these animals, as for other invertebrates. Previously, ITSs were found only in parasitic flatworms (Hirai, 2014; Špakulová et al., 2019). The detection of ITSs in the sex chromosomes of parasites, in this case schistosomes, is associated with several inversions and heterochromatization (Hirai et al., 2012; Hirai, 2014). The appearance of ITSs was associated with the spread of these parasites from Asia to Africa and with subsequent speciation (Hirai, 2012). It is worth noting that schistosomes have a unique sex determination system among hermaphroditic trematodes (ZZ male, ZW female), and the sex chromosomes have undergone significant reorganization during the evolution, as evidenced by ITSs. Baikal planarians, like most flatworms, are hermaphrodites and do not have separate gonosomes. Similarly, speciation in *Baikalobia* worms may have been accompanied by the emergence of ITSs (Fig. 1). Free-living flatworms often have genomic mutations associated with changes in the number of chromosomes. They can be random, as in the case of the macrostomorph *Macrostemum lignano*, which has a high percentage of aneuploids (Zadesenets et al., 2016). In the case of planarians, the adaptive nature of changes in the number of chromosomes was revealed:



**Fig.1.** Telomere signals (pink) in meiotic chromosomes of Baikal planarians (chromosomes stained with DAPI, blue): a, e – appearance of worms, the scale is 1 cm; b, f – 15 pairs of chromosomes; c, d, g, h – FISH shows telomeric repeats TTAGGG in *B. guttata* and *B. variegata*. Arrows point at chromosomes with ITS. Yellow asterisks indicate ITS. A number of chromosome sets is shown in figure d.



**Fig.2.** 18S rRNA gene phylogenetic tree (MrBayes 3.2.7). Species with ITSs are highlighted in pink. On the right are the flatworm order names. The nodes indicate the posterior probability values. The scale shows genetic distances.

with increasing latitude, the number of chromosomes also increased (Lorch et al., 2016). At the same time, changes in the number of chromosomes during the evolution of planarians accompanied speciation, for example in the genus *Bdellocephala*, including among the Baikal representatives (Umylina, 1971; Kuznedelov et al., 2000; Novikova et al., 2006). Concurrently, changes occurred in the morphology of chromosomes, which indicates a significant reorganization of the genome. The endemic planarians of Lake Baikal have, as a rule, 30 chromosomes with a predominance of metacentrics and submetacentrics in the karyotype (Umylina, 1973, 1976, 1977). The stability of the number of chromosomes and the rarity of telocentric and acrocentric chromosomes in this morphologically and ecologically very diverse group of triclads may indicate the predominance of intrachromosomal changes during the evolution of their genomes, as in other flatworms. Unfortunately, we do not know whether the common ancestor of all Baikal triclads had ITSs in their chromosomes or whether they appeared only during the evolution of a separate branch of *Baikalobia*.

## 4.2. ITSs and flatworm phylogeny

Early in the evolution of flatworms, an important event occurred involving the loss of centrosomes (Azimzadeh et al., 2012). This accompanied the emergence of several groups of flatworms, which are now combined into a taxon Acentrosomata. It includes four orders Tricladida, Fecampiida, Prolecithophora, Bothrioplanida and three class of parasitic worms Monogenea, Cestoda and Trematoda (Egger et al., 2015; Collins, 2017). ITSs were identified in representatives of Tricladida, Trematoda and Cestoda, but were absent in the studied representatives of other Acentrosomata, as well as in the rather distant clade Macrostomorpha (Fig. 2), indicating the independence of the pathways leading to the appearance of ITSs in free-living and parasitic flatworms. Within the order Tricladida, representatives of the two families Planariidae and Dugesiidae lack ITSs, but they appear in the family Dendrocoelidae among Baikal endemics (Fig. 1). Representatives of only this family are found in Lake Baikal.

Further study of ITSs in representatives of the family Dendrocoelidae will help to understand at what stage of evolution the genome reorganization occurred, leading to the appearance of ITSs, and whether this event was a feature of the Baikal endemics or all dendrocoelids.

## Acknowledgments

The work was carried out thanks to the State Project 0279-2021-0007 (121032300180-7) "Complex studies of the nearshore zone..." and 0279-2021-0005 (121032300224-8) "Environmental transformations of basins...", as well as was supported by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grants №51, №12-04-32052, №13-04-01270 and №18-34-00395.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References




- Azimzadeh J., Wong M.L., Downhour D.M. et al. 2012. Centrosome loss in the evolution of planarians. *Science* 335 (6067): 461–463. DOI: [10.1126/science.1214457](https://doi.org/10.1126/science.1214457)
- Bolzán A.D. 2012. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis* 27: 1–15. DOI: [10.1093/mutage/ger052](https://doi.org/10.1093/mutage/ger052)
- Bolzán A.D. 2017. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: origin, function, instability and evolution. *Mutation Research* 773: 51–65. DOI: [10.1016/j.mrrev.2017.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.04.002)
- Bolzán A.D., Bianchi M.S. 2006. Telomeres interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutation Research* 612: 189–214. DOI: [10.1016/j.mrrev.2005.12.003](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.12.003)
- Bombarová M., Vítková M., Spakulová M. et al. 2009. Telomere analysis of plathyhelminths and acanthocephalans by FISH and Southern hybridization. *Genome* 52 (11): 897–903. DOI: [10.1139/g09-063](https://doi.org/10.1139/g09-063)
- Collins J. J. 2017. Plathyhelminthes. *Current Biology* 27 (7): R252–R256. DOI: [10.1016/j.cub.2017.02.016](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.016)
- Dehal P., Boore J.L. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biology* 3 (10): e314. DOI: [10.1371/journal.pbio.0030314](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030314)
- Dubinin N.P., Sokolov N.N., Tiniakov G.G. 1936. Occurrence and distribution of chromosome aberration in nature (Diptera). *Nature* 137: 1035–1036
- Egger B., Lapraz F., Tomiczek B. et al. 2015. A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms. *Current Biology* 25 (10): 1347–1353. DOI: [10.1016/j.cub.2015.03.034](https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.034)
- García-Souto D., Pasantés J.J. 2015. Molecular cytogenetics in digenean parasites: linked and unlinked major and 5S rDNAs, B chromosomes and karyotype diversification. *Cytogenet Genome Research* 147 (2–3): 195–207. DOI: [10.1159/000442504](https://doi.org/10.1159/000442504)
- Ghedini E., Wang S., Spiro D. et al. 2007. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* 317(5845): 1756–1760. DOI: [10.1126/science.1145406](https://doi.org/10.1126/science.1145406)
- Grohme M.A., Schloissnig S., Rozanski A. et al. 2018. The genome of *Schmidtea mediterranea* and the evolution of core cellular mechanisms. *Nature* 554 (7690): 56–61. DOI: [10.1038/nature25473](https://doi.org/10.1038/nature25473)
- Godwin R., Brown I., Montgomery S. et al. 2012. Telomere dynamics in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*): an investigation into the effects of age, tissue type, location and time of sampling. *Marine Biology* 159: 77–86. DOI: [10.1007/s00227-011-1791-7](https://doi.org/10.1007/s00227-011-1791-7)
- Ijdo J., Wells R., Baldini A. et al. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acid Research* 19 (17): 4780. DOI: [10.1093/nar/19.17.4780](https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780)
- Hirai H. 2014. Chromosomal differentiation of schistosomes: what is the message? *Front Genet* 5: 301. DOI: [10.3389/fgene.2014.00301](https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00301)
- Hirai H., Hirai Y., LoVerde P.T. 2012. Evolution of sex chromosomes ZW of *Schistosoma mansoni* inferred from chromosome paint and BAC mapping analyses. *Parasitol Int* 61(4): 684–689. DOI: [10.1016/j.parint.2012.07.007](https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.007)
- Hirai H., Taguchi T., Saitoh M. et al. 2000. Chromosomal differentiation of the *Schistosoma japonicum* complex. *Int J Parasitol* 30: 441–452. DOI: [10.1016/s0020-7519\(99\)00186-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00186-1)

- Huelsenbeck J., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 7 (8): 754–755. DOI: [10.1093/bioinformatics/17.8.754](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754)
- Joffe B., Solovei I., Macgregor H. 1996. Ends of chromosomes in *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes) have telomere repeat TTAGGG. *Chromosome Res* 4: 323–324. DOI: [10.1007/BF02263686](https://doi.org/10.1007/BF02263686)
- Joffe B., Solovei I., Macgregor H. 1998. Ordered arrangement and rearrangement of chromosomes during spermatogenesis in two species of planarians (Plathelminthes). *Chromosoma* 107: 173–183. DOI: [10.1007/s004120050294](https://doi.org/10.1007/s004120050294)
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874. DOI: [10.1093/molbev/msw054](https://doi.org/10.1093/molbev/msw054)
- Kuznedelov K.D., Novikova O.A., Naumova T.V. 2000. The molecular genetic typification of planarians in the genus *Bdellocephala* (Dendrocoelidae, Tricladida, Turbellaria) from Lake Baikal with an assessment of their species diversity. *Zhurnal Obshey Biologii* 61(3): 336–44. (In Russian)
- Lin K.W., Yan J. 2008. Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research* 658: 95–110. DOI: [10.1016/j.mrrev.2007.08.006](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.006)
- Lorch S., Zeuss D., Brandl R. et al. 2016. Chromosome numbers in three species groups of freshwater flatworms increase with increasing latitude. *Ecol Evol* 6 (5): 1420–1429. DOI: [10.1002/ece3.1969](https://doi.org/10.1002/ece3.1969)
- Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H. et al. 1990. Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3–10. DOI: [10.1007/BF01737283](https://doi.org/10.1007/BF01737283)
- Moore A., Dominska M., Greenwell P. et al. 2018. Genetic control of genomic alterations induced in yeast by interstitial telomeric sequences. *Genetics* 209 (2): 425–438. DOI: [10.1534/genetics.118.300950](https://doi.org/10.1534/genetics.118.300950)
- Nomoto Y., Hirai M., Ueshima R. 2001. Cloning of molluscan telomere DNA with (TTAGGG)<sub>n</sub> repeat and its chromosomal location in the freshwater snail *Biwamelandia habei*. *Zoology Science* 18: 417–422. DOI: [10.2108/zsj.18.417](https://doi.org/10.2108/zsj.18.417)
- Novikova O., Naumova T., Timoshkin O. A. 2006. Karyotypes and current approaches to the systematics of endemic Baikal representatives of *Bdellocephala* genus (Turbellaria, Dendrocoelidae). *Hydrobiologia* 568 (S):183–191. DOI: [10.1007/s10750-006-0316-8](https://doi.org/10.1007/s10750-006-0316-8)
- Poon S.S., Martens U.M., Ward R.K. et al. 1999. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36: 267–278. DOI: [10.1002/\(sici\)1097-0320\(19990801\)36:4<267::aid-cyto1>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19990801)36:4<267::aid-cyto1>3.0.co;2-o)
- Porfiriev A., Zaytseva E., Koroleva A. et al. 2018. *Baikalobia elochinensis* sp. n. (Plathelminthes, Tricladida, Continenticola), a new species of endemic Baikal planarians: morphological and genetic comparison with the type species *Baikalobia guttata* (Gerstfeldt, 1858). *Zootaxa* 4472 (3): 563–572. DOI: [10.11646/zootaxa.4472.3.8](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4472.3.8)
- Ruiz-Herrera A., Nergadze S. G., Santagostino M. et al. 2008. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122: 219–228. DOI: [10.1159/000167807](https://doi.org/10.1159/000167807)
- Slijepcevic P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107 (2):136–140. DOI: [10.1007/s004120050289](https://doi.org/10.1007/s004120050289)
- Souza G., Vanzela A.L., Crosa O. et al. 2016. Interstitial telomeric sites and Robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). *Genetica* 144 (2): 157–166. DOI: [10.1007/s10709-016-9886-1](https://doi.org/10.1007/s10709-016-9886-1)
- Špakulová M., Bombarová M., Miklisová D. et al. 2019. How to become a successful invasive tapeworm: a case study of abandoned sexuality and exceptional chromosome diversification in the triploid carp parasite *Atractolytocestus huronensis* Anthony, 1958 (Caryophyllidea: Lytocestidae). *Parasites & Vectors* 12 (161): 1–11. DOI: [10.1186/s13071-019-3420-0](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3420-0)
- Stein L.D., Bao Z., Blasiar D. et al. 2003. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biology* 1 (2): E45. DOI: [10.1371/journal.pbio.0000045](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000045)
- Swain M.T., Larkin D.M., Caffrey C.R. et al. 2011. *Schistosoma* comparative genomics: integrating genome structure, parasite biology and anthelmintic discovery. *Trends Parasitology* 27 (12): 555–564. DOI: [10.1016/j.pt.2011.09.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.09.003)
- Tasaka K., Yokoyama N., Nodono H. et al. 2013. Innate sexuality determines the mechanisms of telomere maintenance. *Int J Dev Biol* 57 (1): 69–72. DOI: [10.1387/ijdb.120114mm](https://doi.org/10.1387/ijdb.120114mm)
- Thompson J., Higgins D., Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680. DOI: [10.1093/nar/22.22.4673](https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673)
- Traut W., Szczepanowski M., Vítková M. et al. 2007. The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Res* 15 (3): 371–382. DOI: [10.1007/s10577-007-1132-3](https://doi.org/10.1007/s10577-007-1132-3)
- Trifonov V.A., Musilova P., Kulemsina A.I. 2012. Chromosome evolution in Perissodactyla. *Cytogenet Genome Res* 137(2-4): 208–217. DOI: [10.1159/000339900](https://doi.org/10.1159/000339900)
- Trifonov V.A., Romanenko S.S., Beklemisheva V.R. et al. 2016. Evolutionary plasticity of acipenseriform genomes. *Chromosoma* 125 (4): 661–668. DOI: [10.1007/s00412-016-0609-2](https://doi.org/10.1007/s00412-016-0609-2)
- Vicari M.R., Bruschi D.P., Cabral-de-Mello D.C. et al. 2022. Telomere organization and the interstitial telomeric sites involvement in insects and vertebrates chromosome evolution. *Genet Mol Biol*. 45: e20220071. DOI: [10.1590/1678-4685-GMB-2022-0071](https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2022-0071)
- Vítková M., Král J., Traut W. et al. 2005. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)<sub>n</sub>. *Chromosome Res* 13 (2): 145–156. DOI: [10.1007/s10577-005-7721-0](https://doi.org/10.1007/s10577-005-7721-0)
- Umylina T. M. 1971. Karyotypes of Baikal planarians of *Bdellocephala* de Man genus (Turbellaria, Tricladida, Paludicola). *Zool J (Russia)* 50: 130–132. (In Russian)
- Umylina T. M. 1973. Meiotic chromosomes in planarians of the genus *Baikalobia* (Tricladida, Paludicola). *Zool J (Russia)* 52 (2): 261–263
- Umylina T. M. 1976. Karyological patterns of *Baikalobia guttata* (Tricladida, Paludicola). *Zool J (Russia)* 50 (7): 1087–1090
- Umylina T. M. 1977. Karyology and modern taxonomy of Baikal planarians. Ph.D. Thesis, Kazan State University, Kazan, Russia
- Zadesenets K.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. et al. 2012. Telomeric DNA in chromosomes of five opisthorchid species. *Parasitol Int* 61 (1): 81–83. DOI: [10.1016/j.parint.2011.06.013](https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.013)
- Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A. et al. 2016. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One* 11 (10): e0164915. DOI: [10.1371/journal.pone.0164915](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164915)

# Внутренние теломерные последовательности в хромосомах байкальских планарий

Оригинальная статья

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Королева А.Г.<sup>1\*</sup>, Евтушенко Е.В.<sup>2</sup>, Зайцева Е.П.<sup>3</sup>, Порфирьев А.Г.<sup>4</sup>, Тимошкин О.А.<sup>1</sup>, Кирильчик С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лимнологический институт, Сибирское отделение Российской академии наук, 664033, Улан-Баторская, 3, Иркутск, Россия

<sup>2</sup>Институт молекулярной и клеточной биологии, Сибирское отделение Российской академии наук, 630090, проспект Лаврентьева, 8/2, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Байкальский музей, Сибирское отделение Российской академии наук, 664520, Академическая, 1, Листвянка, Россия

<sup>4</sup>Казанский федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Отделение зоологии и общей биологии, 420008, Кремлевская, 18, Казань, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Наличие внутренних теломерных последовательностей в хромосомах (ITS), как правило, указывает на случаи реорганизации генома. Изменения морфологии и числа хромосом могут быть источниками внутривидового полиморфизма, а также приводить к видообразованию. У плоских червей обнаружены оба варианта, при этом ITS в хромосомах встречаются редко, что характерно и для других беспозвоночных животных. Из 23 исследованных видов плоских червей ITS были выявлены только у трех паразитических видов. С помощью FISH с теломерными зондами мы обнаружили, что ITS также присутствуют в хромосомах эндемичных байкальских планарий *Baikalobia* Kenk, 1930 (Tricladida, Continenticola, Dendrocoelidae). Это первый случай выявления ITS у свободноживущих плоских червей. Как у *Shistosoma* Weinland, 1858, появление ITS у байкальских планарий могло быть связано с процессом видообразования. Пока нет данных о ITS у других дендроцелид, и остается открытым вопрос о том, являются ли ITS специфической чертой байкальских обитателей или это особая черта всех представителей Dendrocoelidae.

**Ключевые слова:** внутрихромосомные теломерные последовательности, ITS, FISH, плоские черви, планарии, Байкал

## 1. Введение

Внутренние теломерные последовательности (ITS) – это теломерная ДНК, локализованная в любом участке хромосом, кроме терминальных регионов (Meune et al., 1990). Они могут возникать по нескольким причинам, в том числе в результате хромосомных перестроек в процессе эволюции генома, репарации двухцепочечных разрывов ДНК и внедрения экстрахромосомной теломерной ДНК в хромосомы и ее амплификации (Bolzán and Bianchi, 2006; Ruiz-Herrera et al., 2008; Bolzán, 2012). Как правило, ITS не связаны с функциями теломер, если не учитывать их определенную роль в поддержании пластичности генома, т. к. известно, что они индуцируют мутации и локализуются в хрупких сайтах, по которым происходят разрывы хромосом (Moore et al., 2018; Lin and Yan, 2008).

Выделяют четыре группы ITS: короткие, субтеломерные, слитые (появившиеся в результате слияния хромосом) и гетерохроматиновые (Bolzán,

2017). Они отличаются размерами, локализацией и нуклеотидным окружением, а также возникают благодаря разным механизмам. Короткие ITS имеют размер 100-120 пн и могут быть окружены как уникальными последовательностями, так и SINE, LINE, LTR ретротранспозонами. Длина субтеломерных ITS измеряется сотнями нуклеотидов и может включать в себя вырожденные теломерные повторы. Слитые ITS имеют ориентацию голова-к-голове и фланкированы субтеломерной ДНК, что указывает на случаи объединения двух хромосом в теломерных областях. Их размеры могут варьировать от нескольких тпн до нескольких десятков тпн. Гетерохроматиновые ITS – это самые большие последовательности размером до нескольких сотен тпн. Они часто обнаруживаются в прицентромерных областях, но могут встречаться и на плечах хромосом, а также образовывать микрохромосомы (Bolzán, 2017).

Чувствительность обычной Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) позволяет визуализировать

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [ankor-2015@yandex.ru](mailto:ankor-2015@yandex.ru) (А.Г. Королева)

Поступила: 26 декабря 2023; Принята: 05 февраля 2024;

Опубликована online: 29 февраля 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





последовательности длиной 1000 пн и более (Roop et al., 1999), т.е. с помощью этого метода сложно обнаружить короткие и субтеломерные ITS. Однако наиболее значимые в эволюции кариотипа хромосомные перестройки, которые могут затрагивать теломерные регионы, этот метод способен зафиксировать. В хромосомах позвоночных животных ITS размером более 1000 пн довольно часто встречаются и расположены главным образом вблизи центромер (Meune et al., 1990; Bolzán et al., 2017; Vicari et al., 2022). Как правило, это является следствием робертсоновских транслокаций (Slijepcevic, 1998), хотя не всегда такие хромосомные мутации приводят к появлению ITS (Souza et al., 2016). Из того, что известно о хромосомах беспозвоночных животных можно сказать, что ITS размером более 1000 пн в них не так широко распространены (Vítková et al., 2005; Traut et al., 2007; Vicari et al., 2022). Например, среди моллюсков такие ITS были обнаружены только у двух из 23 исследованных в этом отношении видов (Nomoto et al., 2001; Godwin et al., 2012). Среди плоских червей известны данные FISH с теломерными зондами для 23 видов, причем большинство из них – паразиты (Таблица 1), и ITS обнаружены только в половых хромосомах двух видов трематод (Hirai, 2014) и одного вида цестод (Špakulová et al., 2019). У свободноживущих плоских червей ITS еще не были выявлены.

Мы использовали FISH с теломерными зондами для выявления локализации теломерных повторов в хромосомах двух видов эндемичных планарий рода *Baikalobia*, автохтонной группы байкальских Dendrocoelidae. ITS были обнаружены у обоих видов червей. Также в этой работе мы проанализировали филогенетические отношения плоских червей с учетом ITS в их хромосомах.

## 2. Материалы и методы

Планарии были собраны в сентябре 2011 г в заливе Листвяничный озера Байкал (51°52'02.4»N 104°49'55.2»E). Сбор осуществлялся вручную кисточкой с глубины 1 м с камней. Особи были помещены в термоконтейнер с байкальской водой и доставлены в лабораторию, где содержались до анализа. Для FISH использовались ткани двух видов эндемичного байкальского рода *Baikalobia*: *B. guttata* Gerstfeldt, 1858 и *B. variegata* Korotneff, 1912 (по особи каждого вида). Виды, включенные в филогенетический анализ, представлены в Таблице 1.

### 2.1. Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)

Хромосомные препараты готовили из гомогенизированных тканей червей. Ткани помещали в 0.56% KCl, измельчали и оставляли при 37°C на 15 мин. Затем фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3:1), выдерживали при +5°C 15 мин, центрифугировали, убирали надосадочную жидкость и снова повторяли процедуру три раза. На охлажденные до -20°C предметные стекла капали

суспензию клеток над водяными парами (70-80°C) и высушивали в течение 10 мин. Перед гибридизацией препараты выдерживали при комнатной температуре несколько суток.

Теломерную пробу получали безматричной ПЦР (Ijdo et al., 1991) и метили ее Bio-11-dUTP посредством ПЦР с праймерами на теломерные районы. FISH теломерной пробы на препаратах проводили в соответствии с протоколом (Joffe et al., 1998) с некоторыми изменениями. После отмывки в 1-кратном PBS, содержащем 50 mM Mg<sup>2+</sup>, препараты обрабатывали 0.12% трипсином в течение 20 с. Далее препараты фиксировали в 0.5% формальдегиде и 1-кратном PBS 10 мин, промывали в 2-кратном SSC и дегидрировали в этаноле. Гибридизационная смесь (20 мкл) содержала 50% формамид, 2хSSC и теломерный зонд. Перед гибридизацией смесь денатурировали в течение 5 мин при 96°C, охлаждали во льду и наносили на препарат. Гибридизация шла в течение ночи при 42°C. Детекция биотинилированного зонда проводилась с помощью флуоресцентно меченого стрептавидина (Streptavidin-Cy3, Sigma, США). Препараты окрашивали флуорохромом DAPI (4,6-диамино-2-фенилиндол, 0.5 мкг/мл) в среде Vectashield (Vector laboratories, Великобритания) и анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX51. Хромосомы фотографировали при увеличении 100х (камера DP70, источник света X-Cite 120Q).

### 2.2. Филогенетический анализ

Выделение ДНК, ПЦР гена 18S рРНК и секвенирование проводились, как описано в работе Порфирьева с соавторами (Porfiriev et al., 2018). Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей осуществлялось в программе ClustalW1.6 (Thompson et al., 1994). Филогенетическая реконструкция проводилась в программе MrBayes (3.2.7) (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) при использовании модели GTR + G. Цепи Маркова (MCMC) рассчитывались в течение 1000000 поколений (4 цепи параллельно) с частотой записи параметров каждую 1000 генераций. Первые 25% генераций использовались для стабилизации метода правдоподобия, а остальные – для оценки апостериорной вероятности. Критерием достоверности служила апостериорная вероятность, превышающая 95%. Также реконструкция деревьев проводилась в пакете программ MEGA7 (Kumar et al., 2016), где использовались метод ближайших соседей (Neighbor-Joining) и двухпараметрическая модель Кимуры (K2P) с бутстреп тестом (1000 репликаций). Графическая редакция дерева осуществлялась в программах FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) и MEGA7.

## 3. Результаты

### 3.1. FISH

FISH была проведена для двух видов байкальских планарий *B. guttata* и *B. variegata* (Рис. 1).

Таблица 1. Виды, проанализированные на наличие ITS, и их гены 18S рРНК

Виды	2n	ITS (FISH)	Номер в GenBank 18S rRNA
TRICLADIDA			
<i>Baikalobia guttata</i> Gerstfeldt, 1858	30	есть <sup>1</sup>	KY848668.1
<i>B. variegata</i> Korotneff, 1912	30	есть <sup>1</sup>	OR758633.1
<i>Polycelis tenuis</i> Ijima, 1884	14	нет <sup>2</sup>	Z99949.1
<i>Dugesia ryukuensis</i> Kawakatsu, 1976	14	нет <sup>2</sup>	AF050433.1 (type II)
MONOGENEA			
<i>Paradiplozoon homoion</i> Bychowsky et Nagibina, 1959	14	нет <sup>3</sup>	KY640614.1
CESTODA			
<i>Caryophyllaeus laticeps</i> Pallas, 1781	20	нет <sup>4</sup>	AJ287488.1
<i>Caryophyllaeides fennica</i> Schneider, 1902	20	нет <sup>4</sup>	KF990172.1
<i>Nippotaenia mogurndae</i> Yamaguti et Miyata, 1940	28	нет <sup>4</sup>	AJ287545.1
<i>Atractolytocestus huronensis</i> Anthony, 1958	24 (3n)	есть <sup>9</sup>	OM972659.1
TREMATODA			
<i>Schistosoma mansoni</i> Sambo, 1907	16	есть <sup>5</sup>	U65657.1
<i>S. haematobium</i> Bilharz, 1852	16	есть <sup>5</sup>	Z11976.1
<i>S. japonicum</i> Katsurada, 1904	16	нет <sup>5</sup>	Z11590.1
<i>S. sinensium</i> Pao, 1959	16	нет <sup>5</sup>	AY157225.1
<i>Clonorchis sinensis</i> Looss, 1907	14	нет <sup>6</sup>	JF823988.1
<i>Metorchis xanthosomus</i> Creplin, 1846	14	нет <sup>6</sup>	OK384552.1
<i>M. bilis</i> (Braun, 1790) Odening, 1962	14	нет <sup>6</sup>	OK384551.1
<i>M. orientalis</i> Tanabe, 1920	-	-	JF314771.1
<i>Opisthorchis viverrini</i> (Poirier, 1886) Stiles & Hassal, 1896	14	нет <sup>6</sup>	JF823987.1
<i>O. felineus</i> Rivolta, 1884 Blanchard, 1895	14	нет <sup>6</sup>	MF077357.1
<i>Bucephalus minimus</i> (Stossich, 1887) Nicoll, 1914	14	нет <sup>7</sup>	-
<i>B. australis</i> (Szidat, 1961) Yamaguti, 1971	14	нет <sup>7</sup>	-
<i>Monascus filiformis</i> (Rudolphi, 1819) Looss, 1907	18	нет <sup>7</sup>	-
<i>Cercaria longicaudata</i> Tang, 1990	16	нет <sup>7</sup>	-
<i>Bacciger bacciger</i> (Rudolphi, 1819) Nicoll, 1914	12	нет <sup>7</sup>	-
MACROSTOMORPHA			
<i>Macrostomum lignano</i> Ladurner, Schärer, Salvenmoser, & Rieger, 2005	8	нет <sup>8</sup>	FJ715306.1
ACOELOMORPHA (внешняя группа)			
<i>Hofstenia miamia</i> Correa 1960	-	-	AM701817.1

**Примечание:** 1 – получены нами; 2 - Joffe et al., 1996; 3 - Tasaka et al., 2013; 4 - Bombarová et al., 2009; 5 - Hirai et al., 2000, Hirai, 2014; 6 - Zadesenets et al., 2012; 7 - García-Souto and Pasantes, 2015; 8 - Zadesenets et al., 2016; 9 - Špakulová et al., 2019. Тире означают отсутствие информации.

Гаплоидный набор у них одинаков и составляет 15 хромосом, что было показано Т. М. Умылиной в 70-ых годах (Умылина, 1973; 1976; 1977). Из рисунка 1 видно, что повторы TTAGGG присутствуют не только на концах, но и внутри хромосом, что говорит о наличии ITS у анализируемых видов. При этом у вида *B. guttata* они располагаются в одной хромосоме (Рис. 1 с, d), а у вида *B. variegata* ITS, вероятно, они располагаются на двух разных хромосомах (Рис. 1 h).

### 3.2. Филогенетический анализ видов и ITS

Для проведения филогенетического анализа были получены нуклеотидные последовательности гена 18S рРНК для *B. guttata* и *B. variegata*, для других видов плоских червей последовательности этого гена были взяты из базы данных GenBank (Таблица 1). Длина анализируемых регионов после выравнивания составила около 2000 пн. 655 информативных сайта было выявлено. В обеих программах

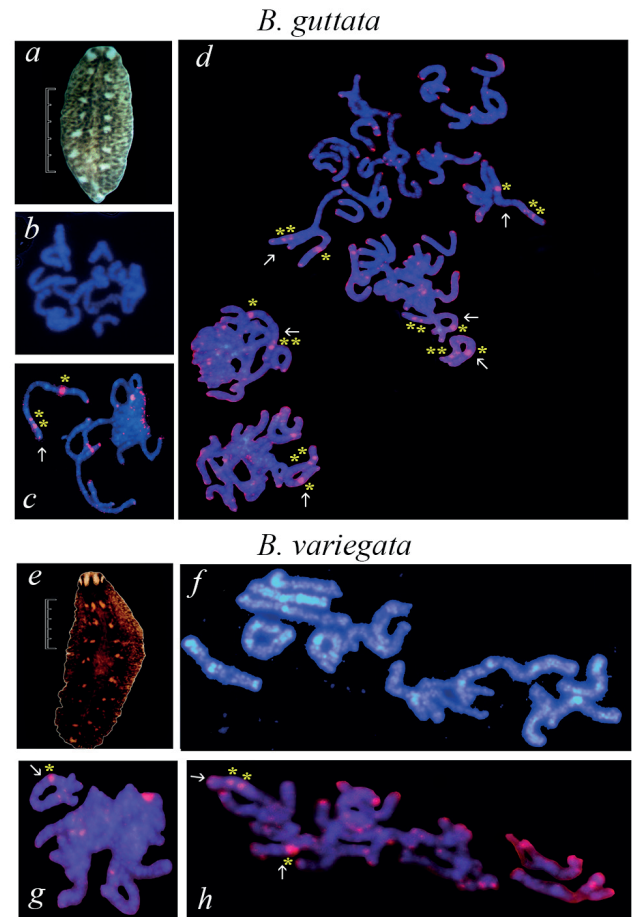
MrBayes 3.2.7 и MEGA7 были получены деревья схожей топологии. На рисунке 2 представлено филогенетическое дерево, полученное в MrBayes. В целом представители разных отрядов кластеризуются в отдельные клады с высокой статистической поддержкой, представитель Macrostromorpha образует отдельную ветвь, наряду с внешней группой *Hofstena miamia*.

#### 4. Обсуждение и выводы

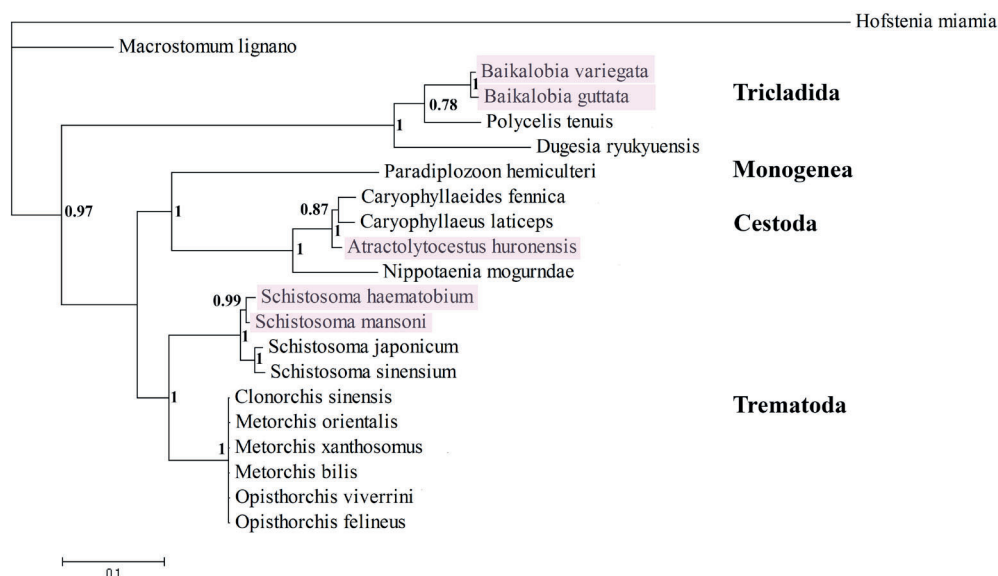
##### 4.1. ITS у паразитических и свободноживущих плоских червей

В эволюции некоторых групп животных внутри- или межхромосомные перестройки, а также геномные мутации сыграли решающую роль (Trifonov et al., 2012; 2016; Dehal and Boore, 2005). В связи с этим, отслеживание таких маркеров хромосомных мутаций как ITS позволяет оценить вклад хромосомных перестроек в видообразование.

В эволюции плоских червей также происходили многочисленные преобразования кариотипа. Также как в случае нематод и других типов беспозвоночных животных (Stein et al., 2003; Ghedin et al., 2007; Dubinin et al., 1936), для плоских червей отмечен значительный вклад внутривхромосомных перестроек (Swain et al., 2011), что, вероятно, связано с присутствием в их геноме большого количества повторяющихся последовательностей, в том числе LTR ретроэлементов (Grohme et al., 2018). Данные по ITS получены для небольшого числа представителей разных отрядов/классов (Таблица 1). Исходя из этих данных, можно сделать вывод о том, что для хромосом этих животных ITS не характерны, как и для других беспозвоночных. Ранее только у паразитических плоских червей были обнаружены ITS (Hirai, 2014; Špakulová et al., 2019). Обнаружение ITS в половых хромосомах паразитов, в данном случае шистосом, связано с несколькими



**Рис.1.** Теломерные сигналы (розовый) в мейотических хромосомах байкальских планарий (хромосомы окрашены DAPI, синий): a, e – внешний вид червей, шкала 1 см; b, f – 15 пар хромосом; c, d, g, h – FISH показывает теломерные повторы TTAGGG у *B. guttata* и *B. variegata*. Стрелки указывают на хромосомы с ITS. Желтыми звездочками отмечены ITS. Несколько хромосомных наборов показано на рисунке d.



**Рис.2.** Филогенетическое дерево, реконструированное по последовательностям гена 18S рРНК (MrBayes 3.2.7). Розовым цветом выделены виды с ITS. Справа приведены названия отрядов. В узлах указаны значения апостериорной вероятности. Шкала демонстрирует генетические расстояния.

инверсиями и гетерохроматизацией (Hirai et al., 2012; Hirai, 2014). Появление ITS у них было ассоциировано с распространением этих паразитов из Азии в Африку и с последующим видообразованием (Hirai, 2012). Стоит отметить, что шистосомы имеют уникальную среди гермафродитных трематод систему определения пола (ZZ самец, ZW самка), и именно половые хромосомы подверглись значительной реорганизации в процессе эволюции этого рода, о чем свидетельствуют ITS. Байкальские планарии, также как и большинство плоских червей, являются гермафродитами и не имеют отдельных гоносом. Однако появление у представителей рода *Baikalobia* ITS (Рис. 1) также могло сопровождать видообразование. У свободноживущих плоских червей часто встречаются геномные мутации, связанные с изменением числа хромосом. Они могут носить случайный характер, как в случае макростоморфы *Macrostemum lignano*, у которой был отмечен высокий процент анеуплоидов (Zadesenets et al., 2016). В случае планарий был выявлен адаптивный характер изменения числа хромосом: с увеличением широты обитания число хромосом также увеличивалось (Lorch et al., 2016). В то же время, изменение числа хромосом в процессе эволюции планарий сопровождало видообразование, например в роде *Bdellocephala*, в том числе среди байкальских представителей (Умылина, 1971; Кузнецов и др., 2000; Novikova et al., 2006). При этом происходили и изменения в морфологии хромосом, что указывает на значительную реорганизацию генома. Байкальские эндемичные планарии имеют, как правило, 30 хромосом с преобладанием в кариотипе метацентриков и субметацентриков (Умылина, 1973, 1976, 1977). Стабильность числа хромосом и редкость телоцентрических и акроцентрических хромосом у этой очень разнообразной в морфологическом и экологическом плане группы триклад может указывать на преобладание в процессе эволюции их геномов внутривидовых изменений, как и у других плоских червей. К сожалению, мы не знаем, имел ли общий предок всех байкальских триклад ITS в хромосомах или они появились только в процессе эволюции отдельной ветви *Baikalobia*.

## 4.2. ITS и филогения плоских червей

В самом начале эволюции плоских червей произошло важное событие, связанное с потерей центросом (Azimzadeh et al., 2012). Это сопровождало возникновению нескольких групп плоских червей, которые сейчас объединяют в таксон Acentrosomata. Он включает четыре отряда Tricladida, Fecampiida, Prolecithophora, Bothrioplanida и три класса паразитических червей Monogenea, Cestoda и Trematoda (Egger et al., 2015; Collins, 2017). ITS были выявлены у представителей Tricladida, Trematoda и Cestoda, но отсутствовали у исследованных представителей других Acentrosomata, а также у довольно далекой кланды *Macrostomorpha* (Рис. 2), что указывает на независимость путей, приведших к появлению ITS

у свободноживущих и паразитических плоских червей. Внутри отряда Tricladida у представителей двух семейств Planariidae и Dugesidae ITS отсутствуют, но появляются в семействе Dendrocoelidae среди байкальских эндемиков (Рис.1). В Байкале встречаются представители только этого семейства.

Дальнейшее исследование ITS у представителей семейства Dendrocoelidae поможет понять, на каком этапе эволюции произошла реорганизация генома, приведшая к появлению ITS, и было ли это особенностью байкальских эндемиков или всех дендроцелид.

## Благодарности

Работа была выполнена при поддержке бюджетных проектов 0279-2021-0007 (121032300180-7) «Комплексное исследование прибрежной зоны...» and 0279-2021-0005 (121032300224-8) «Исследование трансформаций состояния водоемов...», а также грантами РФФИ №51, №12-04-32052, №13-04-01270 и №18-34-00395.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Кузнецов К.Д., Новикова О.А., Наумова Т.В. 2000. Молекулярно-генетическая типизация планарий рода *Bdellocephala* (Dendrocoelidae, Tricladida, Turbellaria) озера Байкал с оценкой видового разнообразия. Журнал общей биологии 61(3): 336–344
- Умылина Т.М. 1971. Кариотипы байкальских планарий рода *Bdellocephala* de Man (Turbellaria, Tricladida, Paludicola). Зоологический журнал 50: 130–132
- Умылина Т.М. 1973. Мейотические хромосомы планарий рода *Baikalobia* (Tricladida, Paludicola). Зоологический журнал 52 (2): 261–263
- Умылина Т.М. 1976. Кариологические особенности планарии *Baikalobia guttata* (Tricladida, Paludicola). Зоологический журнал 50 (7): 1087–1090
- Умылина Т.М. 1977. Кариология и современная таксономия планарий Байкала. 1977. Диссертация канд.биол. наук, Казанский Государственный университет, Казань
- Azimzadeh J., Wong M.L., Downhour D.M. et al. 2012. Centrosome loss in the evolution of planarians. Science 335 (6067): 461–463. DOI: [10.1126/science.1214457](https://doi.org/10.1126/science.1214457)
- Bolzán A.D. 2012. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. Mutagenesis 27: 1–15. DOI: [10.1093/mutage/ger052](https://doi.org/10.1093/mutage/ger052)
- Bolzán A.D. 2017. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: origin, function, instability and evolution. Mutation Research 773: 51–65. DOI: [10.1016/j.mrrev.2017.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.04.002)
- Bolzán A.D., Bianchi M.S. 2006. Telomeres interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. Mutation Research 612: 189–214. DOI: [10.1016/j.mrrev.2005.12.003](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.12.003)
- Bombardová M., Vítková M., Spakulová M. et al. 2009. Telomere analysis of platyhelminths and acanthocephalans by FISH and Southern hybridization. Genome 52 (11): 897–903. DOI: [10.1139/g09-063](https://doi.org/10.1139/g09-063)

- Collins J. J. 2017. Platyhelminthes. *Current Biology* 27 (7): R252–R256. DOI: [10.1016/j.cub.2017.02.016](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.016)
- Dehal P., Boore J.L. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biology* 3 (10): e314. DOI: [10.1371/journal.pbio.0030314](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030314)
- Dubin N.P., Sokolov N.N., Tiniakov G.G. 1936. Occurrence and distribution of chromosome aberration in nature (Diptera). *Nature* 137: 1035–1036
- Egger B., Lapraz F., Tomiczek B. et al. 2015. A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms. *Current Biology* 25 (10): 1347–1353. DOI: [10.1016/j.cub.2015.03.034](https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.034)
- García-Souto D., Pasantes J.J. 2015. Molecular cytogenetics in digenean parasites: linked and unlinked major and 5S rDNAs, B chromosomes and karyotype diversification. *Cytogenet Genome Research* 147 (2–3): 195–207. DOI: [10.1159/000442504](https://doi.org/10.1159/000442504)
- Ghedini E., Wang S., Spiro D. et al. 2007. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* 317(5845): 1756–1760. DOI: [10.1126/science.1145406](https://doi.org/10.1126/science.1145406)
- Grohme M.A., Schloissnig S., Rozanski A. et al. 2018. The genome of *Schmidtea mediterranea* and the evolution of core cellular mechanisms. *Nature* 554 (7690): 56–61. DOI: [10.1038/nature25473](https://doi.org/10.1038/nature25473)
- Godwin R., Brown I., Montgomery S. et al. 2012. Telomere dynamics in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*): an investigation into the effects of age, tissue type, location and time of sampling. *Marine Biology* 159: 77–86. DOI: [10.1007/s00227-011-1791-7](https://doi.org/10.1007/s00227-011-1791-7)
- Ijdo J., Wells R., Baldini A. et al. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) n generated by PCR. *Nucleic Acid Research* 19 (17): 4780. DOI: [10.1093/nar/19.17.4780](https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780)
- Hirai H. 2014. Chromosomal differentiation of schistosomes: what is the message? *Front Genet* 5: 301. DOI: [10.3389/fgene.2014.00301](https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00301)
- Hirai H., Hirai Y., LoVerde P.T. 2012. Evolution of sex chromosomes ZW of *Schistosoma mansoni* inferred from chromosome paint and BAC mapping analyses. *Parasitol Int* 61(4): 684–689. DOI: [10.1016/j.parint.2012.07.007](https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.007)
- Hirai H., Taguchi T., Saitoh M. et al. 2000. Chromosomal differentiation of the *Schistosoma japonicum* complex. *Int J Parasitol* 30: 441–452. DOI: [10.1016/s0020-7519\(99\)00186-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00186-1)
- Huelsenbeck J., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 7 (8): 754–755. DOI: [10.1093/bioinformatics/17.8.754](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754)
- Joffe B., Solovei I., Macgregor H. 1996. Ends of chromosomes in *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes) have telomere repeat TTAGGG. *Chromosome Res* 4: 323–324. DOI: [10.1007/BF02263686](https://doi.org/10.1007/BF02263686)
- Joffe B., Solovei I., Macgregor H. 1998. Ordered arrangement and rearrangement of chromosomes during spermatogenesis in two species of planarians (Plathelminthes). *Chromosoma* 107: 173–183. DOI: [10.1007/s004120050294](https://doi.org/10.1007/s004120050294)
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874. DOI: [10.1093/molbev/msw054](https://doi.org/10.1093/molbev/msw054)
- Lin K.W., Yan J. 2008. Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research* 658: 95–110. DOI: [10.1016/j.mrrev.2007.08.006](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.006)
- Lorch S., Zeuss D., Brandl R. et al. 2016. Chromosome numbers in three species groups of freshwater flatworms increase with increasing latitude. *Ecol Evol* 6 (5): 1420–1429. DOI: [10.1002/ece3.1969](https://doi.org/10.1002/ece3.1969)
- Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H. et al. 1990. Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3–10. DOI: [10.1007/BF01737283](https://doi.org/10.1007/BF01737283)
- Moore A., Dominska M., Greenwell P. et al. 2018. Genetic control of genomic alterations induced in yeast by interstitial telomeric sequences. *Genetics* 209 (2): 425–438. DOI: [10.1534/genetics.118.300950](https://doi.org/10.1534/genetics.118.300950)
- Nomoto Y., Hirai M., Ueshima R. 2001. Cloning of molluscan telomere DNA with (TTAGGG)<sub>n</sub> repeat and its chromosomal location in the freshwater snail *Biwamelania habei*. *Zoology Science* 18: 417–422. DOI: [10.2108/zsj.18.417](https://doi.org/10.2108/zsj.18.417)
- Novikova O., Naumova T., Timoshkin O. A. 2006. Karyotypes and current approaches to the systematics of endemic Baikal representatives of *Bdellocephala* genus (Turbellaria, Dendrocoelidae). *Hydrobiologia* 568 (S):183–191. DOI: [10.1007/s10750-006-0316-8](https://doi.org/10.1007/s10750-006-0316-8)
- Poon S.S., Martens U.M., Ward R.K. et al. 1999. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36: 267–278. DOI: [10.1002/\(sici\)1097-0320\(19990801\)36:4<267::aid-cyto1>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19990801)36:4<267::aid-cyto1>3.0.co;2-o)
- Porfiriev A., Zaytseva E., Koroleva A. et al. 2018. *Baikalobia elochinensis* sp. n. (Plathelminthes, Tricladida, Continenticola), a new species of endemic Baikal planarians: morphological and genetic comparison with the type species *Baikalobia guttata* (Gerstfeldt, 1858). *Zootaxa* 4472 (3): 563–572. DOI: [10.11646/zootaxa.4472.3.8](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4472.3.8)
- Ruiz-Herrera A., Nergadze S. G., Santagostino M. et al. 2008. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122: 219–228. DOI: [10.1159/000167807](https://doi.org/10.1159/000167807)
- Slijepcevic P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107 (2):136–140. DOI: [10.1007/s004120050289](https://doi.org/10.1007/s004120050289)
- Souza G., Vanzela A.L., Crosa O. et al. 2016. Interstitial telomeric sites and Robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). *Genetica* 144 (2): 157–166. DOI: [10.1007/s10709-016-9886-1](https://doi.org/10.1007/s10709-016-9886-1)
- Špakulová M., Bombarová M., Miklišová D. et al. 2019. How to become a successful invasive tapeworm: a case study of abandoned sexuality and exceptional chromosome diversification in the triploid carp parasite *Atractolytocestus huronensis* Anthony, 1958 (Caryophyllidea: Lytocestidae). *Parasites & Vectors* 12 (161): 1–11. DOI: [10.1186/s13071-019-3420-0](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3420-0)
- Stein L.D., Bao Z., Blasiar D. et al. 2003. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biology* 1 (2): E45. DOI: [10.1371/journal.pbio.0000045](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000045)
- Swain M.T., Larkin D.M., Caffrey C.R. et al. 2011. *Schistosoma* comparative genomics: integrating genome structure, parasite biology and anthelmintic discovery. *Trends Parasitology* 27 (12): 555–564. DOI: [10.1016/j.pt.2011.09.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.09.003)
- Tasaka K., Yokoyama N., Nodono H. et al. 2013. Innate sexuality determines the mechanisms of telomere maintenance. *Int J Dev Biol* 57 (1): 69–72. DOI: [10.1387/ijdb.120114mm](https://doi.org/10.1387/ijdb.120114mm)
- Thompson J., Higgins D., Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680. DOI: [10.1093/nar/22.22.4673](https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673)
- Traut W., Szczepanowski M., Vítková M. et al. 2007. The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Res* 15 (3): 371–382. DOI: [10.1007/s10577-007-1132-3](https://doi.org/10.1007/s10577-007-1132-3)
- Trifonov V.A., Musilova P., Kulemsina A.I. 2012. Chromosome evolution in Perissodactyla. *Cytogenet Genome Res* 137(2-4): 208–217. DOI: [10.1159/000339900](https://doi.org/10.1159/000339900)
- Trifonov V.A., Romanenko S.S., Beklemisheva V.R. et al. 2016. Evolutionary plasticity of acipenseriform genomes. *Chromosoma* 125 (4): 661–668. DOI: [10.1007/s00412-016-](https://doi.org/10.1007/s00412-016-)

[0609-2](#)

Vicari M.R., Bruschi D.P., Cabral-de-Mello D.C. et al. 2022. Telomere organization and the interstitial telomeric sites involvement in insects and vertebrates chromosome evolution. *Genet Mol Biol.* 45: e20220071. DOI: [10.1590/1678-4685-GMB-2022-0071](#)

Vítková M., Král J., Traut W. et al. 2005. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)<sub>n</sub>. *Chromosome Res* 13 (2): 145–156. DOI: [10.1007/s10577-005-7721-0](#)

Zadesenets K.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. et al. 2012. Telomeric DNA in chromosomes of five opisthorchid species. *Parasitol Int* 61 (1): 81–83. DOI: [10.1016/j.parint.2011.06.013](#)

Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A. et al. 2016. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One* 11 (10): e0164915. DOI: [10.1371/journal.pone.0164915](#)

# The detection of three species complexes similar to *Diacyclops galbinus*, *D. versutus* and *D. improcerus* (Copepoda: Cyclopoida) from Lake Baikal

Mayor T.Yu.\*<sup>ORCID</sup>, Zaidykov I.Yu.<sup>ORCID</sup>, Kirilchik S.V.<sup>ORCID</sup>

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** Cyclopoids are an extremely diverse and abundant group of arthropods found in Lake Baikal. *Diacyclops* Kiefer, 1927 is the most species-rich and highly endemic genus among them. The morphological characteristics of the three Baikal species, *D. improcerus*, *D. galbinus* and *D. versutus*, show considerable differences. Therefore, it is worth considering whether all specimens identified as *versutus*, *galbinus*, or *improcerus* belong to the same species. Molecular and morphological analyzes were conducted on *Diacyclops* from Lake Baikal, which are similar to *D. improcerus*, *D. galbinus* and *D. versutus*. Three molecular markers of mtDNA (COI, 12S) and nuclear DNA (ITS1) revealed three clusters corresponding to the division of specimens into three groups based on morphological characteristics. Each of these groups comprises multiple genetic lineages. We assume that the *improcerus*-, *galbinus*-, and *versutus*- groups are closely related species complexes. The use of PCA for morphometric indices based on linear measurements, which are widely used in Cyclopoida taxonomy, is limited in separating closely related species within species complexes. Micrographs and line drawings of a fourth swimming leg (P4) and an antenna from specimens of the *versutus*- and *improcerus*- groups are provided. These images reveal significant differences in the spinule ornamentation of the coxopodite of P4 and the basipodite of the antenna between specimens of different genetic lineages.

**Keywords:** Baikal, *Diacyclops*, Cyclopoida, biodiversity, endemic species

## 1. Introduction

Cyclopoids are one of the most abundant and diverse groups of arthropods surpassed only by amphipods, ostracods, and harpacticoids in Lake Baikal (Timoshkin, 2001). *Diacyclops* Kiefer, 1927 and *Acanthocyclops* Kiefer, 1927 are the most species-rich genera. Both genera are taxonomically complex and unstable because of their close relation and large number of diverse species. There are several morphological groups in *Diacyclops* that are recognized as species complexes (Pesce, 1994; Karanovic, Krajicek, 2012; Reid and Strayer, 1994). *Diacyclops* in Lake Baikal is represented by 17 species, 15 of which are endemic (Mazepova, 1978; Sheveleva et al., 2012; Flössner, 1984). Three *Diacyclops* species from Lake Baikal, of which *D. talievi* (Mazepova, 1970) is endemic, belong to the *bicuspidatus*-group. Two endemic species, *D. eulithoralis* Arov, Alekseev, 1986 and *D. biceri* Boxshall, Evstigneeva and Clark, 1993, belong to another *virginianus*-group according to Pesce (Pesce, 1994) or to group 2 (*languidoides*) according to Reid (1994). Twelve

endemic *Diacyclops* species have an 11-segmented antennule, segmentation formula (exopod/endopod) of swimming legs: 2.2/3.2/3.3/3.3 and the presence of an exopodal seta on the antenna and belong to the *languidoides*-group. *Diacyclops* inhabit from interstitial to maximal depths year-round, however, are diverse and abundant in the littoral zone of Lake Baikal. The endemic *Diacyclops* is presented by interstitial, benthic and sponge-associated species (Timoshkin, 2001; Alekseev and Arov, 1986).

The majority of endemic *Diacyclops* species were described by Mazepova G.F in the 1950s and 1960s, who discovered this abundant and highly endemic group (Mazepova, 1978). According to Rylov's taxonomy system (Rylov, 1948), the author classified all of them as *Acanthocyclops*. In the subsequent years, only four new species of *Diacyclops* were described and *D. arenosus* (Mazepova, 1950) was redescribed from Lake Baikal (Flössner, 1984; Boxshall et al., 1993; Sheveleva et al., 2010; Sheveleva and Mirabdullaev, 2017).

Three endemic species, *D. versutus* (Mazepova, 1962), *D. improcerus* (Mazepova, 1950), *D. konstantini*

\*Corresponding author.

E-mail address: [tatyanabfo@mail.ru](mailto:tatyanabfo@mail.ru) (T.Yu. Mayor)

**Received:** February 08, 2024; **Accepted:** February 22, 2024;

**Available online:** February 29, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



(Mazepova, 1962) and a subendemic *D. galbinus* (Mazepova, 1962), are found together in samples and have a similar morphology. *D. improcerus*, *D. konstantini*, and *D. galbinus*, are widespread, while *D. versutus* is rare for the baikalian littoral zone (Mazepova, 1978). *D. galbinus* and *D. improcerus* also inhabit the interstitial of Lake Baikal. *D. galbinus* was found outside Baikal in Lake Shartlinskoye, located in the northwestern part of baikalian coastline (Sheveleva et al., 2013; Shaburova, 2010).

There are significant variations in the morphological characters of *D. improcerus*, *D. galbinus* and *D. versutus*. Thus, the question arises as to whether all specimens named as *versutus*, *galbinus* or *improcerus* belong to the same species. Mazepova G.F. explained significant individual morphological variability of *D. galbinus* and *D. improcerus* due to active speciation (Mazepova, 1978).

The first of our result revealed a discordance between molecular phylogeny and taxonomic identification for morphologically similar cyclopoidsto *D. versutus*, *D. improcerus*, and *D. galbinus* from Lake Baikal (Mayor et al., 2017). According to molecular data, analyzed specimens formed phylogroups with unclear taxonomic status. Each phylogroup contained sequences of *D. versutus*, *D. improcerus* and *D. galbinus* identified by their morphology. The following integrative analysis of the cyclopoids from one of these phylogroups, which inhabited the South Baikal, showed that all specimens were closely related based

on morphological and molecular data. Despite their morphological similarity to *D. galbinus* *D. improcerus*, and *D. versutus*, they demonstrated some differences in morphological characters making them representatives of a new species. We have referred to this species as *D. sp.* (VIG2) (Mayor et al., 2019).

In this study, we continues the study of *Diacyclops* from Lake Baikal, which are similar to the *versutus*-, *improcerus*-, *galbinus*-groups and *D. konstantini*, using both morphological and molecular methods.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sample collection and Taxonomic Identification

Copepods were collected from the South, Central, and Northern basins of Lake Baikal in 2018-2023. Samples were collected from depths in 2-30 m by scuba divers in 2021-2023. Other samples were collected using a scoop-net with a mesh size of 100 µm from depths in 0.3-0.5 m. Some copepods were kindly provided by Sukhanova L.V and Luchnev A.G (LIN SB RAS). All of the cyclopoids were preserved in 96% ethanol and stored at - 20°C.

The taxonomic identification of the cyclopoids was performed using the identification table by G.F. Mazepova (1978). Only specimens morphologically similar to *D. versutus*, *D. improcerus*, *D. galbinus*, and *D. konstantini* were used in the study. Sampling characteristics are listed in Table 1.

**Table 1.** Sampling locations, depths and NCBI accession numbers of obtained sequences

ID	Sex	Date	Locality	Coordinates	Depth, m	Substrate	Morphological data	ITS length	NCBI accession numbers		
									COI mtDNA	12S rRNA	ITS1 rRNA
BG5**	♂	28.05.2018	Bolshoye Goloustnoye	52°01.352' N 105°23.514' E	0.3-0.5	stones	+	318	MK207031	MT020872	MK207045
84**	♂	06.2008	Kurma	53°10.114' N 106°58.424' E	0.3-0.5	stones	-	-	GU055755	-	-
BG2**	♂	28.05.2018	Bolshoye Goloustnoye	52°01.352' N 105°23.514' E	0.3-0.5	stones, sand	+	-	MK207029	-	-
BG4**	♂	28.05.2018	Bolshoye Goloustnoye	52°01.352' N 105°23.514' E	0.3-0.5	stones, sand	+	-	MK207030	-	-
D10**	♂	04.2018	Listvyanka	51°52.022' N 104°49.567' E	0.3-0.5	stones	+	-	MK207035	-	-
D12**	♂	04.2018	Listvyanka	51°52.022' N 104°49.567' E	0.3-0.5	stones	+	-	MK207037	-	MK207051
BK4**	♂	04.06.2018	Bolshiye Koty	51°54.114' N 105°04.267' E	0.3-0.5	stones, sand	-	318	MK207027	MT020873	MK207049
266*	♂	-	Baikal	-	-	-	+	338	MT176788	MT020868	MT010631
270*	♂	-	Baikal	-	-	-	+	338	MT176789	-	MT010632
366*	♂	17.06.2019	Bolshiye Koty	51°54.111' N 105°04.061' E	1.2	stone with lichen	+	314	MT176791	-	MT010628
369*	♂	17.06.2019	Bolshiye Koty	51°54.111' N 105°04.061' E	1.2	stone with lichen	-	314	MT176792	MT020870	MT010629
397*	♂	03.2014	Bolshiye Koty	-	-	-	+	-	MT176790	-	-



ID	Sex	Date	Locality	Coordinates	Depth, m	Substrate	Morphological data	ITS length	NCBI accession numbers		
									COI mtDNA	12S rRNA	ITS1 rRNA
D16	♂	19.05.2018	Sludyanka	51°40.017' N 103°42.532' E	0.3-0.5	stones	+	314	MK207039	MT020874	MT010630
BG14	♂	28.05.2018	Bolshoye Goloustnoye	52°01.352' N 105°23.514' E	0.3-0.5	stones, sand	+	-	MT176787	-	MK591137
BG15	♂	28.05.2018	Bolshoye Goloustnoye	52°01.352' N 105°23.514' E	0.3-0.5	stones, sand	+	320	MT176793	MT020871	MK207047
BK21	♂	04.06.2018	Bolshiyе Koty	51°54.114' N 105°04.267' E	0.3-0.5	stones, sand	+	333	MK207028	-	MK207050
MM1	♂	23.12.2018	Malye Olchonskiye Vorota	53°01.073' N 106°54.008' E	0.5	-	+	-	MT176794	MT020875	MK591138
MM2	♂	23.12.2018	Malye Olchonskiye Vorota	53°01.073' N 106°54.008' E	0.5	-	+	-	MT176795	MT020876	-
MM3	♂	23.12.2018	Malye Olchonskiye Vorota	53°01.073' N 106°54.008' E	0.5	-	+	-	MT176796	-	-
F2	♂	31.05.2021	Bolshiyе Koty	51°54.128' N 105°06.168' E	6	stones	+	314	-	-	OR502812
F96	♂	05.06.2021	Nemnyanka	55°32.32' N 109°48.57' E	6	sponge	+	-	-	-	OR502819
F107	♂	19.09.2022	Katkov cape	53°11.3512' N 108°25.679' E	10	stones	+	314	OR506695	-	OR502813
F112-1	♂	26.09.2022	Arul cape	53°27.855' N 107°33.192' E	10	stones, sand	-	-	-	-	OR502820
F112-3	♂	26.09.2022	Arul cape	53°27.855' N 107°33.192' E	10	stones, sand	+	-	-	-	OR502821
F112-5	♂	26.09.2022	Arul cape	53°27.855' N 107°33.192' E	10	stones, sand	+	-	-	-	OR502822
F112-6	♂	26.09.2022	Arul cape	53°27.855' N 107°33.192' E	10	stones, sand	+	-	-	-	OR502823
F112-7	♂	26.09.2022	Arul cape	53°27.855' N 107°33.192' E	10	stones, sand	-	-	-	-	OR502814
F116-1	♂	17.09.2022	Angasolka	51°43.6301' N 103°46.486' E	20	sand	+	-	-	-	OR502800
F116-2	♂	17.09.2022	Angasolka	51°43.6301' N 103°46.486' E	20	sand	+	-	OR501221	-	OR502801
F120	♂	25.09.2022	Nizhniy Kedroviy	54°21.47' N 108°30.4' E	15	stone	+	330	-	-	OR502803
F130	♂	26.09.2022	Arul cape	53°27.962' N 107°33.999' E	30	-	+	300	-	-	OR502804
F135-1	♂	16.09.2022	Ulanovo	51°47.7913' N 104°31.515' E	30	sand	+	303	-	-	OR502805
F135-2	♂	16.09.2022	Ulanovo	51°47.7913' N 104°31.515' E	30	sand	+	325	-	-	OR502806
F136-1	♂	17.09.2022	Angasolka	51°43.6301' N 103°46.486' E	5	sand	+	320	-	-	OR502807
F136-2	♂	17.09.2022	Angasolka	51°43.6301' N 103°46.486' E	5	sand	+	-	-	-	OR502815
F144	♂	27.09.2022	Chertov most	51°56.133' N 105°15.672' E	15	stones, sand	+	-	PP280626	-	OR502808
F156-1	♂	16.09.2022	Ulanovo	51°47.7913' N 104°31.515' E	10	sand	+	-	OR506692	-	OR502809
F156-2	♂	16.09.2022	Ulanovo	51°47.7913' N 104°31.515' E	10	sand	+	328	OR506693	-	OR502810

ID	Sex	Date	Locality	Coordinates	Depth, m	Substrate	Morphological data	ITS length	NCBI accession numbers		
									COI mtDNA	12S rRNA	ITS1 rRNA
F156-3	♀	16.09.2022	Ulanovo	51°47.7913' N 104°31.515' E	10	sand	+	-	OR506691	-	OR502817
F191-1	♀	27.04.2023	Bolshiye Koty	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	stones, sand	-	333	-	-	OR502811
F191-3	♀	27.04.2023	Bolshiye Koty	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	stones, sand	+	-	-	-	OR502802
F191-4	♀	27.04.2023	Bolshiye Koty	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	stones, sand	+	-	-	-	-
F191-5	♂	27.04.2023	Bolshiye Koty	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	stones, sand	+	-	OR506696	-	OR502818
F193	♀	27.04.2023	Bolshiye Koty	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	stones, sand	+	-	-	-	-

**Note:**

- «\*» – copepods were kindly provided by L.V. Sukhanova and A.G. Luchnev
- «\*\*» – data for these copepods were published early (Mayor et al., 2019)
- «+» – available data
- «->» – no data available

## 2.2. Morphological Analysis

The morphological analysis was performed using a stereomicroscope MSP-1 (Lomo, Russia) and the Olympus CX 41 (Olympus, Japan). The specimens were rehydrated in water, photographed, and measured using a Levenhuk M 800 Plus camera attached to the Olympus CX 41 and LevenhukLite (Levenhuk, Inc., USA) software. The U-DA Olympus Drawing Attachment for Olympus CX 41 (Olympus, Japan) was used to draw the morphological characteristics. The length of the body was obtained by summing the lengths of the cephalothorax, thorax segments, and abdomen segments.

Morphological abbreviations:

- Ti innermost terminal seta
- Te outermost terminal seta
- Td dorsal seta
- Tl lateral seta
- Tmi median inner terminal seta
- Tme median outer terminal seta
- Lf caudal rami length
- Wf caudal rami width
- Enp3 third endopodal segment
- P4, P5 fourth, fifth legs
- LP5 length of the distal segment of P5
- IAS internal apical spine of the third endopodal segment of P4
- EAS external apical spine of the third endopodal segment of P4
- L length
- W width
- A1 antennule
- A2 antenna
- Cphth cephalothorax
- sp spine
- se seta

For confocal laser scanning microscopy (CLSM), the female specimen was stained with Congo Red overnight and mounted on a slide, following the procedure outlined by Michels and Büntzow (Michels and Büntzow, 2010). The material was scanned using a Carl Zeiss LSM 710 laser confocal microscope (Zeiss, Germany) with Plan-Apochromat 20×/0.8 and 63×/1.40 Oil DIC M27 lens; 570 – 670 nm filters; 561 nm: 3.0 % lasers. The most variable morphological indices were evaluated using the Correspondence Analysis and used to construct a Principal Component Analysis (PCA) plot. All statistical analyses were performed using Past 4.11 (Hammer et al., 2001).

## 2.3. DNA Extraction, PCR, and Sequencing

Total DNA was extracted from egg sacs or somatic tissue as follows: ethanol-preserved specimens were rehydrated in mQ water for 20 minutes. The biological material was then incubated in a 2x PCR Encyclo buffer (without Mg<sup>2+</sup>) (Evrogen, Russia) containing 0.1 mg/ml Proteinase K at 65°C for 1 hour. After that, it was incubated at 94°C for 5 minutes to deactivate Proteinase K. The resulting solution containing total DNA was stored at -20°C and used in a 10-fold dilution for PCR as a DNA template.

PCR was performed using universal primers LCO-1490 and HCO-2198 to amplify the COI fragment (Folmer et al., 1994), KP2 (5'-AAAAGCTTCCGTAGGTGAACCTGCG-3') and 5.8S (5'-AGCTTGGTGCCTTCTTCATCGA-3') to amplify ITS1 (Phillips et al., 2000), and H13845-12S (5'-GTGCCAGCAGCTGCGTTA-3') and L13337-12S (5'-YCTACTWTGYTACGACTTATCTC-3') to amplify 12S (Machida et al., 2002). The amplification was carried out in a T100TM thermal cycler (BioRad, USA) using PCR reagents from Evrogen (Russia). The reaction was performed in a 20µl mixture: 1x Encyclo buffer, 3.5 mM

magnesium, 0.5  $\mu$ M of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 units of Encyclo DNA polymerase, and 2  $\mu$ l of DNA solution. The amplification program included the stage of heating the mixture to 94 °C for 4 min, 35-40 cycles consisting of the following steps: 94 °C for 15 s, 48 °C or 57 °C (for COI and ITS1, 12S fragments, respectively) for 20 s, 72 °C for 1 min, and the final elongation stage at 72 °C for 4 min. The amplicons were separated and isolated for sequencing from the agarose gel using the protocol described previously (Mayor et al., 2010). The nucleotide sequences of the target fragments were determined using the ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 sequencing kit in an ABI 3500 8-capillary genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) and in a Nanophor 05 genetic analyzer (Sintol, Russia).

## 2.4. Molecular-Phylogenetic Analysis

The sequences obtained were deposited in the GenBank database, and their NCBI accession numbers are listed in Table 1. Alignment of the nucleotide sequences and calculation of genetic distances were performed using the MegaX program (Kumar et al., 2018). We evaluated DNA polymorphism using the DnaSP 5.10.01 program (Rozas et al., 2003). Intragenomic polymorphism was detected in some ITS1 sequences, and we encoded sites with double peaks according to IUPAC. To analyze the COI, 12S, and ITS1 datasets, we selected GTR + G, HKY + G, and TN93 + G models, respectively, based on the Akaike information criterion and the Bayesian information criterion, as determined by jModelTest 2.1.6 (Darriba et al., 2012). Maximum Likelihood trees were constructed using IQ-TREE2 (Minh et al., 2020) and MegaX software. Nodal support for the resulting branches was estimated with 1000 bootstrap replications. Additionally, we include sequences of *Diacyclops* species and other cyclopoids in our analysis. The accession numbers of the sequences used in the GenBank database are displayed on the phylogenetic trees. The trees were visualized and edited using Interactive Tree Of Life (iTOL) version 6.8.1 (<https://itol.embl.de>, accessed on September 16, 2023 and October 3, 2023) (Letunic and Bork, 2021).

To propose species partitions from COI data sets, we used species-delimitation methods that employ pairwise genetic distances and tree-based methodologies. We used the Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP) tool with the p-distances and default settings (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>, accessed on October 3, 2023) (Puillandre et al., 2021). The study employed the Poisson Tree Processes (PTP) and Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) (Zhang et al., 2013) with default settings and the ML-tree obtained in the study. Additionally, the Generalized Mixed Yule Coalescent method (GMYC) was used with a single threshold and an ultrametric tree obtained in the Beast 2.5.2 program (Bouckaert et al., 2014). The source links for PTP and GMYC are <https://species.h-its.org/ptp/> and <https://species.h-its.org/gmyc/>, respectively, accessed on October 20, 2023.

## 3. Results

### 3.1. Taxonomic identification

This study selected 43 adult females and one adult male of *Diacyclops* from Lake Baikal, collected from various substrates and depths up to 30 m, based on their morphological characteristics (Table 1). Seven of these specimens belong to *D. sp.* (VIG2), for which we previously published molecular and morphological data (Mayor et al., 2019).

We photographed 38 specimens and measured their morphological characteristics, including the antennule, caudal rami and their setae, P4, P5, and body length. Many estimated morphometric parameters are used in cyclopoid taxonomy, including those used by Mazepova G.F. to describe endemic *Diacyclops*. The majority of crustacean photos were taken before DNA extraction. Unfortunately, three cyclopoids exoskeletons were lost after DNA extraction, leaving only molecular data for these specimens. Two of them are the smallest *Diacyclops* analyzed.

We found 10 specimens that are similar to *D. improcerus*, but they differ from it in having a shorter cephalothorax and a longer antennule or armature of the Enp3P4, which contains three spines and two setae instead of two spines and three setae. Out of the 10 specimens that are similar to *D. galbinus*, 6 specimens have longer caudal rami, shorter lateral seta in relation to the caudal rami width, and longer Te. One specimen (MM1) has a shorter spine of P5 and cephalothorax. Two specimens (BG14, F144) have a shorter cephalothorax (Table 2). For one specimen (F112-7), similar to *D. galbinus* by EnpP4, we have only molecular data.

All 14 specimens that are similar to *D. versutus* have a longer lateral seta relative to the caudal rami width. Two of the specimens (F156-1, F156-3) differ from *D. versutus* in having shorter caudal rami and a smaller proportion of dorsal seta to Te. Additional, specimen F156-2 differs from *D. versutus* in having a smaller proportion of Ti and Te. A male specimen (F191-5) was found to be similar to the females (F193, F191-1 – F191-4) and *D. versutus* in the armature of the enp3P4 and was included in this study. Three specimens belong to *D. konstantini*.

### 3.2. Molecular phylogeny and Species delimitation

The study amplified molecular markers under the same conditions from specimens that were morphologically similar and collected together. However, the amplification of DNA fragments varied in specificity and yield (Table 1). For instance, F193 and F191-4, which were collected together and closely resembled F-191-1, F191-3, and F191-5, were not successfully amplified. The study obtained a total of 10, 35, and 21 sequences for the 12S, ITS1, and COI gene fragments, respectively (Table 1). Intragenomic polymorphism of ITS1 was detected in 10 specimens. Six sequences (266, BG15, BK21, F116-1, F120, and F135-1) have double peaks at one site, while three

**Table 2.** Morphometric characteristics of analyzed cyclopoids

Species, specimen	Lf/Wf	Te/Ti	Tmi/Tme	Td/Te	Tl/Wf	Lenp3P4/Wenp3P4	IAS/EAS	LA1/Lcpth	Lcpth/LPed2-Ped5**	LspP5/LP5
<i>D. versutus*</i>	1.8-3.4 (2.5)	0.5-1.8 (1.2)	1.7-2.2 (1.8)	0.9-1.5 (1.2)	0.3-0.6 (0.5)	1.0-1.8 (1.4)	0.6-1.2 (1.0)	short, hardly reach the middle of the cephalothorax	-	the length of P5 spine varies significantly
<i>D. galbinus*</i>	2.9-5.4 (3.7)	0.6-1.8 (1.2)	1.3-1.9 (1.6)	0.8-1.2 (1.00)	1.4-2.0 (1.6)	1.6-3.0 (2.0)	1.1-1.8 (1.3)	reach the posterior margin of the cephalothorax	the length proportion of the cephalothorax and remained segments of the thorax is about 2	the length of P5 spine is equal or slightly short than the length of P5 distal segment
<i>D. improcerus*</i>	1.8-4.1 (3.0)	1.0-2.1 (1.6)	-	-	-	1.0-1.4 (1.2)	1.0-1.9 (1.35)	short, usually reach the middle of the cephalothorax	the length proportion of the cephalothorax and remained segments of the thorax varies from 1.6 to 2.3 (1.86)	the length of P5 spine is equal, slightly short or long than the length of P5 distal segment
MM3	2.63	1.67	1.93	1.00	1.17	1.43	1.29	0.78	0.90	0.68
MM2	2.35	1.39	1.81	-	1.14	1.54	0.83	-	1.15	-
BG14	1.86	1.71	1.82	1.04	0.93	1.21	1.18	0.92	0.84	1.13
BK21	2.50	1.49	2.20	-	1.16	1.28	1.17	0.73	0.98	0.77
F193	1.80	1.20	1.70	1.20	1.20	1.40	1.20	0.79	0.86	0.89
F191-3	2.37	1.57	1.64	1.05	1.18	1.43	1.22	0.77	1.59	1.54
F191-4	2.34	1.73	1.45	1.02	1.25	1.43	1.17	0.95	0.85	1.41
F156-3	1.40	1.69	1.83	-	0.72	1.38	1.05	0.77	0.98	0.81
F156-1	1.44	1.43	1.91	0.47	0.84	1.22	1.00	0.67	0.84	0.75
F120	2.60	1.60	1.90	0.94	1.33	1.46	1.12	0.71	0.98	0.71
F156-2	2.51	2.06	-	1.05	1.13	1.02	1.20	-	0.76	1.15
F96	3.08	1.68	1.73	0.91	1.22	1.57	1.20	0.73	0.77	1.01
F-130	2.70	1.56	1.54	1.10	0.94	1.15	1.32	0.66	2.10	0.80
D16	2.89	1.17	1.48	1.04	1.07	1.24	1.24	1.12	0.93	1.01
366	2.03	2.03	1.53	1.39	1.11	1.16	1.21	0.87	1.40	1.37
F112-5	3.41	1.72	1.59	1.25	1.01	1.27	1.26	0.81	1.16	0.70
F112-6	3.79	1.33	1.86	1.70	1.25	1.18	1.23	0.88	1.00	0.60
F112-3	3.25	1.80	-	1.62	0.87	1.08	1.15	0.79	1.18	0.80
F-107	3.57	-	-	-	0.97	1.14	1.41	-	0.99	1.00
F2	3.69	1.41	1.21	1.57	1.23	1.25	1.13	0.92	1.10	0.80
MM1	3.40	1.26	NA	0.95	1.62	2.16	1.26	0.98	1.14	0.52
BG15	3.45	1.82	1.68	1.00	1.36	1.99	1.19	0.94	1.26	0.51
F144	3.80	1.39	1.60	1.06	1.38	2.10	1.16	1.24	0.98	0.82
F116-1	5.82	0.94	1.53	-	1.83	1.90	1.23	1.23	0.98	0.60
F116-2	4.00	1.17	-	1.28	1.32	2.11	1.33	0.94	1.13	0.89
F136-1	3.76	1.96	1.71	0.81	1.36	2.23	1.33	-	1.20	0.81
F136-2	5.05	2.29	-	0.95	1.71	2.57	1.25	1.3	1.15	0.96
F135-1	3.78	1.75	-	-	1.00	2.50	1.25	1.2	1.56	0.75
F135-2	3.95	1.63	1.52	-	1.35	2.56	1.21	1.2	1.17	0.98

**Note:**

«\*» – data of G.F. Mazepova (1978), the brackets indicate the average value of parameters

«\*\*» – combined length of the segments pediger 2 to pediger 5

«->» – no data available

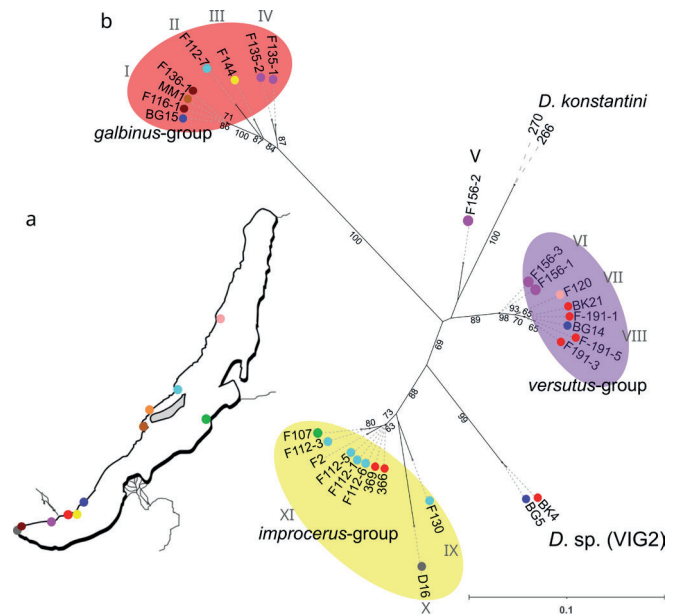
sequences (BG14, 369, and F130) have double peaks at two sites. One sequence (366) has double peaks at seven sites. There were 14 transitions and three transversions. The positions of ITS1 sites with double peaks coincided in the sequences of different specimens (BG14/366, BG14/BK21, and F116-1/266).

Three short ITS1 sequences (F96, F116-2 and F136-2) were deposited in GenBank, but were excluded from the phylogenetic analysis. The analysis used an alignment of 31 sequences (461 bp), revealing 245 sites (excluding sites with gaps/missing data), 73 polymorphic (segregating) sites, and 69 parsimony informative sites.

The ML ITS1 tree divided the sequences of the selected specimens, which were similar to *D. galbinus*, *D. improcerus*, and *D. versutus*, into three clusters: the *galbinus*-group, the *versutus*-group, and the *improcerus*-group (Fig. 1). Each cluster contains several genetic lineages. The *galbinus*-group comprises four genetic lineages (I-IV), the *versutus*-group comprises three genetic lineages (VI-VIII), and the *improcerus*-group comprises three genetic lineages (IX-XI). Sequence F156-2 represents a distinct genetic lineage (V) and was not included in any of the three groups.

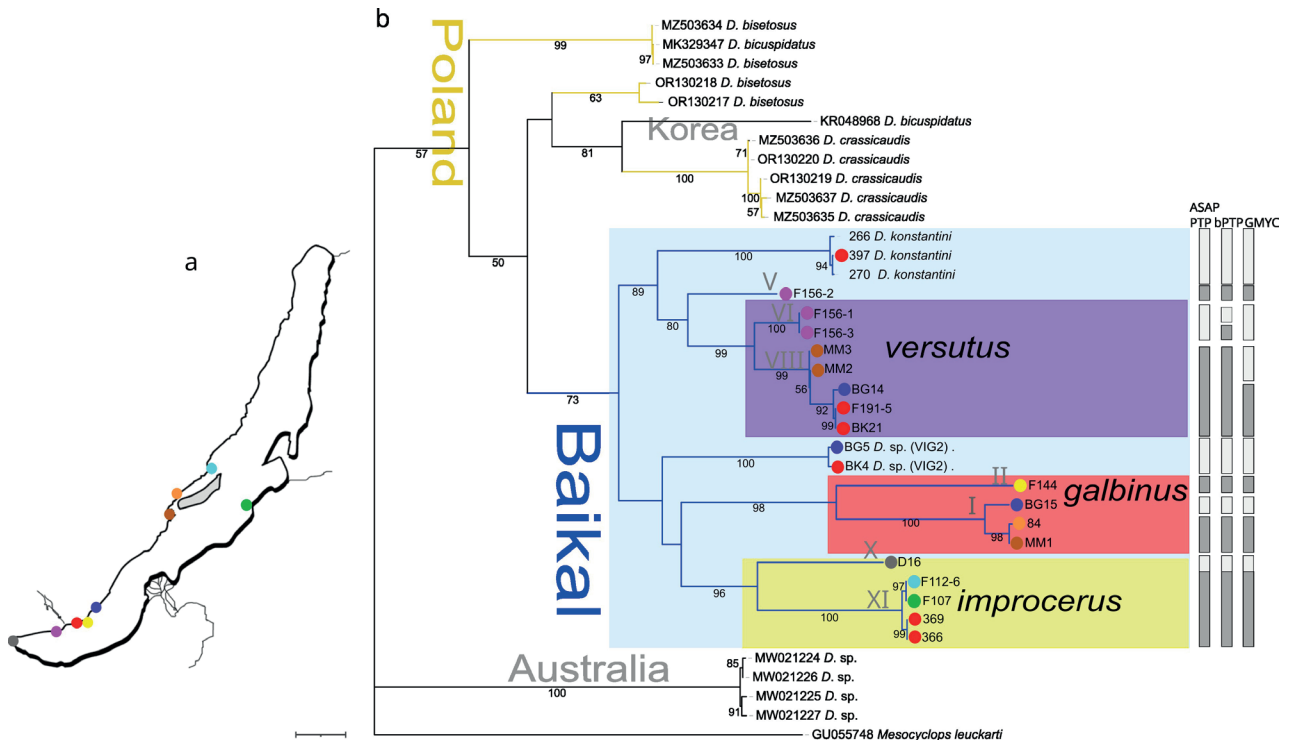
The *versutus*-group, F156-2 (V), *D. konstantini*, *D. sp.* (VIG2), and the *improcerus*-group formed a separate large cluster. The *galbinus*-group is genetically distant from this cluster.

The analysis used a total alignment of 38 COI sequences (693 bp), including 22 sequences of *Diacyclops* from Lake Baikal, 11 sequences from three *Diacyclops* species of the *bicuspidatus*-group (*D. bisetosus*, *D. crassicaudis*, and *D. bicuspidatus*) from Poland and Korea, and 4 sequences of *D. sp.* from Australia. The alignment



**Fig.1.** (a) Distribution of sampling locations (Table 1) of *Diacyclops* lineages in Lake Baikal, color coded as in the tree; (b) Phylogenetic tree constructed on the base of the ITS1 by the maximum likelihood method (ML, TN93 + G). The number in the node is the bootstrap value of the branching node support. Roman numerals indicate the genetic lineages. The circles near with the ID specimen indicate a sample location.

comprised 134 sites, excluding sites with gaps/missing data, and 57 parsimony informative sites. All *Diacyclops* sequences from Lake Baikal form a monophyletic group, that is distinct from other *Diacyclops*. The COI and ITS1 tree topologies are consistent. The COI tree distinguish the *versutus*-, *galbinus*- and *improcerus*-group, each containing several genetic lineages (Fig. 2).



**Fig.2.** (a) Distribution of sampling locations (Table 1) of *Diacyclops* lineages in Lake Baikal, color coded as in the tree; (b) Phylogenetic tree constructed on the base of the COI gene fragment by the maximum likelihood method (ML, GTR + G). The number in the node is the bootstrap value of the branching node support. Roman numerals indicate the genetic lineages. The bars near with the tree indicate the ‘species’ delimited by ASAP, PTP, bPTP, GMYC methods. The circles near with the ID specimen indicate a sampling location.

Two genetic lineages of the *versutus*-group (VI, VIII) are sister to F156-2 (V) and *D. konstantini* with high bootstrap support values, which together form a separate cluster. *D. sp.* (VIG) with two genetic lineages of the *galbinus*-group (I, II) and two genetic lineages of the *improcerus*-group (IX, X) form three distinct clusters.

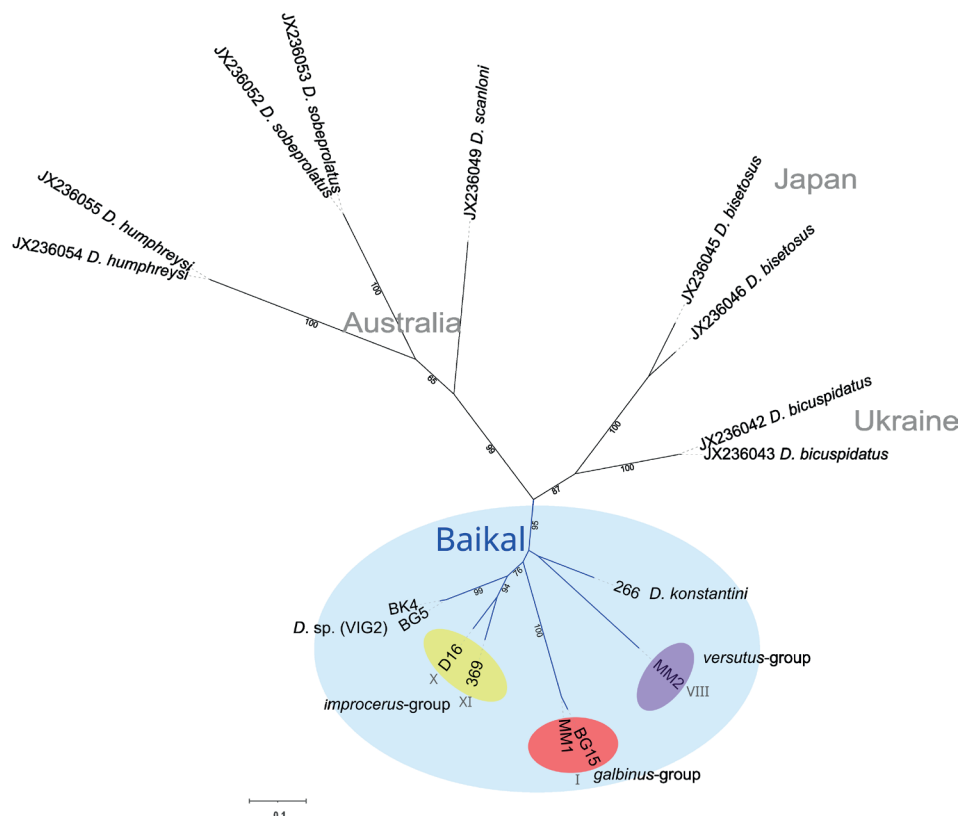
The ASAP and PTP delimitation methods applied to the COI data for *Diacyclops* from Lake Baikal estimated 10 ‘species’. The results are generally congruent with the COI tree topology, but BG15 (I) and 84 (I), MM1 (I) are distinguished as separate two ‘species’. The bPTP and GMYK methods delimited 11 ‘species’ among the analyzed *Diacyclops* from Lake Baikal. These methods are incongruent with the ASAP/PTP methods only in the *versutus*-group division. The bPTP delimited F156-1 (VI), F156-3 (VI), and the VIII genetic lineage (MM2, MM3, BG14, F191-5, and BK21) as three separate ‘species’. The GMYK delimited F156-1 (VI) and F156-3 (VI) as ‘species’, but divided VIII genetic lineage into two ‘species’: MM2/MM3 and BG14, F191-5, and BK21.

The analysis used of 17 sequences for 12S alignment (497 bp). Of these, 9 sequences belong to *Diacyclops*, from Lake Baikal, 9 sequences belong to 5 *Diacyclops* species from Australia, Japan, and Ukraine. The alignment comprises 327 sites, excluding sites with gaps and missing data, with 186 polymorphic sites and 162 parsimony-informative sites. The 12S phylogenetic tree showed a monophyletic group of all *Diacyclops* from Lake Baikal consistent with the COI tree. This group and representatives of the *bicuspidatus*-group, *D. bisetosus* from Japan and *D. bicuspidatus* from Ukraine, are separated into a large cluster (Fig. 3). Three Australian endemic species of the *aticola*-

group, *D. scaloni*, *D. sobeprolatus*, and *D. humphreysi*, are distant from this cluster. The tree topology is congruent with COI and ITS1 topologies for *Diacyclops* from Lake Baikal. BG15 (I) and MM1 (I) of the *galbinus*-group form a distant cluster, and D16 (X) and 369 (XI) of the *improcerus*-group form another cluster. *D. sp.* (VIG2) is a sister taxon to the X and XI lineages of the *improcerus*-group.

### 3.3. Genetic distances

The length of the rDNA ITS1 region ranges from 300 to 338 bp and is specific to each genetic lineage (Table 1), except for the *improcerus*-group, where the ITS1 length of the XI and X genetic lineages is identical at 314 bp. Model-corrected genetic distances (TN93+G) between all genetic lineages of *Diacyclops* from Lake Baikal are very similar to p-distances of ITS1, ranging from 0.7% to 20.1% (Supplementary, Table S1-S3). The maximum genetic distance within genetic lineages is 0.4%. The COI p-distances among all studied genetic lineages of *Diacyclops* from Lake Baikal range from 9.1% to 20.9%. The largest intra-genetic lineage p-distances for COI are found in the I genetic lineage (5.6%) and the II genetic lineage (2%). The minimum distances among the genetic lineages for both molecular markers are between the sequences of the *versutus*-group, ranging from 0.7% to 1.6% in ITS1 and 9.1% in COI datasets. The ITS1 and COI genetic distances among genetic lineages of the *galbinus*-group are 3.5-4.0% and 17.7%, respectively. The ITS1 and COI genetic distances among genetic lineages of the *improcerus*-group are 3.3-7.2% and 16.1%, respectively.



**Fig.3.** Phylogenetic tree constructed on the base of the 12S fragment of mtDNA by the maximum likelihood method (ML, HKY + G). The number in the node is the bootstrap value of the branching node support. Roman numerals indicate the genetic lineages.

The maximal ITS1 and COI genetic distances between the *galbinus*-group and the *improcerus*-group genetic lineages are 12.2-20.1% and 20.1-20.9%, respectively. The 12S p-distances between all studied *Diacyclops* genetic lineages from Lake Baikal range from 11.8% to 23.1%. The X and XI lineages of the *improcerus*-group are the closest. The XI lineage of the *improcerus*-group and the VIII lineage of the *versutus*-group are the most distant. Similar genetic distances are estimated between the *versutus*-group and the *galbinus*-group (20.5%) and between the *improcerus*-group and the *galbinus*-group (21.6% and 21.7 %).

### 3.4. Distribution of the genetic lineages

The representatives of the *galbinus*-, *improcerus*-, and *versutus*-groups have a sympatric distribution (Fig. 1a). Representatives of *D. konstantini*, *D. sp.* (VIG2), the VIII genetic lineage of the *versutus*-group, and the XI genetic lineage of the *improcerus*-group were found in Bolshiye Koty on different dates. Representatives of *D. sp.* (VIG2), the VIII, and I genetic lineages were found in one sample from Bolshoye Goloustnoye (Table 1). Additionally, in one sample we found representatives of the *versutus*-group (F156-1, F156-3 - VI) and F156-2 (V), which is genetically sister to them; representatives of the *galbinus*-group (F112-7 - II) and the *improcerus*-group (XI) or representatives of the *galbinus*-group (MM1 - I) and the *versutus*-group (MM2, MM3 - VIII).

Each group has one predominant genetic lineage, which has been found in various locations and periods. These are the I genetic lineage of the *galbinus*-group, the XI genetic lineage of the *improcerus*-group, and the VIII genetic lineage of the *versutus*-group.

### 3.5. Morphometric analysis

PCA was performed on 37 individuals. Molecular data were obtained for most of them. Among them, 9 specimens belong to the *galbinus*-group, 12 specimens belong to the *versutus*-group, 8 to the *improcerus*-group according to molecular data, 3 specimens of *D. konstantini*, and 5 specimens of *D. sp.* (VIG2) (BG2, BG4, BG5, D10, D12) were included.

The CA resulted in 8 morphometric characteristics. Tmi/Tme, Td/Te, Ti/Tmi, Ti/Tme, Ti/Td, LA1/Lcph, Lbody, and LseP5/LspP5 together explain 5% of the Axis1 variability (total variability - 25.6%) and were excluded from the next PCA. More variable parameters such as Lf/Wf, Te/Ti, Tl/Wf, Lenp3P4/Wenp3P4, IAS/EAS, Tl position, IAS/Lenp3P4, IAS/Wenp3P4, Ti/Lf, Tl/Te, Ti/Td, Ti/Te, LP5/WP5, LspP5/LP5, and WP5/LspP5 were used in the PCA. The first two principal components explain 76.1% of the variation in our morphometric data. PC1 and PC2 explain 61.5% and 14.6% of variance, respectively, with eigenvalues of 2.1 and 0.5. The first principal component has the strongest positive correlation with the length and width proportion of the caudal rami (Lf/Wf), less positive correlation with the length and width proportion of the third endopodal segment length (enp3P4) of P4 (Lenp3P4/Wenp3P4) and the length of the lateral setae with the caudal rami width proportion (Tl/Wf) and negative correlations with ratio of the outer to inner terminal caudal setae (Te/Ti) and with the ratio of the length of the internal apical spine to the length of the P4 third endopodal segment (IAS/Lenp3P4). The second component has strong positive correlations with the ratio of the internal apical spine length to width of the P4 third endopodal segment (IAS/Wenp3P4) and with

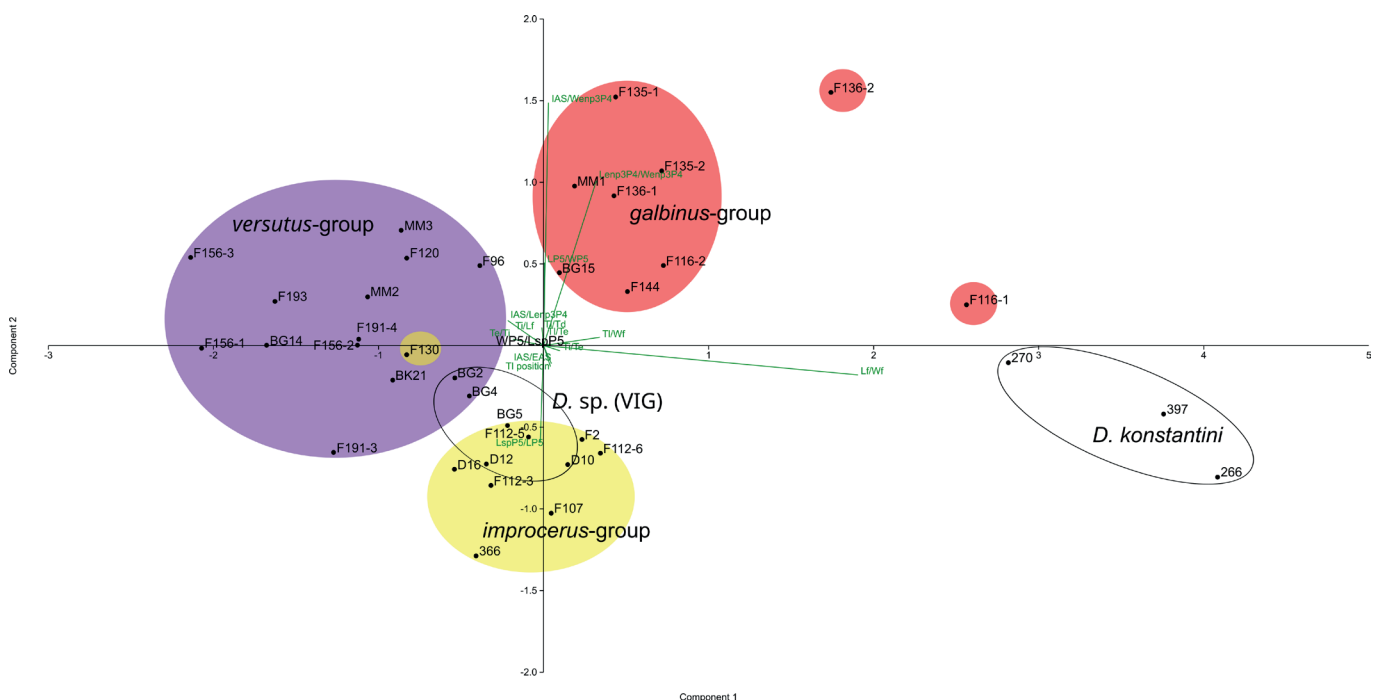


Fig.4. Principal component analysis of *Diacyclops* based on morphometric indices. The numbers indicate specimens ID. Green rows indicate morphometric indices. The colour indicates the species complex according to the phylogenetic trees.

Lenp3P4/Wenp3P4, the less positive correlation with ratio of the length to width of the P5 (LP5/WP5) and the negative correlation with ratio the P5 internal spine to length of the distal P5 segment (LspP5/LP5) (Fig. 4). The results of the PCA analysis, which is based on morphometric indices, are consistent with the molecular phylogeny in distinguishing genetically distant species or species complexes of *Diacyclops*. Along the PC1, the *D. konstantini* and the *versutus*-group are located, while the *galbinus*-group and the *improcerus*-group with *D. sp.* (VIG2) are located along PC2. The specimens of *D. sp.* (VIG2) are close to the *improcerus*- and the *versutus*-group. Specimens F130 (IX) of the *improcerus*-group, F156-2 (V) overlapped with specimens of the *versutus*-group. Specimen F116-1 (I) of the *galbinus*-group is closer to *D. konstantini* than to the *galbinus*-group. The PCA did not clearly separate all closely related genetic lineages. However, specimens F156-3 and F156-1 (VI) of one ITS1 and COI genetic lineage differ from other representatives of the *versutus*-group in their smaller length and width proportion of the caudal rami, and are located extremely along PC1.

### 3.6. Morphology diversity of the *versutus*- and *improcerus*-groups

Fig. 5-7 depict micrographs and drawings of P4 and an antenna of specimens belonging to the *versutus*- and *improcerus*-groups. All analyzed specimens of the *versutus*-group have Enp3P4, armed with three spines and two setae. MM3 and BG14 closer to each other based on COI and were attributed to the VIII genetic lineage. They were delimited as one 'species' by ASAP and as two 'species' by GMYC. They differ in P4 intercoxal sclerite ornamentation (Fig. 5). BG14 and F193 (VIII) have naked the caudal surface of the sclerite, while MM3 has two rows of short spinules in the middle and on the distal margin. Specimen F156-3 of the VI genetic lineage has the P4 intercoxal sclerite with two rows of short and long hair-like spinules in the middle and on the distal margin. Among MM3 (VIII), F193 (VIII), and F156-3 (VI), the latter has the most groups of setae and spinules on the P4 coxopodite. F156-3 differs from F193 in the number of setae on the second endopodal segment of A2 and has nine setae versus eight setae

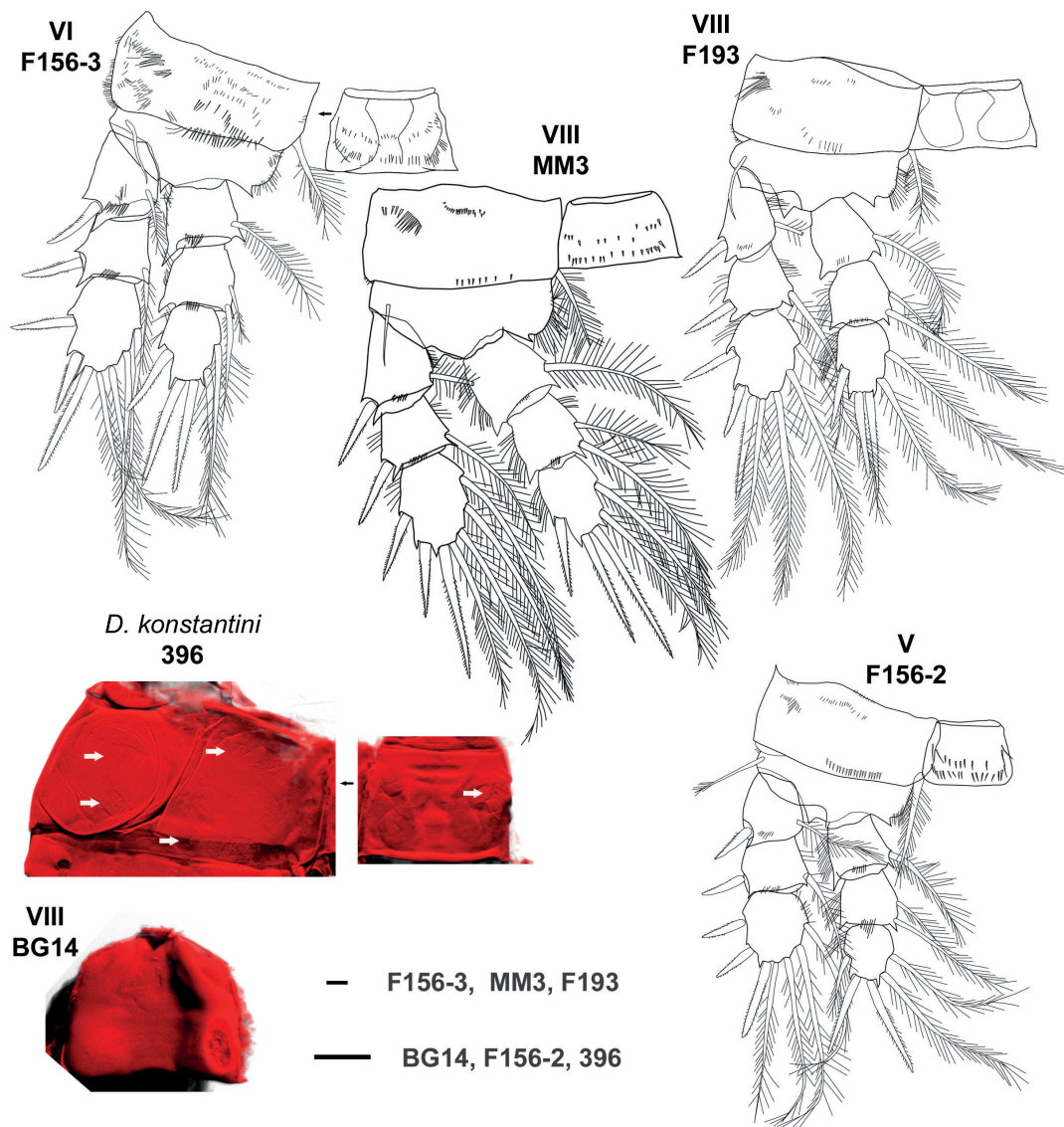


Fig.5. Confocal laser (396, BG14) micrographs and drawings of P4, caudal of the *versutus*-group, the V genetic lineage, and *D. konstantini* (396). Numbers indicate ID specimens. BG14 – P4, intercoxal sclerite, caudal. Roman numerals indicate the genetic lineages. Scale bars: BG14, F156-2 = 20 μm; F156-3, MM3, F193, 396 = 10 μm.

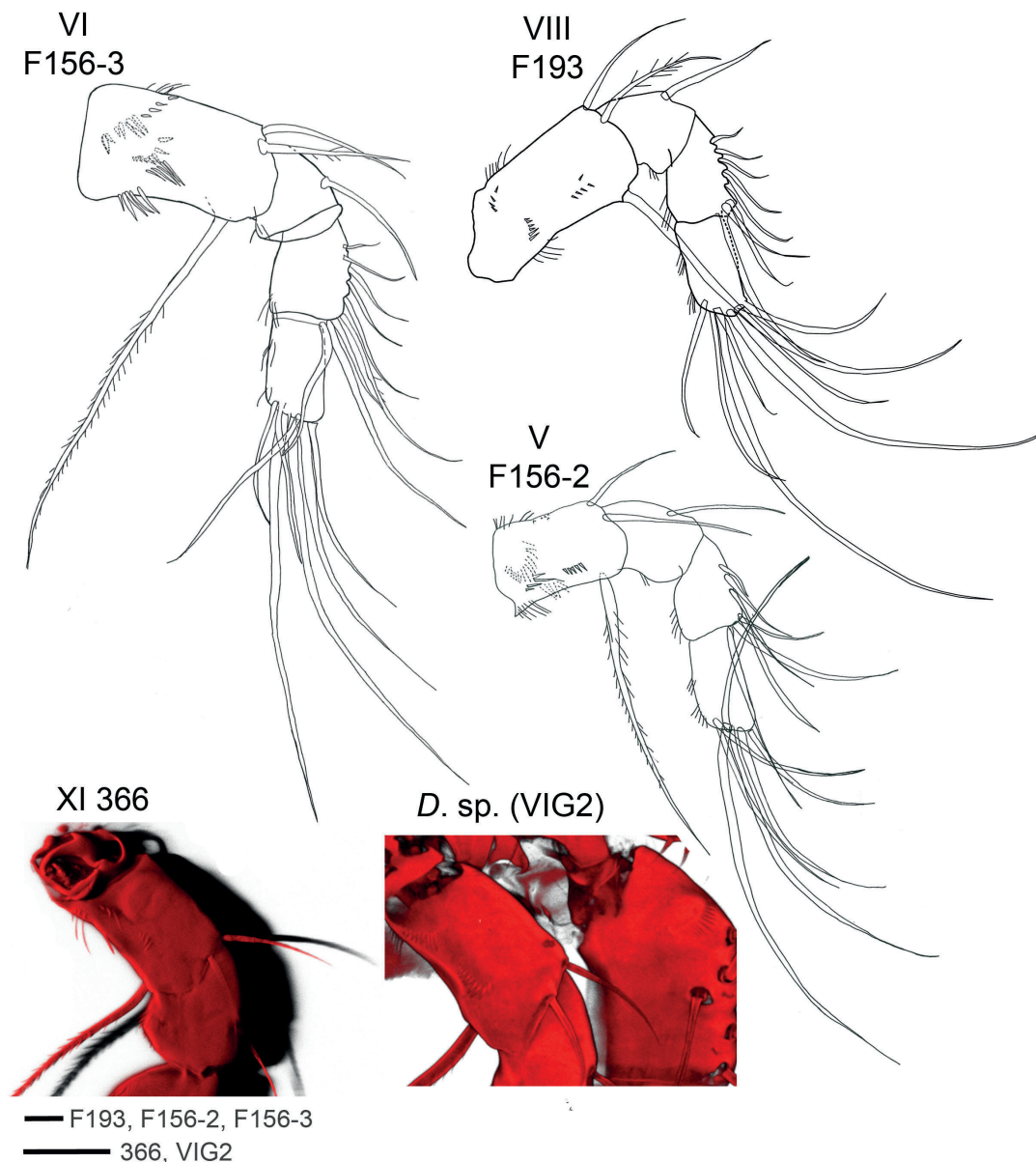


of F193. The A2 basipodite of F156-3 is ornamented with two diagonal rows of spinules in the middle and on proximal part of the frontal surface, a diagonal row of spinules on proximal part, and a row of the longest spinules in the middle of the caudal surface, a row of long spinules along lateral margin, and a row of hair-like spinules along opposite lateral margin, armed with two setae, one of which is naked and one has short setules and exopodal seta with short setules. The A2 basipodite of F193 are ornamented with three rows of spinules on the proximal and central margins, and two rows of hair-like spinules along both lateral margins, armed with two setae, one of them is a naked and one has short setae and naked exopodal seta (Fig. 6).

*D. konstantini* and F156-2 (V) are genetically closely related and differ from the *versutus*-group in the armature of Enp3P4. They have two spines and three setae. F156-2 P4 intercoxal sclerite with two rows of long spinules. The A2 basipodite of F156-2 is ornamented with two rows of spinules and a group of

small spinules on the caudal surface, two rows of hair-like spinules on the proximal part of the frontal surface and hair-like spinules along both lateral margins armed with two naked setae and exopodal seta with short setules (Fig. 5, 6). Second endopodal segment armed with seven setae.

D16 (X), F130 (IX), and 366 (XI) are related to different genetic lineages of the *improcerus*-group and *D. sp* (VIG2) is closely related to them. All analyzed specimens of *D. sp* (VIG2) and the *improcerus*-group, except D16 and F130, have Enp3P4 with two apical spines (IAS and EAS) and three setae. Specimens D16 and F130 have Enp3P4 with three spines – IAS, EAS, and a spine on the outer margin and two setae. *D. sp* (VIG2) differs from the *improcerus*-group in the apical position, near the IAS, by having one internal seta on Enp3P4 (Fig. 7). F130 (XI) and *D. sp* (VIG2) have a P4 intercoxal sclerite with two rows of spinules in the middle and on the distal margin. Specimen 366 (XI) also has a P4 intercoxal sclerite with two rows of



**Fig.6.** Confocal laser micrographs (366, VIG2) and line drawings of antenna, caudal of the *improcerus*-group (366, VIG2), the V genetic lineage and the *versutus*-group (F193, F156-2, F156-3). Arabic numbers indicate ID specimens. Roman numerals indicate the genetic lineages. Spinules of the frontal surface are showed by the dash lines. Scale bars: F193, F156-2, F156-3 = 10  $\mu$ m; 366, VIG2 = 20  $\mu$ m.

spinules, but the rows are interrupted in the middle of the sclerite. D16 (X) has a P4 intercoxal sclerite with two groups of a few short spinules on both sides. All these specimens have similar ornamentation characters on the P4 coxopodite. The A2 basipodite of *D. sp* (VIG2) and 366 (XI) are generally similarly ornamented with two rows of spinules on the caudal surface and a row of setae on the proximal part of lateral margins, but VIG2 has more spinules in each row (8 and 9) than specimen 366 (3 and 4) (Fig. 6).

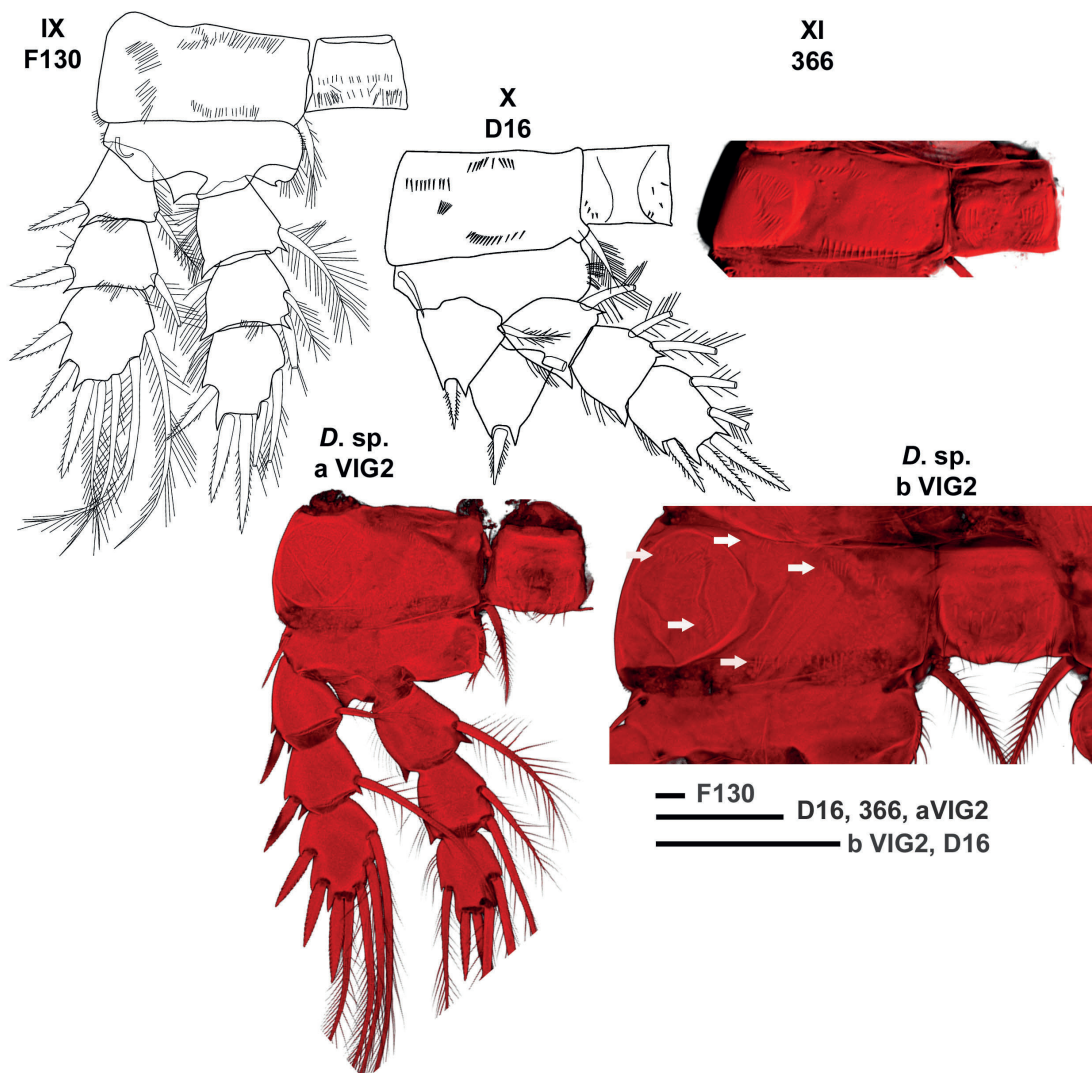
#### 4. Discussion

##### 4.1. Three species complexes similar to *D. improcerus*, *D. galbinus* and *D. versutus* based on molecular and morphological data

Although we found *Diacyclops* specimens with similar morphology to three species of interest, namely endemic *D. improcerus*, *D. versutus*, and subendemic *D. galbinus*, we failed to identify them taxonomically at the species level. The phylogenetic analysis of *Diacyclops*, based on data from two mtDNA and one nuclear

molecular markers, revealed three clusters according to the division of specimens into three groups based on morphological characters: the *improcerus*-group, the *galbinus*-group, and the *versutus*-group. Each of them comprises multiple genetic lineages. We assume that the *improcerus*-, *galbinus*-, and *versutus*-groups are closely related species complexes. The existence of these complexes likely explains the significant variations in diagnostic characters for *D. improcerus*, *D. versutus*, and *D. galbinus*, as described.

The inter-lineages genetic distances of the *galbinus*- and *improcerus*-groups correspond to known interspecies genetic distances for these molecular markers in Copepoda in general and Cyclopoida in particular (Zagoskin et al., 2014; Kochanova et al., 2021; Karanovic and Bláha, 2019; Sukhikh et al., 2020). The genetic lineages of the *versutus*-group are the closest to each other. Initially, the identification of F120 as a separate VII lineage from the VIII lineage was questionable. However, we identified it as distinct from the VIII lineage based on the entire length of the rDNA ITS1 (330/333 bp), although its taxonomic status remains unclear. The entire length of ITS1 can be a species-specific feature, as demonstrated in the



**Fig.7.** Confocal laser micrographs (a VIG2, b VIG2, 366) and drawings of P4, caudal of the *improcerus*-group. Numbers indicate ID specimens, Roman numerals indicate the genetic lineage. bVIG2 – P4, coxopodite, intercoxal sclerite, caudal. Scale bars: F130 = 10 µm; aVIG2, bVIG2, D16, 366 = 50 µm.

genus *Culicoides* (Diptera) (Li et al., 2003). Only in the *versutus*-group, different delimitation methods give varying results. The GMYK method divided the VIII genetic lineage into two 'species' based on COI data. On the COI tree, sequences BG14, F191-5, BK21 are genetically distant from MM2, MM3, and at the same time there is no such clustering on the ITS1 tree. On the one hand, it is possible that GMYK oversplit the data (Pentinsaari et al., 2017; Luo et al., 2018). On the other hand, we note the different character of the ornamentation of the intercoxa of P4 in MM3 and BG14. This, along with the ornamentation of the basipodite of the antenna, is a crucial taxonomic feature in Cyclopoida and is mentioned in their description (Karanovic et al., 2013; Hołyńska et al., 2021). Lineage VI (F156-1, F156-3) of the *versutus*-group may be considered a distinct species due to its unic pattern of microcharacters in A2 basipodite and P4, as well as its formation of a separate cluster based on both molecular markers. Additionally, specimens F156-1 and F156-3 differ from all other specimens of the *versutus*-group in having the smallest proportion of caudal rami length and width. Although these indices, as noted for the Baikal cyclopoids, vary at the intraspecific level and may not be taxonomically significant, as in other cyclopoid genera such as *Eucyclops* (Rylov, 1948; Mazepova, 1978; Flössner, 1984), they enable the distinction between genetically sister *D. konstantini* and the *versutus*-group, according to the results of PCA analysis. It is also possible to use the number of setae on the second endopodal segment of A2 to distinguish specimens of the VI lineage from those of the VIII lineage.

We suggest that individual F156-2 (V) belongs to a new species that is closely related to the *versutus*-group species. Although PCA results based on morphometric characters do not differentiate this potentially new species from the *versutus*-group, it has meristic differences from the *versutus*-group in the armature of the third endopodite of P4, the second endopodal segment of A2, the ornamentation of the coxopodite of P4 and the A2 basipodite. All three methods used for species delimitation also separate F156-2 as a distinct species. Additionally, the entire length of ITS1 (328 bp) of F156-2 differs from the *versutus*-group sequences.

The three supposed species of the *improcerus*-group and their genetic sister species *D. sp.* (VIG2) overlap in PCA results, but clearly differ in both molecular markers. They are delimited unanimously by all species delimitation methods used and have differences in the ornamentation of the coxopodite of P4. Additionally they have meristic differences in the armature of the P4, which in most copepods are diagnostic of different genera (Boxshall and Halsey, 2004).

Karanovic noted similarities in the short proportion of caudal rami in the endemic *D. ishidai* (Karanovic, Grygier & Lee, 2013), which inhabits interstitial water near ancient Lake Biwa, as well as *D. improcerus* and *D. versutus* (Karanovic et al., 2013). However, he also identified several of quantitative differences between *D. ishidai* and the latter two species, even based on the limited set of available

morphological characters. The morphological data obtained in this study allows us to supplement these differences with meristic characters. Only lineage XI of the *improcerus*-group exhibits a similar armature to the third endopodite of P4, with 3 setae and 2 spines. The other lineages of this group and the *versutus*-group (VI-IX) differ in this feature, with 2 setae and 3 spines. In this study, all genetic lineages, including the *improcerus*-group and the *versutus*-group, were found to have the exopodal seta on the A2 basipodite, while it was absent in *D. ishidai*.

Most specimens of the *improcerus*-group, which belong to the XI genetic lineage, and some specimens of the *galbinus*-group, which belong to the I genetic lineage, differ from the descriptions of *D. improcerus* and *D. galbinus* only in having a smaller proportion of cephalothorax and other thoracic segments or length of antennule. Due to the telescopic nature of these features, variations in specimen fixation and storage may have affected the accuracy of their measurements, as noted for Cyclopoida (Huys and Boxshall, 1991; Karanovic and Krajčec, 2012).

Additionally, we calculated the ratio of cephalothorax length to the sum of pediger 2-5 segment length, but it is unclear if G.F. Mazepova used the same method, as she only may have only used the lengths of pediger 2-4 segments. Thus, these lineages may represent *D. improcerus* and *D. galbinus*, and the genetic and morphological data obtained could provide a basis for an integrative redescription of these species in the future. This is especially important since there is no type material available for the endemic *D. improcerus*, *D. versutus*, and *D. galbinus* from Lake Baikal.

PCA of morphometric indices based on linear measurements is limited in separating closely related species within species complexes. Despite their widespread use in Cyclopoida taxonomy and inclusion in species descriptions. More detailed morphometric analyses may allow for the distinction of more closely related species within each of the three complexes found. This has been demonstrated in the separation of morphologically similar species from the genus *Acanthocyclops*, which were considered cryptic species (Karanovic and Bláha, 2019), and in populations of Harpacticoida *Bryocamptus pygmaeus* (G.O. Sars, 1863) (Novikov and Fefilova, 2021). Additionally, we are confident that a detailed morphological analysis will reveal new meristic characters that can distinguish closely related species. Differences were found between specimens from different genetic lineages in the basipodite of the antenna and the caudal side of P4. However, a large number of informative characters on the cephalothoracic appendages, legs, and caudal rami appendages in both female and male specimens remain unanalyzed. The results suggest that the diversity of the endemic Cyclopoida fauna in Lake Baikal is higher than previously believed. Molecular methods have increased understanding of the species diversity of crustaceans, such as amphipods and ostracods, inhabiting Lake Baikal by detecting of cryptic species (Schön et al., 2017; Väinölä and Kamal'tynov, 1999). Our study of

*Diacyclops* found species with genetic and morphological differences, which can be used to identify them. This group requires an integrative detailed redescription, along with the description of new species.

Representatives from different genetic lineages across all three groups occur in the same samples and belong to sympatric species. The closest genetically related species that occur sympatrically are sister lineages V and VI. G.F. Mazepova also collected samples of *D. galbinus*, *D. improcerus* and *D. versutus* and emphasized their sympatric distribution. In each group, we observed one predominant genetic lineage, which we found in various locations and at different times. It is interesting to note that specimens from the predominant lineages (I and XI) are more similar in morphology to *D. galbinus* and *D. improcerus*. The remaining genetic lineages represented by only one or two specimens in our analysis, are rare. The abundance of three lineages in our study is probably due to their occurrence at shallow depths, starting from the water's edge where most of our samples were taken. Specimens of rare lineages were collected from depths of 10 to 30 m.

## 4.2. Phylogeny of *Diacyclops* from Lake Baikal

Although *Diacyclops* is highly diverse and currently comprises over 100 species, genetic databases for this genus are extremely limited. We included sequences for non-baikalian *Diacyclops* in the analysis, and both molecular markers (COI and 12S) indicate that Baikal *Diacyclops* form a monophyletic group. Previous studies of Baikal *Diacyclops*, using a conserved 18S fragment, have demonstrated the monophyly of endemic *Diacyclops* species from Lake Baikal (Mayor et al., 2010). On the one hand, this could indicate a common ancestor for all Baikal *Diacyclops* analyzed, which diverged and gave rise to the observed species complexes. This scenario is possible due to the unique nature of Baikal. For millions of years, it has remained a refuge and a center of speciation for many groups of animals, including crustaceans, such as amphipods, ostracods, and harpacticoids (Timoshkin, 2001; Schön et al., 2017; Moskalenko et al., 2020). On the other hand, our dataset only includes *Diacyclops* species from different morphological groups (species complexes), and only Baikal species belong to the *languidoides*-group. The genus *Diacyclops* may be polyphyletic or paraphyletic, and the unidentified morphological groups may represent distinct genera (Monchenko, 2000; Karanovic, 2006). These groups are distinguished based on the segmentation of swimming legs and antennules. Our 12S tree includes sequences of species from three groups: the *languidoides*-, the *bicuspidatus*- and the *aticola*-group. It is believed that the evolution of Cyclopoida has led to the oligomerization of appendages. As a result, the *bicuspidatus*- and *aticola*-groups are considered the most primitive groups, while the *languidoides*-group is more evolutionarily advanced and successful, and is one of the most specious groups (Pesce, 1994; Monchenko and Klein, 1999).

The *languidoides*- group and the *aticola*-group are represented by endemic species from Lake Baikal and Australia, respectively. The *bicuspidatus*-group is represented by Palaearctic species. Species from the three groups predictably formed three monophyletic groups. One interesting finding was that the *bicuspidatus*-group is genetically closer to the *languidoides*-group than to the *aticola*-group, despite their similar morphology. To fully comprehend the relationships of species complexes within *Diacyclops*, further research is necessary. This should include the study of conserved nuclear molecular markers and the inclusion of representatives from all morphological groups.

Within the monophyletic group of the analyzed Baikal endemic *Diacyclops*, two clusters of sister taxa were identified. The first cluster comprises *D. sp.* (VIG2) and the *improcerus*-group species complex, while the second cluster consist of *D. konstantini*, the V genetic lineage, and the *versutus*-group. Specimens of the *improcerus*-group belong to the smallest *Diacyclops* in this study. In general, among baikalian *Diacyclops*, they are larger than only three species: littoral *D. zhimulevi*, interstitial *D. biceri*, and *D. eulithoralis*. The reduction in body size likely contributes to the ecological success of the *improcerus*-group and is related to their adaptation to feeding on small animals, algae, or detritus. The forager group includes small littoral and interstitial cyclopoids that feed on detritus, water plants stems, epiphytic algae, protozoa, small invertebrate's corpses (Monakov, 1998). V.I. Monchenko, used *Diacyclops* as a model genus to demonstrate that during the morphological-evolutionary development of Cyclopoida, there was a decrease in body size and oligomerization of thoracic appendages. The reduction in body size was the primary process. The author linked both processes to a significant reduced in energy expenditure (Monchenko, 2003). Initially, an ancestor of the *improcerus*-group with ancestors of the *versutus*- and *galbinus*-groups likely diverged sympatrically. Within the *improcerus*-group, there may have been instances of peripatric speciation. In this study, we collected specimens of genetic lineage IX of the *improcerus* group from the same geographical location and period as some of the specimens of lineage XI. However, the specimens of lineage IX were collected from a depth of 30 meters, while specimens of lineage XI were collected from a depth of 10 meters. It is important to note that this assumption of parapatric speciation of the IX and XI lineages requires further verification.

The most recent of the *Diacyclops* considered are the potential species of the *versutus*-group. They have the closest genetic distances according to COI and ITS1. Further investigation of this group should employ more polymorphic genetic markers, such as the *nad2* gene of mtDNA, which has a higher evolutionary rate than COI in Copepoda (He et al., 2023). This group characterized by shortened, thickened antennules that do not reach the posterior margin of the cephalothoracic shield. The antennules are armed with a large number of setae and the third endopodite of P4 is armed with three spines and two setae. According to G.F. Mazepova, the

presence of a large number of setae on A1 in *D. versutus* is associated with its habitation on soft soils, including silts. Specimens of the *versutus*-group were collected from various substrates, including hard substrates, sand, stones, and stones with sand. The change in antennule and the third endopodite of P4 morphology in the ancestral form of the *versutus*-group may have contributed to ecological success, similar to the body reduction in the *improcerus*-group, and provided a predatory feeding advantage. It is possible to assume that the group underwent peripatric speciation along the depth gradient. Specimens of genetic lineage VIII were found at minimum depths of up to 1 meter, while specimens of lineages VII and VI were found at greater depths of 10 and 15 meters.

The *galbinus*-group is the most perplexing. The validity of *D. galbinus* has been questioned since its description. Monchenko V.I. considered this species to be a synonym of *D. moravicus* (Sterba, 1956), which inhabits the karst waters of Moravia (Monchenko, 1974). Unfortunately, *D. moravicus* sequences are not available in the databases to compare it with the *galbinus*-group. Additionally, *D. galbinus* is the only species of the endemic *Diacyclops* found outside Lake Baikal, in Lake Shartlinskoye, making it subendemic. The benthic copepods of Lake Baikal include another one subendemic species - *Harpacticella inopinata*, which also found in the Yenisei River. The molecular study of this species from the Yenisei River has revealed its relatively recent Baikal origin, likely due to anthropogenic introduction (Fefilova et al., 2023). To assess the dispersal routes of the *galbinus*-group, it is necessary to analyze molecular genetic data from specimens of *D. galbinus* collected from Lake Shartlinskoye. Furthermore, our study shows that while the *galbinus*-group is a monophyletic group with the rest of the Baikal *Diacyclops*, it is genetically distant. It is possible that ancestral form of the *galbinus*-group diverged during the relatively early stages of Cyclopoida evolution in Lake Baikal and may have had a different ancestral form of *Diacyclops* than the other endemic *Diacyclops* analyzed. The study revealed the existence of four genetic lineages among specimens with similar morphology to *D. galbinus*. It is possible that each lineage represents a potentially new species.

## Acknowledgments

We thank A.P. Fedotov (LIN SB RAS), L.V. Sukhanova (LIN SB RAS), S.V. Usov (LIN SB RAS), A.G. Luchnev, and E. Safonov for sample collection. We are grateful to E.B. Fefilova (Institute of Biology, Komi Scientific Centre UB RAS), to M. Hołynska (Museum and Institute of Polish Academy of Sciences) and to J.P. Sapozhnikova (LIN SB RAS) for their valuable consultations and translation assistance. This study was performed in the Framework of The State Assignment No. 0279-2021-0005 (121032300224-8). The nucleotide sequences using a Nanophor 05 genetic analyzer (Sintol, Russia) and CLSM study was performed at the Instrumentation Center “Electronic Microscopy” of the Collective Instrumental Center “Ultramicroanalysis” (LIN SB RAS).

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Alekseev V.A., Arov I.V. 1986. A New cyclopoid of the genus *Diacyclops* (Crustacea, Copepoda) from a coastal zone of Lake Baikal. *Zoologicheskii Zhurnal* 65(7): 1084-1088
- Bouckaert R., Heled J., Kühnert D. et al. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computer Biology* 10: e1003537. DOI:[10.1371/journal.pcbi.1003537](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537)
- Boxshall G.A., Evstigneeva T.D., Clark P.F. 1993. A New Interstitial Cyclopoid Copepod from a Sandy Beach on the Western Shore of Lake Baikal, Siberia. *Hydrobiologia* 268: 99-107. DOI:[10.1007/BF00006880](https://doi.org/10.1007/BF00006880)
- Boxshall G.A., Halsey S.H. 2004. *An Introduction to Copepod Diversity*. Ray Societ
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. et al. 2012. jModelTest 2: More Models, New Heuristics and Parallel Computing. *Nature Methods* 9: 772. DOI:[10.1038/nmeth.2109](https://doi.org/10.1038/nmeth.2109)
- Fefilova E., Popova E., Mayor T. et al. 2023. Morphological and Genetic Identification of Harpacticella Inopinata (Harpacticoida, Copepoda) from Lake Baikal and the Yenisei River (Russia). *Inland Water Biology* 16: 863-872. DOI:[10.1134/S1995082923050061](https://doi.org/10.1134/S1995082923050061)
- Flössner D. 1984. Two new species of the genera *Acanthocyclops* and *Diacyclops* (Crustacea, Copepoda) from Lake Baikal. *Limnologia (Berlin)* 15 (1): 149-156. (in German)
- Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):1-9
- He L., Zhou Z., Huang Y. et al. 2023. Evolutionary Rates Divergence Rates and Performance of Individual Mitochondrial Genes Based on Phylogenetic Analysis of Copepoda. *Genes* 14:1496. DOI:[10.3390/genes14071496](https://doi.org/10.3390/genes14071496)
- Hołynska M., Sługocki Ł., Ghaouaci S. et al. 2021. Taxonomic Status of Macaronesian Eucyclops Agiloides Azorensis (Arthropoda: Crustacea: Copepoda) Revisited -Morphology Suggests a Palearctic Origin. *European Journal of Taxonomy* 750:1-28. DOI:[10.5852/ejt.2021.750.1357](https://doi.org/10.5852/ejt.2021.750.1357)
- Huys R., Boxshall G.A. 1991. *Copepod Evolution*. The Ray Society. Nat. Hist. Mus. London.
- Karanovic T. 2006. Two New Genera and Three New Species of Subterranean Cyclopoids (Crustacea Copepoda) from New Zealand with Redescription of *Goniocyclops silvestris* Harding 1958. *Contributions to Zoology* 74. 223-254. DOI:[10.1163/18759866-0740304002](https://doi.org/10.1163/18759866-0740304002)
- Karanovic T., Bláha M. 2019. Taming Extreme Morphological Variability through Coupling of Molecular Phylogeny and Quantitative Phenotype Analysis as a New Avenue for Taxonomy. *Scientific Reports* 9:2429. DOI:[10.1038/s41598-019-38875-2](https://doi.org/10.1038/s41598-019-38875-2)
- Karanovic T., Grygier M., Lee W. 2013. Endemism of Subterranean *Diacyclops* in Korea and Japan with Descriptions of Seven New Species of the *Languidoides*-Group and Redescriptions of *D. brevifurcus* Ishida 2006 and *D. suoensis* Ito 1954 (Crustacea Copepoda Cyclopoida). *ZooKeys* 267: 1-76. DOI:[10.3897/zookeys.267.3935](https://doi.org/10.3897/zookeys.267.3935)
- Karanovic T., Krajčiček M. 2012. First Molecular Data on the Western Australian *Diacyclops* (Copepoda Cyclopoida) Confirm Morpho-Species but Question Size Differentiation

and Monophyly of the Alticola-Group. *Crustaceana* 85: 1549-1569. DOI:[10.1163/156854012X651709](https://doi.org/10.1163/156854012X651709)

Kochanova E., Nair A., Sukhikh N. et al. 2021. Patterns of Cryptic Diversity and Phylogeography in Four Freshwater Copepod Crustaceans in European Lakes. *Diversity* 13. DOI:[10.3390/d13090448](https://doi.org/10.3390/d13090448)

Kumar S., Stecher G., Li M. et al. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology Evolution* 35:1547-1549. DOI:[10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096)

Letunic I., Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Nucleic Acids Research* 49:W293-W296. DOI:[10.1093/nar/gkab301](https://doi.org/10.1093/nar/gkab301)

Li G.Q., Hu Y.L., Kanu S. et al. 2003. PCR Amplification and Sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides* Arakawae. *Veterinary Parasitology* 112:101-108. DOI:[10.1016/S0304-4017\(02\)00409-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00409-0)

Luo A., Ling C., Ho S.Y.W. et al. 2018. Comparison of Methods for Molecular Species Delimitation Across a Range of Speciation Scenarios. *Systematic Biology* 67: 830–846. DOI:[10.1093/sysbio/syy011](https://doi.org/10.1093/sysbio/syy011)

Machida R.J., Miya M.U., Nishida M. 2002. Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda). *Marine Biotechnology* 4: 406-417. DOI:[10.1007/s10126-002-0033-x](https://doi.org/10.1007/s10126-002-0033-x)

Mayor T., Sheveleva N., Sukhanova L. et al. 2010. Molecular-Phylogenetic Analysis of Cyclopoids (Copepoda: Cyclopoida) from Lake Baikal and Its Water Catchment Basin. *Russian Journal of Genetics* 46: 556-1564. DOI:[10.1134/S102279541011013X](https://doi.org/10.1134/S102279541011013X)

Mayor T., Zaidykov I., Kirilchik S. 2019. Morphological and Genetic Polymorphism of New *Diacyclops* Taxonomic Group from Lake Baikal (Copepoda: Cyclopoida). *Limnology and Freshwater Biology*. DOI:[10.31951/2658-3518-2019-A-1-163](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2019-A-1-163)

Mayor T.Yu., Galimova Yu.A., Sheveleva N.G. et al. 2017. Molecular Phylogenetic Analysis of *Diacyclops* and *Acanthocyclops* (Copepoda: Cyclopoida) from Lake Baikal Based on COI Gene. *Russian Journal of Genetics* 53: 252-258. DOI:[10.1134/S1022795417020041](https://doi.org/10.1134/S1022795417020041)

Mazepova G.F. 1978. Cyclopoids of Lake Baikal. Nauka: Novosibirsk. (in Russian)

Michels J., Büntzow M. 2010. Assessment of Congo Red as a Fluorescence Marker for the Exoskeleton of Small Crustaceans and the Cuticle of Polychaetes. *Journal of Microscopy* 238: 95-101. DOI:[10.1111/j.1365-2818.2009.03360.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03360.x)

Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O. et al. 2020. R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution* 37:1530-1534. DOI:[10.1093/molbev/msaa015](https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015)

Monakov A.V. 1998. Feeding of Freshwater Invertebrates; Moscow: Printing house of the Russian Agricultural Academy. (in Russian)

Monchenko V.I. 2003. Free-living Cyclopean copepods of the Ponto-Caspian Basin; Kiev: Naukova dumka. (in Russian)

Monchenko V.I. 1974. *Gnathostoma* Cyclopoida Cyclopidae. Fauna of Ukraine. Kiev: Naukova dumka. (in Ukrainian)

Monchenko V.V., Klein J.C. 1999. Oligomerization in Copepoda Cyclopoida as a kind of orthogenetic evolution in the animal kingdom. *Crustaceana* 72: 241-264. DOI:[10.1163/156854099503320](https://doi.org/10.1163/156854099503320)

Monchenko V.I. 2000. Cryptic species in *Diacyclops bicuspidatus* (Copepoda: Cyclopoida): evidence from crossbreeding studies. *Hydrobiologia* 417: 101–107. DOI:[10.1023/A:1003811606429](https://doi.org/10.1023/A:1003811606429)

Moskalenko V.N., Neretina T.V., Yampolsky L.Y. 2020. To the origin of Lake Baikal endemic gammarid radiations

with description of two new *Eulimnogammarus* spp. *Zootaxa* 4766 (3):zootaxa.4766.3.5. DOI: [10.11646/zootaxa.4766.3.5](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4766.3.5)

Novikov A., Fefilova E. 2021. Morphology of the Cephalothorax Integument of *Bryocamptus Pygmaeus* (Copepoda: Harpacticoida: Canthocamptidae) Based on a New Research Method. *Zoosystematica Rossica* 30:320–330. DOI:[10.31610/zsr/2021.30.2.320](https://doi.org/10.31610/zsr/2021.30.2.320)

Pentinsaari M., Vos R., Mutanen M. 2017. Algorithmic Single-Locus Species Delimitation: Effects of Sampling Effort Variation and Nonmonophyly in Four Methods and 1870 Species of Beetles. *Molecular Ecology Resources* 17: 393–404. DOI:[10.1111/1755-0998.12557](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12557)

Pesce G.L. 1994. The genus *Diacyclops* Kiefer in Italy: a taxonomic ecological and biogeographical up-to-date review (Crustacea Copepoda Cyclopidae). *Arthropoda Selecta* 3(3-4):13-19

Phillips R.B., Matsuoka M.P., Konon I. et al. 2000. Phylogenetic Analysis of Mitochondrial and Nuclear Sequences Supports Inclusion of *Acantholingua Ohridana* in the Genus *Salmo*. *Copeia* 2: 546–550 DOI:[10.1643/0045-8511\(2000\)000\[0546:PAOMAN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2000)000[0546:PAOMAN]2.0.CO;2)

Puillandre N., Brouillet S., Achaz G. 2021. ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning. *Molecular Ecology Resources* 21: 609-620. DOI:[10.1111/1755-0998.13281](https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281)

Reid J.W., Strayer D.L. 1994. *Diacyclops dimorphus* a new species of copepod from Florida with comments on morphology of interstitial cyclopinae cyclopids. *Journal of the North American Benthological Society* 13(2): 250-265

Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X. et al. 2003. DnaSP DNA Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497. DOI:[10.1093/bioinformatics/btg359](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359)

Rylov V.M. 1948. Cyclopoida of freshwater. In *Fauna of the USSR. Crustacea* (in Russian)

Schön I., Pieri V., Sherbakov D.Y. et al. 2017. Cryptic Diversity and Speciation in Endemic *Cytherissa* (Ostracoda, Crustacea) from Lake Baikal. *Hydrobiologia* 800: 61-79. DOI:[10.1007/s10750-017-3259-3](https://doi.org/10.1007/s10750-017-3259-3)

Shaburova N.I. 2010. Biodiversity and zoogeography of Rotifera, Branchiopoda and Maxillopoda of Lakes Sagan Maryan and Shartlinskoye (The State Nature Reserve Baikalo-Lenskiy). In The second interregional scientific-practical conference, devoted to the 10th anniversary of the the Tigirek State Natural Reserve establishment, Russia. Mountain ecosystems of Southern Siberia: study, conservation and rational nature use. Proceeding of the Tigirek State Natural Reserve 3: 215-219. (in Russian)

Sheveleva N.G., Mirabdullaev I.M., Ivankina E.A. et al. 2012. The species composition and ecology of Cyclopoids in Lake Baikal. In: International Conference “Actual problems of studying of the Crustaceans of continental waters”, Borok, Russia, November 5-6, 2012; Kostroma Printing House: Kostroma

Sheveleva N.G., Proviz V.I., Likhnev A.G. et al. 2013. Biology of the coastal zone of Lake Baikal. Part 4. Taxonomic diversity of the benthic fauna in the splash zone of Lake Baikal (in the vicinity of Berezovy Cape – Bol’shye Koty Bay) *Izvestia Irkutskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seria “Biologia. Ecologiya”* 2: 132–143

Sheveleva N., Timoshkin O., Aleksandrov V. et al. 2010. A New Psammophilic Species of the Genus *Diacyclops* (Crustacea: Cyclopoida) from the Littoral Zone of Lake Baikal (East Siberia). *Invertebrate zoology* 7: 47–54, DOI:[10.15298/invertzool.07.1.03](https://doi.org/10.15298/invertzool.07.1.03)

Sheveleva N.G., Mirabdullaev I.M. 2017. Redescription of the Female and the First Description of the Male of *Diacyclops Arenosus* (Mazepova 1950) (Copepoda, Cyclopoida) from Lake Baikal. *Zoologicheskii Zhurnal* 96: 631–640. DOI:[10.7868/S0044513417060095](https://doi.org/10.7868/S0044513417060095)

Sukhikh N., Abramova E., Holl A. et al. 2020. Comparative Analysis of Genetic Differentiation of the *E. Affinis* Species Complex and Some Other Eurytemora Species, Using the CO1, nITS and 18SrRNA Genes (Copepoda, Calanoida). *Crustaceana* 93: 931–955. DOI:[10.1163/15685403-bja10074](https://doi.org/10.1163/15685403-bja10074)

Timoshkin O. 2001. Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area Lake Baikal. In *Diversity of Fauna, Problems of Its Immiscibility And Origin, Ecology and “Exotic” Communities*; Timoshkin O.A.; Nauka: Novosibirsk. (in Russian)

Väinölä R., Kamaltynov R.M. 1999. Species diversity and speciation in the endemic amphipods of Lake Baikal: molecular. *Crustaceana* 72: 945-956

Zagoskin M.V., Lazareva V.I., Grishanin A.K. et al. 2014. Phylogenetic Information Content of Copepoda Ribosomal DNA Repeat Units: ITS1 and ITS2 Impact. *BioMed Research International*: e926342. DOI:[10.1155/2014/926342](https://doi.org/10.1155/2014/926342)

Zhang J., Kapli P., Pavlidis P. et al. 2013. General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements. *Bioinformatics* 29: 2869–2876. DOI:[10.1093/bioinformatics/btt499](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499)

# Обнаружение трех видовых комплексов, близких по морфологии к *Diacyclops galbinus*, *D. versutus* и *D. improcerus* (Cyclopoda: Cyclopoida), из озера Байкал

Оригинальная статья

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGYМайор Т.Ю.\*<sup>ORCID</sup>, Зайдыков И.Ю.<sup>ORCID</sup>, Кирильчик С.В.<sup>ORCID</sup>

Лимнологический институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Cyclopoda представляют разнообразную группу ракообразных, обитающих в озере Байкал. Среди них наиболее богат видами и высокоэндемичен род *Diacyclops* Kiefer, 1927. Для трех байкальских видов данного рода, *D. improcerus*, *D. galbinus* и *D. versutus*, характерна высокая индивидуальная морфологическая изменчивость. Таким образом, возникает вопрос, все ли особи, отнесенные к *D. versutus*, *D. galbinus* или *D. improcerus* принадлежат к этим видам? Молекулярный и морфологический анализы были проведены для *Diacyclops* из озера Байкал, которые по морфологии схожи с *D. improcerus*, *D. galbinus* и *D. versutus*. Анализ данных по трем молекулярным маркерам мтДНК (COI, 12S) и ядерной ДНК (ITS1) позволил выявить три кластера, соответственно разделению особей на три группы по морфологическим признакам. Каждый кластер представлен несколькими генетическими линиями. Мы предполагаем, что это три комплекса близкородственных видов: *improcerus*-, *galbinus*-, и *versutus*-группы. Метод главных компонент на основе морфометрических индексов, широко используемых в таксономии Cyclopoida, ограничен в разделении близкородственных видов внутри данных комплексов. В работе приведены микрофотографии и рисунки четверной пары плавательных ног (P4) и антенн особей разных генетических линий *versutus*- и *improcerus*-групп. Отмечены значительные отличия в окраске коксоподита и соединительной пластинки P4 и базиподита антенны у особей из разных генетических линий.

**Ключевые слова:** озеро Байкал, *Diacyclops*, Cyclopoida, биоразнообразие, эндемичные виды

## 1. Введение

Cyclopoida представляют одну из самых разнообразных групп ракообразных в озере Байкал, следуя по численности видов после амфипод, остракод и гарпактицид (Тимошкин, 2001). Самыми богатыми по видовому составу среди них являются роды *Diacyclops* Kiefer, 1927 и *Acanthocyclops* Kiefer, 1927. Оба рода таксономически сложные в связи с их близким родством и высоким разнообразием видов. Выделяют несколько морфологических групп среди *Diacyclops*, которые рассматриваются, как видовые комплексы (Pesce, 1994; Karanovic, Krajicek, 2012; Reid and Strayer, 1994). *Diacyclops* в озере Байкал представлен 17 видами, из которых 15 эндемики (Мазепова, 1978; Sheveleva et al., 2012; Flössner, 1984). Три вида *Diacyclops* из озера Байкал, из которых *D. talievi* (Мазепова, 1970) - эндемик, принадлежат *bicuspidatus*-группе. Два эндемичных вида, *D. eulithoralis* Arov, Alekseev, 1986 и *D. biceri* Boxshall et al., 1993, относят к *virginianus*-группе

согласно Пеше (1994) или к группе 2 (*languidoides*) согласно Рейд (1994). Двенадцать эндемичных видов *Diacyclops* имеют 11-членистые антеннулы, формулу членистости плавательных (экзоподит/эндоподит): 2.2/3.2/3.3/3.3 и экзоподальную щетинку на базиподите антенне и принадлежат *languidoides*-группе. *Diacyclops* в озере обитают в течение круглого года на всех глубинах, начиная с зоны заплеска, но наиболее разнообразны они в литорали Байкала. Эндемичные *Diacyclops* представлены интерстициальными, бентосными и связанными с губками видами (Тимошкин, 2001; Alekseev and Arov, 1986).

Подавляющая часть эндемичных видов *Diacyclops* была описана Г.Ф. Мазеповой в 1950-1960-е гг., открывшей эту разнообразную и высокоэндемичную группу (Мазепова, 1978). Придерживаясь таксономической системы Рылова (1948), автор отнесла все описанные виды к роду *Acanthocyclops*. В последующие годы было описано еще четыре вида *Diacyclops* и переописан один вид

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [tatyanabfo@mail.ru](mailto:tatyanabfo@mail.ru) (Т.Ю. Майор)

Поступила: 08 февраля 2024; Принята: 22 февраля 2024;

Опубликована online: 29 февраля 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.





*D. arenosus* (Mazepova, 1950), обитающих в озере Байкал (Flössner, 1984; Boxshall et al., 1993; Sheveleva et al., 2010; Sheveleva and Mirabdullaev, 2017).

Эндемичные *D. versutus* (Mazepova, 1962), *D. improcerus* (Mazepova, 1950), *D. konstantini* (Mazepova, 1962) и субэндемичный *D. galbinus* (Mazepova, 1962), схожи по морфологии и являются симпатрическими видами. *D. improcerus*, *D. konstantini* и *D. galbinus* широко распространены, тогда как *D. versutus* редко встречается в байкальской литоральной зоне (Мазепова, 1978). *D. galbinus* и *D. improcerus* также обитают в интерстициали озера Байкал. *D. galbinus* был обнаружен за пределами Байкала в озере Шартлинское, расположенном в северо-западной части байкальской береговой линии (Sheveleva et al., 2013; Шабурова, 2010).

В описании *D. improcerus*, *D. galbinus* и *D. versutus* приводятся значительные вариации морфологических признаков. Таким образом, возникает вопрос, все ли особи, отнесенные к *D. versutus*, *D. galbinus* или *D. improcerus* принадлежат этим видам? Г.Ф. Мазепова объясняла значительную индивидуальную морфологическую вариабельность *D. galbinus* и *D. improcerus* продолжающимися у них процессами активного видообразования (Мазепова, 1978).

Первые результаты исследования Cyclopoidea из озера Байкал выявили несогласованность молекулярных и морфологических данных для циклопов, по морфологии схожих с *D. versutus*, *D. improcerus* и *D. galbinus*. (Майор и др., 2017). Проанализированные особи циклопов по молекулярным данным вошли в филогруппы с неопределенным

таксономическим статусом. Последующий анализ циклопов, относящихся к одной из этих филогрупп, обитающих в Южном Байкале, показал, что морфологически и генетически все исследованные особи близки между собой и, по-видимому, относятся к новому виду *D. sp.* (VIG2) (Mayor et al., 2019).

В этой работе мы продолжаем исследование *Diacyclops* из озера Байкал, близких по морфологии *D. versutus*, *D. improcerus* и *D. galbinus* и *D. konstantini*, используя морфологические и молекулярные методы.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Сбор материала и таксономическое определение

Циклопы были собраны в Южном, Центральном и Северном бассейнах озера Байкал в 2018 – 2023 гг. Прибрежные пробы отбирали сачком с размером ячеек сети 100 мкм. Более глубоководные пробы (2-30 м) отбирали с помощью аквалангиста. Несколько циклопов были любезно предоставлены Сухановой Л.В. и Лухневым А.Г. (ЛИН СО РАН). Циклопов фиксировали в 96% этаноле и хранили при - 20°C.

Таксономическое определение циклопов проводили, используя таксономический ключ Г.Ф. Мазеповой (1978). В исследовании использовали особей, морфологически сходных с *D. versutus*, *D. improcerus*, *D. galbinus* и *D. konstantini*. Характеристики отбора проб представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Характеристики отбора проб, NCBI номера доступа для полученных нуклеотидных последовательностей

Номер особи	Пол	Дата отбора проб	Место отбора проб	Координаты	Глубина, м	Субстрат	Морфологические данные	Длина ITS1 (п.н.)	NCBI номер доступа		
									COI мтDNA	12S рРНК	ITS1
BG5**	♀	28.05.2018	пос. Большое Голоустное	52°01.352' N 105°23.514' E	0,3-0,5	камни	+	318	MK207031	MT020872	MK207045
84**	♀	06.2008	залив Курма	53°10.114' N 106°58.424' E	0,3-0,5	камни	-	-	GU055755	-	-
BG2**	♀	28.05.2018	пос. Большое Голоустное	52°01.352' N 105°23.514' E	0,3-0,5	камни, песок	+	-	MK207029	-	-
BG4**	♀	28.05.2018	пос. Большое Голоустное	52°01.352' N 105°23.514' E	0,3-0,5	камни, песок	+	-	MK207030	-	-
D10**	♀	04.2018	пос. Листвянка	51°52.022' N 104°49.567' E	0,3-0,5	камни	+	-	MK207035	-	-
D12**	♀	04.2018	пос. Листвянка	51°52.022' N 104°49.567' E	0,3-0,5	камни	+	-	MK207037	-	MK207051
BK4**	♀	04.06.2018	пос. Большие Коты	51°54.114' N 105°04.267' E	0,3-0,5	камни, песок	-	318	MK207027	MT020873	MK207049
266*	♀	-	оз. Байкал	-	-	-	+	338	MT176788	MT020868	MT010631
270*	♀	-	оз. Байкал	-	-	-	+	338	MT176789	-	MT010632
366*	♀	17.06.2019	пос. Большие Коты	51°54.111' N 105°04.061' E	1,2	камень с лишайником	+	314	MT176791	-	MT010628
369*	♀	17.06.2019	пос. Большие Коты	51°54.111' N 105°04.061' E	1,2	камень с лишайников	-	314	MT176792	MT020870	MT010629
397*	♀	03.2014	пос. Большие Коты	-	-	-	+	-	MT176790	-	-

Номер особи	Пол	Дата отбора проб	Место отбора проб	Координаты	Глубина, м	Субстрат	Морфологические данные	Длина ITS1 (п.н.)	NCBI номер доступа		
									COI мтDNA	12S рРНК	ITS1
D16	♀	19.05.2018	г. Слюдянка	51°40.017' N 103°42.532' E	0,3-0,5	камни	+	314	MK207039	MT020874	MT010630
BG14	♀	28.05.2018	пос. Большое Голоустное	52°01.352' N 105°23.514' E	0,3-0,5	камни, песок	+	-	MT176787	-	MK591137
BG15	♀	28.05.2018	пос. Большое Голоустное	52°01.352' N 105°23.514' E	0,3-0,5	камни, песок	+	320	MT176793	MT020871	MK207047
BK21	♀	04.06.2018	пос. Большие Коты	51°54.114' N 105°04.267' E	0,3-0,5	камни, песок	+	333	MK207028	-	MK207050
MM1	♀	23.12.2018	Малые Ольхонские Ворота	53°01.073' N 106°54.008' E	0,5	-	+	-	MT176794	MT020875	MK591138
MM2	♀	23.12.2018	Малые Ольхонские Ворота	53°01.073' N 106°54.008' E	0,5	-	+	-	MT176795	MT020876	-
MM3	♀	23.12.2018	Малые Ольхонские Ворота	53°01.073' N 106°54.008' E	0,5	-	+	-	MT176796	-	-
F2	♀	31.05.2021	пос. Большие Коты	51°54.128' N 105°06.168' E	6	камни	+	314	-	-	OR502812
F96	♀	05.06.2021	р. Немнянка	55°32.32' N 109°48.57' E	6	губка	+	-	-	-	OR502819
F107	♀	19.09.2022	мыс Катков	53°11.3512' N 108°25.679' E	10	камни	+	314	OR506695	-	OR502813
F112-1	♀	26.09.2022	мыс Арул	53°27.855' N 107°33.192' E	10	камни, песок	-	-	-	-	OR502820
F112-3	♀	26.09.2022	мыс Арул	53°27.855' N 107°33.192' E	10	камни, песок	+	-	-	-	OR502821
F112-5	♀	26.09.2022	мыс Арул	53°27.855' N 107°33.192' E	10	камни, песок	+	-	-	-	OR502822
F112-6	♀	26.09.2022	мыс Арул	53°27.855' N 107°33.192' E	10	камни, песок	+	-	-	-	OR502823
F112-7	♀	26.09.2022	мыс Арул	53°27.855' N 107°33.192' E	10	камни, песок	-	-	-	-	OR502814
F116-1	♀	17.09.2022	д. Ангасолка	51°43.6301' N 103°46.486' E	20	камни	+	-	-	-	OR502800
F116-2	♀	17.09.2022	д. Ангасолка	51°43.6301' N 103°46.486' E	20	песок	+	-	OR501221	-	OR502801
F120	♀	25.09.2022	мыс Нижний Кедровый	54°21.47' N 108°30.4' E	15	камни	+	330	-	-	OR502803
F130	♀	26.09.2022	мыс Арул	53°27.962' N 107°33.999' E	30	-	+	300	-	-	OR502804
F135-1	♀	16.09.2022	Уланово	51°47.7913' N 104°31.515' E	30	песок	+	303	-	-	OR502805
F135-2	♀	16.09.2022	Уланово	51°47.7913' N 104°31.515' E	30	песок	+	325	-	-	OR502806
F136-1	♀	17.09.2022	д. Ангасолка	51°43.6301' N 103°46.486' E	5	песок	+	320	-	-	OR502807
F136-2	♀	17.09.2022	д. Ангасолка	51°43.6301' N 103°46.486' E	5	песок	+	-	-	-	OR502815
F144	♀	27.09.2022	Чертов Мост	51°56.133' N 105°15.672' E	15	камни, песок	+	-	PP280626	-	OR502808
F156-1	♀	16.09.2022	Уланово	51°47.7913' N 104°31.515' E	10	песок	+	-	OR506692	-	OR502809
F156-2	♀	16.09.2022	Уланово	51°47.7913' N 104°31.515' E	10	песок	+	328	OR506693	-	OR502810
F156-3	♀	16.09.2022	Уланово	51°47.7913' N 104°31.515' E	10	песок	+	-	OR506691	-	OR502817

Номер особи	Пол	Дата отбора проб	Место отбора проб	Координаты	Глубина, м	Субстрат	Морфологические данные	Длина ITS1 (п.н.)	NCBI номер доступа		
									COI мтDNA	12S рРНК	ITS1
F191-1	♀	27.04.2023	пос. Большие Коты	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	камни, песок	-	333	-	-	OR502811
F191-3	♀	27.04.2023	пос. Большие Коты	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	камни, песок	+	-	-	-	OR502802
F191-4	♀	27.04.2023	пос. Большие Коты	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	камни, песок	+	-	-	-	-
F191-5	♂	27.04.2023	пос. Большие Коты	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	камни, песок	+	-	OR506696	-	OR502818
F193	♀	27.04.2023	пос. Большие Коты	51°53.5859' N 105°03.502' E	1	камни, песок	+	-	-	-	-

**Примечание:**

«\*» – циклопы, были любезно предоставлены Л.В. Сухановой и А.Г. Лухневым

«\*\*» – данные для циклопов были опубликованы ранее (Mayor et al., 2019)

«+» – данные имеются

«-» – данные отсутствуют

**2.2. Морфологический анализ**

Морфологический анализ проводили с помощью стереомикроскопа МСП-1 (ЛОМО, Россия) и микроскопа Olympus CX 41 (Olympus, Япония). Особи вымачивали в воде, фотографировали и измеряли с помощью цифровой камеры Levenhuk M 800 Plus, присоединенной к микроскопу Olympus CX 41 и программного обеспечения LevenhukLite (Levenhuk, Inc., США). Рисунки четвертой пары плавательных ног были выполнены с помощью микроскопа Olympus CX 41 и рисовальной насадки U-DA (Olympus, Япония). Рисунки морфологических признаков выполняли с помощью рисовальной насадки U-DA Olympus Drawing Attachment для Olympus CX41 (Olympus, Япония). Длину тела получали, суммируя длину цефалоторакса, торакальных и абдоминальных сегментов.

Сокращения морфологических обозначений:

- Ti внутренняя терминальная щетинка
- Te внешняя терминальная щетинка
- Td дорсальная щетинка
- Tl латеральная щетинка
- Tmi средняя внутренняя терминальная щетинка
- Tme средняя внешняя терминальная щетинка
- Lf длина каудальных ветвей
- Wf ширина каудальных ветвей
- Epr3 третий эндподитный членик
- P4, P5 четвертая, пятая пара плавательных ног
- LP5 длинная дистального членика P5
- IAS внутренний апикальный шип третьего эндподита P4
- EAS внешний апикальный шип третьего эндподита P4
- L длина
- W ширина
- A1 антеннула
- A2 анетенна
- Sphth цефалоторакс
- sp шип
- se щетинка

Для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) образцы самок циклопов окрашивали красным Конго в течение ночи и помещали на предметное стекло, следуя процедуре, описанной Михельсом и Бюнцовым (Michels and Büntzow, 2010). Материал сканировали с помощью лазерного конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 710 (Zeiss, Германия) с линзами Plan-Apochromat 20×/0,8 и 63×/1,40 Oil DIC M27; фильтры 570-670 нм; 561 нм, при 3,0 % мощности лазеров. Наиболее изменчивые морфологические показатели оценивали с помощью анализа соответствия и использовали для метода главных компонент. Все статистические анализы были выполнены с использованием Past 4.11 (Hammer et al., 2001).

**2.3. Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование**

Общую ДНК выделяли из яйцевых мешков или соматической ткани следующим образом: особи циклопов, фиксированные этанолом, повторно регидратировали в деионизованной воде в течение 20 мин. Затем биологический материал инкубировали в 2-кратном буфере Encyclo для ПЦР (без Mg<sup>2+</sup>) (Evrogen, Россия), содержащем 0,1 мг/мл Протеиназы К, при 65°C в течение 1 часа. После этого проводили инкубацию при 94°C в течение 5 мин. для деактивации Протеиназы К. Полученный раствор, содержащий тотальную ДНК, хранили при температуре -20°C и использовали в 10-кратном разведении для ПЦР в качестве ДНК-матрицы.

ПЦР проводили с использованием универсальных праймеров, LCO-1490 и HCO-2198 для амплификации фрагмента COI (Folmer et al., 1994), KP2 (5'-AAAAAGCTTCCGTAGGTGAACCTGCG-3') и 5,8S (5'-AGCTTGGTGCGTTCTTCATCGA-3') для амплификации ITS1 (Phillips et al., 2000), и H13845-12S (5'-GTGCCAGCAGCTGCGTTA-3') и L13337-12S (5'-YCTACTWTGYTACGACTTATCTC-3') для амплификации 12S (Machida et al., 2002). Амплификацию проводили в термоциклере 100TM

(Bio Rad, США) с использованием реагентов для ПЦР (Evrogen, Россия). Реакцию проводили в смеси объемом 20 мкл: 1x Encyclo буфер, 3,5 мМ магния, 0,5 мМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого dNTP, 0,5 единиц ДНК-полимеразы Encyclo и 2 мкл раствора, содержащего ДНК.

Программа амплификации включала этап нагревания смеси до 94°C в течение 4 мин., 35-40 циклов, состоящих из следующих этапов: 94°C в течение 15 сек., 48°C или 57°C (для фрагментов COI и ITS1, 12S соответственно) в течение 20 сек., 72°C в течение 1 мин. Заключительную стадию элонгации проводили при 72°C в течение 4 мин. Для секвенирования ампликоны экстрагировали из агарозного геля с использованием протокола, описанного ранее (Майор и др., 2010). Нуклеотидные последовательности целевых фрагментов определяли с помощью набора для секвенирования ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 в 8-капиллярных генетических анализаторах ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, США) и Нанофор 05 (Синтол, Россия).

## 2.4. Молекулярно-филогенетический анализ

Полученные последовательности были внесены в базу данных GenBank, и их номера доступа в NCBI приведены в Таблице 1. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и расчет генетических расстояний были выполнены с использованием программы MegaX (Kumar et al., 2018). Полиморфизм ДНК оценивали с помощью программы DnaSP 5.10.01 (Rozas et al., 2003). Внутригеномный полиморфизм был обнаружен в некоторых последовательностях ITS1, и мы закодировали сайты с двойными пиками в соответствии с IUPAC. Для анализа наборов данных COI, 12S и ITS1 мы выбрали модели GTR + G, HKY + G и TN93 + G, соответственно, на основе информационного критерия Акайке и Байесовского информационного критерия, рассчитанных с помощью jModelTest 2.1.6 (Darriba et al., 2012). Деревья максимального правдоподобия были построены с использованием IQ-TREE2 (Minh et al., 2020). Поддержка узлов для ветвей оценивалась с помощью бутстрэп алгоритма, используя 1000 репликаций. Кроме того, мы включили в анализ последовательности видов *Diacyclops* и других циклопов, доступных в базе генетических данных. Их номера доступа в GenBank приведены на филогенетических деревьях. Деревья были визуализированы и отредактированы с использованием Interactive Tree Of Life (iTOL) версии 6.8.1 (<https://itol.embl.de>, доступ осуществлен 16 сентября 2023 г. и 3 октября 2023 г.) (Letunic and Bork, 2021).

Для делимитации видов на основе набора данных COI, мы применяли методы определения границ видов, которые используют попарные генетические расстояния и филогенетические деревья. Мы использовали инструмент Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP) с р-дистанциями и настройками по умолчанию (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/> дата обращения: 3 октября 2023

года) (Puillandre et al., 2021). В анализе использовали также методы Poisson Tree Processes (PTP) и Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) (Zhang et al., 2013) с настройками по умолчанию и ML-деревом, полученным в ходе исследования. Кроме того, был использован Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) метод с ультраметрическим деревом, полученным в программе Beast 2.5.2 (Bouckaert et al., 2014). Ссылки на источники для PTP и GMYC <https://species.h-its.org/ptp/> и <https://species.h-its.org/gmyc/>, соответственно, дата обращения 20 октября 2023 года.

## 3. Результаты

### 3.1. Таксономическая идентификация

Сорок три особи взрослых самок и один самец *Diacyclops* были отобраны из озера Байкал с различных субстратов и глубин от уреза воды до 30 м (Таблица 1). Семь из них отнесены к *D. sp.* (VIG2). Для 38 особей получены фотографии и проведены измерения морфологических признаков, включая антеннулы, каудальные ветви и их щетинки, плавательные ноги 4 и 5 пары и длину тела. Определены морфометрические индексы используемые как в таксономии циклопов, так и приводимые Г.Ф. Мазеповой (1978) в описании байкальских *Diacyclops*. Большинство рачков были сфотографированы до выделения ДНК. Три экзоскелета были потеряны после экстракции ДНК, и для этих особей есть только молекулярные данные. Две из них принадлежат *Diacyclops* с наименьшей длиной тела в анализе.

Среди 10 особей, наиболее близких по морфологии *D. improcerus*, часть отличалась от данного вида более коротким цефалотораксом и более длинными антеннулами, другая часть отличалась вооружением Epr3P4, которое состояло из трех шипов и двух щетинок вместо двух шипов и трех щетинок. Из 10 особей схожих с *D. galbinus*, 6 особей отличались от этого вида более длинными каудальными ветвями, более короткой латеральной щетинкой относительно ширины каудальных ветвей и более длинной Te. Одна особь (MM1) отличалась более короткими апикальным шипом P5 и цефалотораксом. Две особи (BG14, F144) имели более короткий цефалоторакс (Таблица 2). Для одной особи (F112-7), близкой по строению EprP4 к *D. galbinus* имеются только молекулярные данные. В исследование были включены 14 особей, близкие по морфологии на *D. versutus*. Но все они имеют более длинную латеральную щетинку относительно ширины каудальных ветвей. Две особи (F156-1, F156-3) отличались от *D. versutus* также более короткими каудальными ветвями и меньшей пропорцией дорсальной щетинки и Te. Особь F156-2 отличалась от *D. versutus* также меньшей пропорцией Ti и Te. Самец (F191-5) был схож по морфологии к самкам (F193, F191-1 – F191-4) и *D. versutus* в вооружении Epr3P4 и также был включен в анализ. Три особи были определены, как *D. konstantini*.

Таблица 2. Морфометрические параметры анализируемых циклопов

Вид, номер особи	Lf/Wf	Te/Ti	Tmi/Tme	Td/Te	Tl/Wf	Lenp3P4/ м Wenp3P4	IAS/ EAS	LA1/Lcpthth	Lcpthth/длина 2-5 сегментов торака	LspP5/LP5
<i>D. versutus</i> *	1,8-3,4 (2,5)	0,5-1,8 (1,2)	1,7-2,2 (1,8)	0,9-1,5 (1,2)	0,3-0,6 (0,5)	1,0-1,8 (1,4)	0,6-1,2 (1,0)	A1 короткие, едва достигают середины цефалоторакса	-	Длина шипа P5 значительно варьирует
<i>D. galbinus</i> *	2,9-5,4 (3,7)	0,6- 1,8 (1,2)	1,3-1,9 (1,6)	0,8-1,2 (1,00)	1,4-2,0 (1,6)	1,6-3,0 (2,0)	1,1-1,8 (1,3)	A1 достигают заднего края цефалоторакса	2	Длина шипа P5 равна или немного меньше длины дистального сегмента P5
<i>D. improcerus</i> *	1,8-4,1 (3,0)	1,0- 2,1 (1,6)	-	-	-	1,0-1,4 (1,2)	1,0-1,9 (1,35)	A1 короткие, обычно достигают середины цефалоторакса	1,6-2,3 (1,86)	Длина шипа P5 равна или немного меньше, больше длины дистального сегмента P5
MM3	2,63	1,67	1,93	1,00	1,17	1,43	1,29	0,78	0,90	0,68
MM2	2,35	1,39	1,81	-	1,14	1,54	0,83	-	1,15	-
BG14	1,86	1,71	1,82	1,04	0,93	1,21	1,18	0,92	0,84	1,13
BK21	2,50	1,49	2,20	-	1,16	1,28	1,17	0,73	0,98	0,77
F193	1,80	1,20	1,70	1,20	1,20	1,40	1,20	0,79	0,86	0,89
F191-3	2,37	1,57	1,64	1,05	1,18	1,43	1,22	0,77	1,59	1,54
F191-4	2,34	1,73	1,45	1,02	1,25	1,43	1,17	0,95	0,85	1,41
F156-3	1,40	1,69	1,83	-	0,72	1,38	1,05	0,77	0,98	0,81
F156-1	1,44	1,43	1,91	0,47	0,84	1,22	1,00	0,67	0,84	0,75
F120	2,60	1,60	1,90	0,94	1,33	1,46	1,12	0,71	0,98	0,71
F156-2	2,51	2,06	-	1,05	1,13	1,02	1,20	-	0,76	1,15
F96	3,08	1,68	1,73	0,91	1,22	1,57	1,20	0,73	0,77	1,01
F-130	2,70	1,56	1,54	1,10	0,94	1,15	1,32	0,66	2,10	0,80
D16	2,89	1,17	1,48	1,04	1,07	1,24	1,24	1,12	0,93	1,01
366	2,03	2,03	1,53	1,39	1,11	1,16	1,21	0,87	1,40	1,37
F112-5	3,41	1,72	1,59	1,25	1,01	1,27	1,26	0,81	1,16	0,70
F112-6	3,79	1,33	1,86	1,70	1,25	1,18	1,23	0,88	1,00	0,60
F112-3	3,25	1,80	-	1,62	0,87	1,08	1,15	0,79	1,18	0,80
F-107	3,57	-	-	-	0,97	1,14	1,41	-	0,99	1,00
F2	3,69	1,41	1,21	1,57	1,23	1,25	1,13	0,92	1,10	0,80
MM1	3,40	1,26	NA	0,95	1,62	2,16	1,26	0,98	1,14	0,52
BG15	3,45	1,82	1,68	1,00	1,36	1,99	1,19	0,94	1,26	0,51
F144	3,80	1,39	1,60	1,06	1,38	2,10	1,16	1,24	0,98	0,82
F116-1	5,82	0,94	1,53	-	1,83	1,90	1,23	1,23	0,98	0,60
F116-2	4,00	1,17	-	1,28	1,32	2,11	1,33	0,94	1,13	0,89
F136-1	3,76	1,96	1,71	0,81	1,36	2,23	1,33	-	1,20	0,81
F136-2	5,05	2,29	-	0,95	1,71	2,57	1,25	1,3	1,15	0,96
F135-1	3,78	1,75	-	-	1,00	2,50	1,25	1,2	1,56	0,75
F135-2	3,95	1,63	1,52	-	1,35	2,56	1,21	1,2	1,17	0,98

**Примечание:**

«\*» – данные Г.Ф. Мазеповой (1978), в скобках даны средние значения

«-» – данные отсутствуют

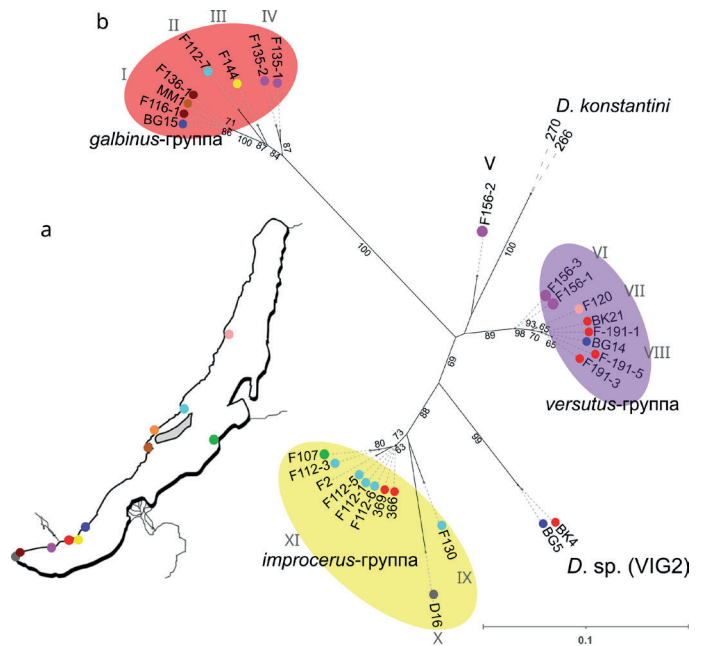
### 3.2. Молекулярная филогения и делимитация видов

В ходе исследования молекулярные маркеры амплифицировали в одинаковых условиях для морфологически сходных особей, собранных в одном месте. Однако амплификация фрагментов ДНК различалась по специфичности и выходу продукта (Таблица 1) К примеру, из пяти особей (F193, F-191-1, F191-3, F191-4 и F191-5), собранных в одной пробе и близких по морфологии, только для трех особей были успешно амплифицированы молекулярные маркеры. В результате были определены 10, 35 и 21 нуклеотидных последовательностей для фрагментов генов 12S, ITS1 и COI соответственно (Таблица 1). Внутригеномный полиморфизм для ITS1 был отмечен для 10 особей. В шести нуклеотидных последовательностях двойные пики найдены в одном сайте (266, BG15, BK21, F116-1, F120 и F135-1), в трех нуклеотидных последовательностях (BG14, 369 и F130) – в двух сайтах, а у одной нуклеотидной последовательности (366) – в семи сайтах. Среди мутаций в сайтах с двойными пиками было 14 транзиций и 3 трансверсии. Позиции сайтов ITS1 с двойными пиками совпадали для разных образцов (BG14/366, BG14/BK21 и F116-1/266).

Три короткие ITS1 нуклеотидные последовательности (F96, F116-2 и F136-2) были депонированы в GenBank, но исключены из филогенетического анализа. Набор данных для филогенетического анализа составил 31 нуклеотидную последовательность с длиной общего выравнивания 461 п.н., 73 полиморфными сайтами и 69 парсимони-информативными сайтами. На филогенетическом древе по ITS1 (ML) нуклеотидные последовательности особей, близких по морфологии *D. galbinus*, *D. improcerus* и *D. versutus* сформировали три кластера: *galbinus*-группа, *versutus*-группа и *improcerus*-группа (Рис. 1). Каждый кластер содержит несколько генетических линий. В *galbinus*-группе выявлено четыре линии (I-IV), в *versutus*-группе – три линии (VI-VIII) и в *improcerus*-группе также три линии (IX-XI). Нуклеотидная последовательность F156-2 представляет отдельную линию (V), которая не входит ни в одну из трех групп.

Нуклеотидные последовательности *versutus*-группы, F156-2 (V), *D. konstantini*, *D. sp.* (VIG2) и *improcerus*-группы сформировали отдельный большой кластер. Представители *galbinus*-группы генетически обособлены от данного кластера.

Набор данных по фрагменту COI с длиной общего выравнивания 693 п.н. и 57 парсимони-информативными сайтами, включал 22 нуклеотидные последовательности *Diacyclops* из озера Байкал, 11 нуклеотидных последовательностей трех видов *bicuspidatus*-группы из Польши и Кореи (*D. bisetosus*, *D. crassicaudis* и *D. bicuspidatus*) и 4 нуклеотидные последовательности *D. sp.* из Австралии. На COI филогенетическом древе нуклеотидные последовательности *Diacyclops* из озера Байкал формируют монофилетичную группу, которая генетически



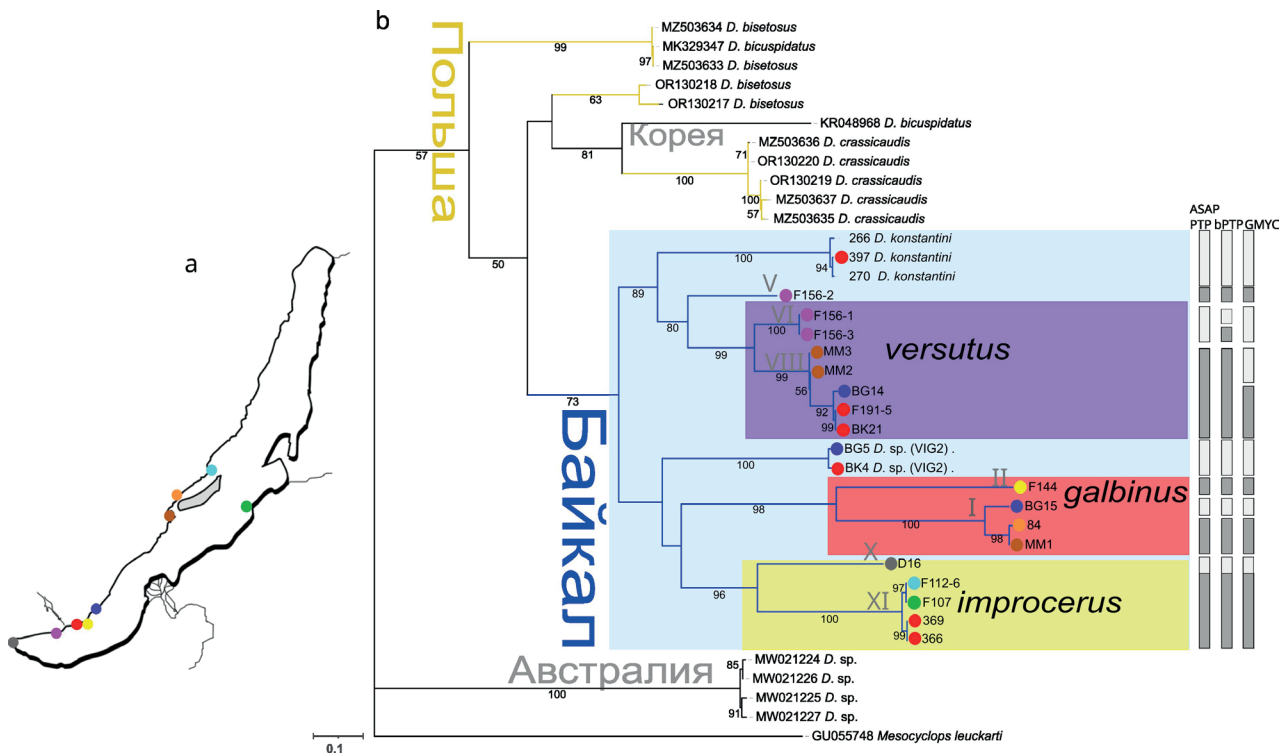
**Рис.1.** (а) Карта-схема отбора проб (Таблица 1), цвет кругов совпадает с таковым на филогенетическом древе. (б) Филогенетическое древо, построенное на основе ITS1 нуклеотидных последовательностей (ML, TN93 + G). Число в узле – значение бутстрэп поддержки. Римские цифры обозначают генетические линии. Круг рядом с нуклеотидной последовательностью отражает место сбора особи.

удалена от других представителей *Diacyclops*. Топологии древ по двум молекулярным маркером, COI и ITS1, согласуются. На COI древе также отдельно группируются последовательности *versutus*-, *galbinus*- и *improcerus*-групп, каждая из которых представлена несколькими генетическими линиями (Рис. 2)

Две генетические линии *versutus*-group (VI, VIII) достоверно сестрински F156-2 (V) и *D. konstantini* и формируют вместе отдельный кластер. Нуклеотидные последовательности *D. sp.* (VIG), двух линий *galbinus*-группы (I, II) и двух линий *improcerus*-группы (IX, X) формируют три других отдельных кластера.

Методы делимитации видов ASAP и RTP при анализе набора данных COI для байкальских *Diacyclops* выделили 10 «видов». Результаты в целом согласуются с топологией древа по COI, однако представители I линии BG15 и 84, MM1 разделены на два «вида». Методы делимитации bPTR и GMYK идентифицировали в этом же наборе 11 «видов» и показали разные результаты при разделении *versutus*-группы. Метод bPTR выделил F156-1 (VI), F156-3 (VI) и VIII генетическую линию (MM2, MM3, BG14, F191-5, и BK21) как три отдельных вида. Метод GMYK выделил F156-1 (VI) и F156-3 (VI) как один «вид», но подразделил VIII генетическую линию на два «вида»: MM2/MM3 и BG14, F191-5, BK21.

В набор данных по 12S вошли 9 нуклеотидных последовательностей байкальских *Diacyclops* и 9 нуклеотидных последовательностей *Diacyclops* из



**Рис.2.** (а) Карта-схема отбора проб (Таблица 1), цвет кругов совпадает с таковым на филогенетическом древе. (б) Филогенетическое древо, построенное на основе COI нуклеотидных последовательностей (ML, GTR + G). Число в узле – значение бутстрэп поддержки. Римские цифры обозначают генетические линии. Прямоугольники рядом с деревом отражают «виды», идентифицированные методами ASAP, PTP, bPTP и GMYC. Круг рядом с нуклеотидной последовательностью отражает место сбора особи.

Австралии, Японии и Украины. Общее выравнивание фрагмента дало 497 п.н., включая 186 полиморфных позиций и 162 парсимони-информативных позиций. На 12S, как и на COI древе, байкальские *Diacyclops* формируют монофилетичную группу. Эта группа вместе с нуклеотидными последовательностями *bicuspidatus*-группы, включающими *D. bisetosus* из Японии и *D. bicuspidatus* из Украины, входит в отдельный большой кластер (Рис. 3). Три эндемичных вида из Австралии, относящиеся к *aticola*-группе, *D. scaloni*, *D. sobeprolatus* и *D. humphreysi*, генетически удалены от этого кластера. Топологии древ по трем молекулярным маркерам согласуются для эндемичных байкальских *Diacyclops*. На древе по 12S представители I линии (BG15, MM1) *galbinus*-группы формируют дистантный кластер. Нуклеотидные последовательности D16 (X) и 369 (XI) *improcerus*-группы также формируют кластер, которому наиболее близки нуклеотидные последовательности *D. sp.* (VIG2).

### 3.3. Генетические дистанции

Полная длина первого транскрибируемого спейсера (ITS1) варьировала в диапазоне от 300 до 338 п.н. и была специфична для каждой генетической линии (Таблица 1), за исключением *improcerus*-группы, где длина ITS1 у линий XI и X была одинаковой - 314 п.н. Модель-скорректированные генетические дистанции (TN93 + G) между ITS1 нуклеотидными последовательностями линий байкальских *Diacyclops* были близки таковым значе-

ниям р-дистанций и варьировали от 0,7% до 20,1% (Приложение, Таблица S1-S3). Максимальная генетическая дистанция между нуклеотидными последовательностями внутри линий составила 0,4%. Значения р-дистанций в наборе данных по COI между генетическими линиями байкальских *Diacyclops* варьировали от 9,1% до 20,9%. Самые большие генетические расстояния в пределах линий соответствовали 5,6% для I и 2% для II линий. По обоим молекулярным маркерам минимальные генетические дистанции между линиями показаны для *versutus*-группы. Они составили 0,7-1,6% для ITS1 и 9,1% для COI наборов данных. Генетические дистанции по ITS1 и COI среди линий *galbinus*-группы составили соответственно 3,5-4,0% и 17,7%. Среди линий *improcerus*-группы эти значения были схожи и составили 3,3-7,2% и 16,1% соответственно для ITS1 и COI данных. Максимальные генетические расстояния по ITS1 и COI были выявлены между линиями *galbinus*-группы и *improcerus*-группы и составили соответственно 12,2-20,1% и 20,1-20,9%. Генетические р-дистанции в наборе по 12S между линиями байкальских *Diacyclops* варьировали от 11,8% до 23,1%. Наиболее близкие значения дистанций получены между X и XI линиями *improcerus*-группы. Наиболее дистантны между собой линии из разных групп: XI линия *improcerus*-группы и VIII линия *versutus*-группы (20,9%), VIII линия *versutus*-группы и I линия *galbinus*-группы (20,5%), X и XI линии *improcerus*-группы и I линия *galbinus*-группы (21,6% and 21,7 %).

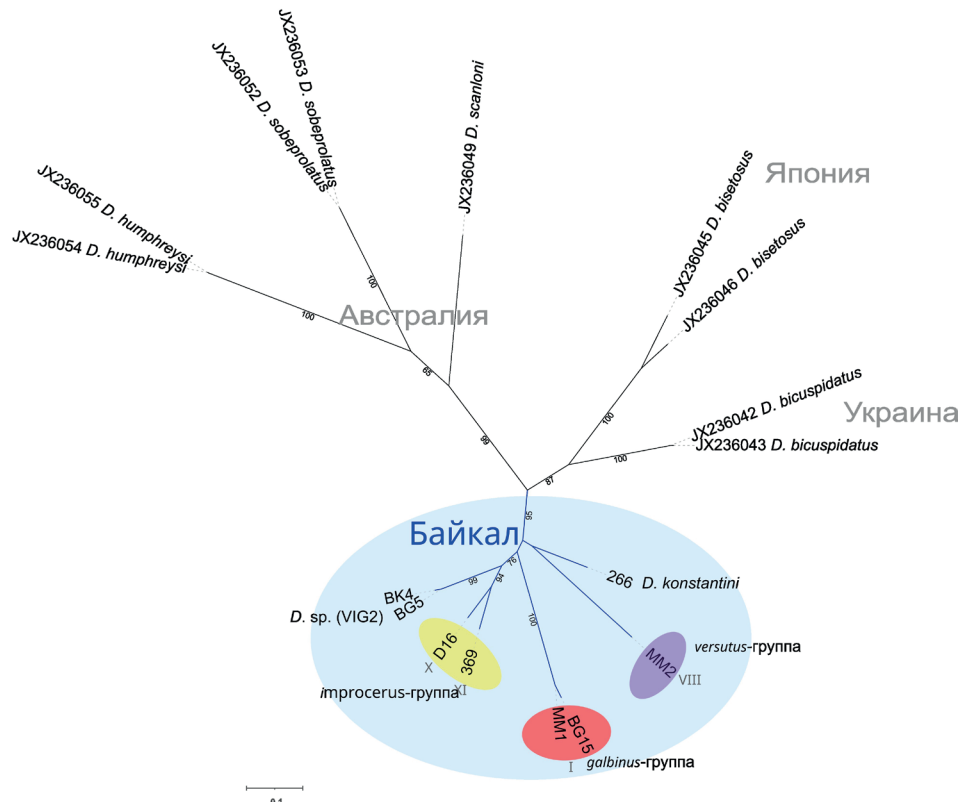


Рис.3. Филогенетическое древо, построенное на основе 12S мтДНК (ML, НКУ + G). Число в узле – значение бутстрэп поддержки. Римские цифры обозначают генетические линии.

### 3.4. Распространение генетических линий

Представители *galbinus*-, *improcerus*-, и *versutus*-групп распространены симпатрически (Рис. 1а). Особи *D. konstantini*, *D. sp. (VIG2)*, VIII линии *versutus*-группы и XI линии *improcerus*-группы были собраны в районе пос. Большие Коты в разное время. Представители *D. sp. (VIG2)*, VIII, I генетических линий были собраны в одной пробе в районе пос. Большое Голоустное (Таблица 1). Также в одной пробы мы находили представителей *versutus*-группы (F156-1, F156-3 - VI) и генетически близкой им V линии (F156-2); особей *galbinus*-группы (F112-7 - II) и *improcerus*-группы (XI) или представителей *galbinus*-группы (MM1 – I) и *versutus*-группы (MM2, MM3 - VIII).

В каждой группе мы обнаружили наиболее представленную генетическую линию, особи которой мы находили периодически в разных точках Байкала. Таковыми являются I линия *galbinus*-группы, XI линия *improcerus*-группы и VIII линия *versutus*-группы.

### 3.5. Морфометрический анализ

Метод главных компонент применяли к данным морфометрических индексов, полученных для 37 особей. Из них 9 особей принадлежали *galbinus*-группе, 12 особей - *versutus*-группе, 8 особей - *improcerus*-группе, 3 особи - *D. konstantini* и 5 особей *D. sp. (VIG2)* (BG2, BG4, BG5, D10, D12). Молекулярные данные были получены для большинства этих особей. По результатам анализа соответствий

8 морфометрических параметров, Tmi/Tme, Td/Te, Ti/Tmi, Ti/Tme, Ti/Td, LA1/Lcpht, Ltела и LseP5/LspP5, вместе объясняют 5% вариальности первой оси (общая вариальность - 25.6%) и были исключены из набор данных для дальнейшего анализа методом главных компонент (PCA). Более вариабельные параметры, такие как Lf/Wf, Te/Ti, Tl/Wf, Lenp3P4/Wenp3P4, IAS/EAS, расположение на каудальных ветвях Tl, IAS/Lenp3P4, IAS/Wenp3P4, Ti/Lf, Tl/Te, Ti/Td, Ti/Te, LP5/WP5, LspP5/LP5 и WP5/LspP5 были включены в анализ PCA. Первые две главных компоненты (PC1, PC2) объясняют 76,1% изменчивости морфометрических параметров. PC1 и PC2 объясняют 61,5% и 14,6% вариации. Первая главная компонента имеет сильную положительную корреляцию с пропорцией длины и ширины каудальных ветвей (Lf/Wf), менее сильную положительную корреляцию с пропорцией длины и ширины третьего эндоподита четвертой пары плавательных ног (Lenp3P4/Wenp3P4), пропорцией длины латеральной щетинки и ширины каудальных ветвей (Tl/Wf) и отрицательную корреляцию с пропорцией длин внешней и внутренней крайних апикальных щетинок (Te/Ti), а также с пропорцией длин внутреннего апикального шипа третьего эндоподита P4 и длины этого членика (IAS/Lenp3P4). Вторая главная компонента имеет сильную положительную корреляцию с пропорцией длины внутреннего апикального шипа третьего эндоподита P4 и ширины данного членика (IAS/Wenp3P4) и с пропорцией длины и ширины третьего эндоподита P4 (Lenp3P4/Wenp3P4), менее сильную положительную корреляцию с отношением длины и ширины дистального членика P5 (LP5/WP5) и





поверхности, двумя рядами тонких шипов на проксимальной части фронтальной поверхности и тонкими шипами вдоль обеих боковых поверхностей и вооружен двумя голыми щетинками и экзоподальной щетинкой с сетулами (Рис. 5, 6). Второй эндоподит антенны несет семь щетинок.

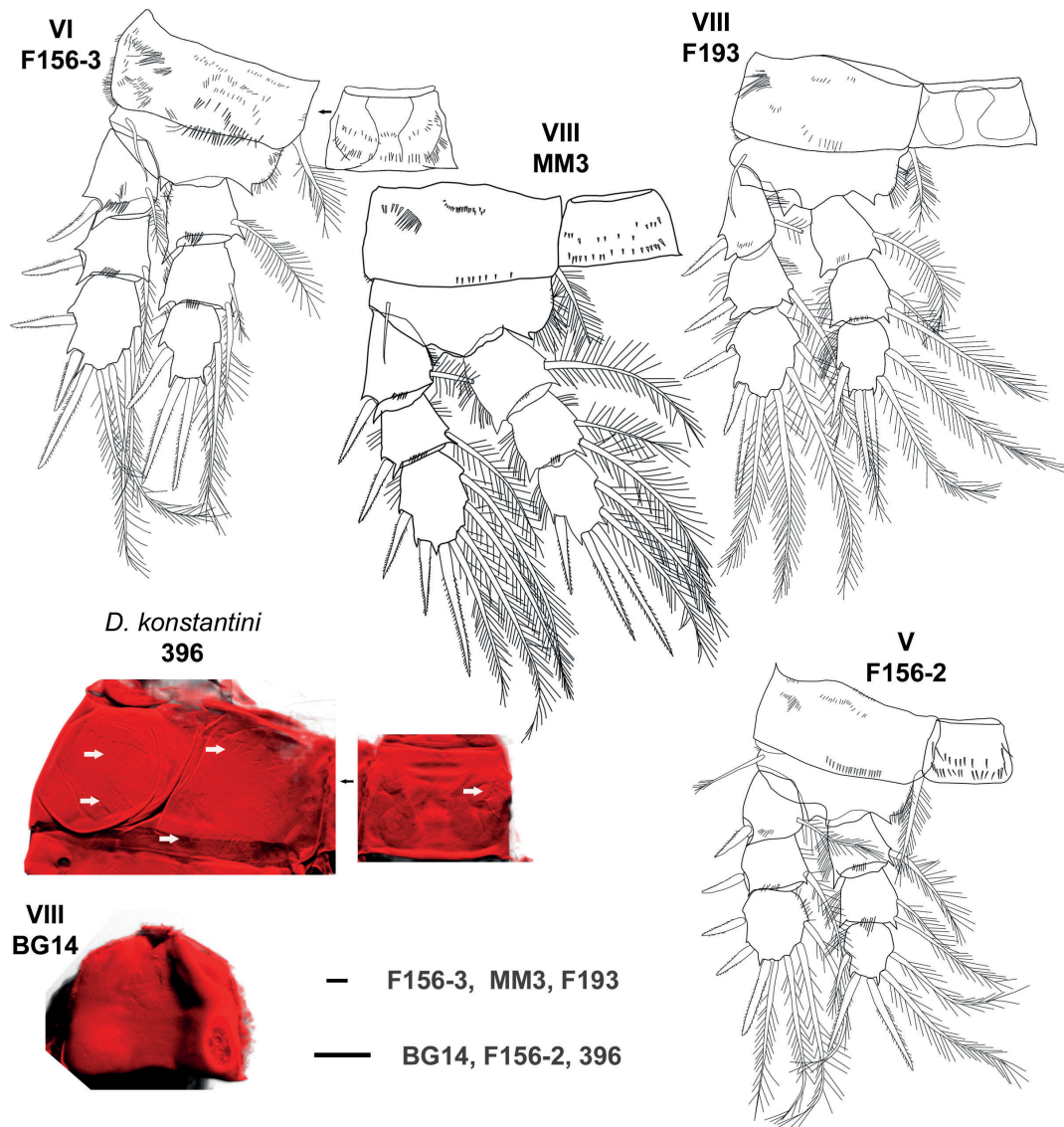
Особи D16 (X), F130 (IX) и 366 (XI) принадлежат трем генетическим линиям *improcerus*-группы. *D. sp* (VIG2) генетически близок к ним. Особи *D. sp* (VIG2) и XI линии *improcerus*-группы несут на EпрЗР4 два шипа и три щетинки. У особей D16 (X) и F130 (IX) этот членик вооружен тремя шипами и двумя щетинками. *D. sp* (VIG2) отличается от представителей *improcerus*-группы апикальным положением внутренней щетинки на EпрЗР4, рядом с IAS (Рис. 7). У особей F130 (XI) и *D. sp* (VIG2) соединительная пластинка P4 орнаментирован двумя рядами шипов в средней части и вдоль дистальной поверхности. У особи 366 (XI) также имеются два ряда шипов на соединительной пластинке P4, однако они прерываются в средней части пластинки. Особь

D16 (X) имеет соединительную пластинку P4 с двумя группами немногочисленных шипов. Базиподиты антенны *D. sp* (VIG2) и 366 (XI) в целом схожи и орнаментированы двумя рядами шипов на каудальной поверхности и рядом щетинок в проксимальной части боковой поверхности, однако у *D. sp* (VIG2) имеется больше шипов в каждом ряду (8 и 9), чем у особи 366 (XI) (Рис. 6).

#### 4. Обсуждение

##### 4.1. Три видовых комплекса, близких по морфологии к *D. improcerus*, *D. galbinus* и *D. versutus*

Хотя мы обнаружили образцы *Diacyclops* со сходной морфологией с тремя интересующими нас эндемичными видами *D. improcerus*, *D. versutus* и субэндемичным *D. galbinus*, нам не удалось идентифицировать их таксономически до уровня вида. Филогенетический анализ *Diacyclops*, основанный

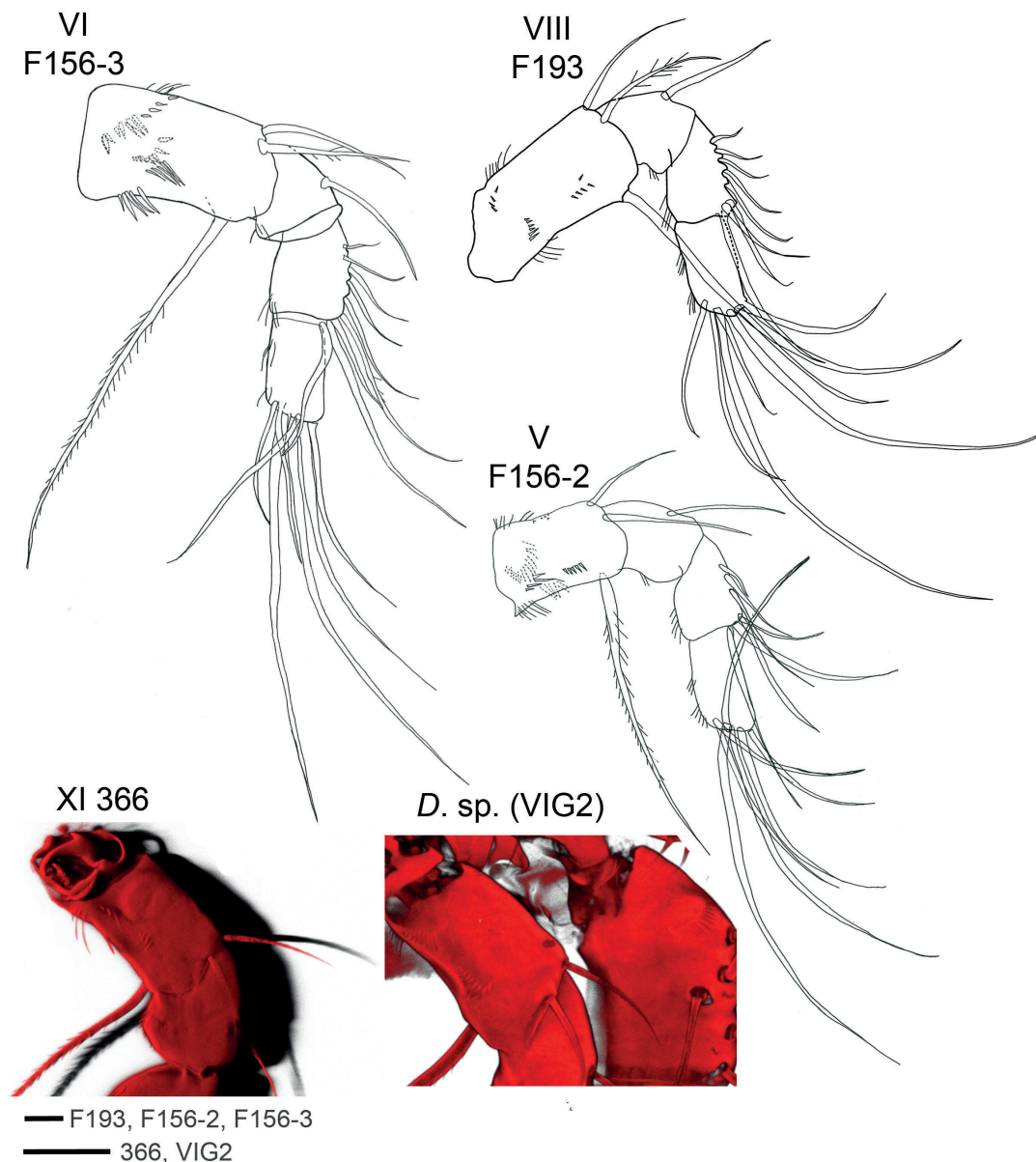


**Рис.5.** КЛСМ микрофотографии (396, BG14) и рисунки каудальной поверхности P4, *versutus*-группы (VI, VIII), V генетической линии (F156-2) и *D. konstantini* (396). Арабские числа означают номер особи, римские числа – номер генетической линии. BG14 – P4, соединительная пластинка с каудальной стороны. Шкала: BG14, F156-2 = 20 μm; F156-3, MM3, F193, 396 = 10 μm.

на двух мтДНК и одном ядерном молекулярных маркерах, выявил три кластера в соответствии с разделением особей на три группы по морфологическим признакам: *improcerus*-, *galbinus*- и *versutus*-группы. Каждая из них включает в себя несколько генетических линий. Мы предполагаем, что *improcerus*-, *galbinus*- и *versutus*-группы являются близкородственными комплексами видов. Существование этих комплексов, вероятно, объясняет значительные вариации диагностических признаков, которые приводятся в описании *D. improcerus*, *D. versutus* и *D. galbinus*.

Генетические расстояния между разными линиями *galbinus*- и *improcerus*-групп соответствуют известным межвидовым аналогичными значениям для этих молекулярных маркеров среди *Copepoda* в целом и *Cyclopoidea* в частности (Zagoskin et al., 2014; Kochanova et al., 2021; Karanovic and Bláha, 2019; Sukhikh et al., 2020). Самыми близкими явля-

ются генетические линии *versutus*-группы. На первый взгляд выделение F120 (VII) в качестве отдельной от VIII линии, вызывает сомнения, но мы ее выделили пока с неясным таксономическим статусом опираясь также на отличающуюся от VIII линии общую длину ITS1 (330 / 333 п.н.). Общая длина ITS1 может быть видоспецифичным признаком, как показано для рода *Culicoides* (Diptera) (Li et al., 2003). Только в *versutus*-группе разные методы дельмитации дали не согласованные результаты. GMYK метод разделил VIII генетическую линию на два вида на основе данных по COI. На древе по этому фрагменту нуклеотидные последовательности BG14, F191-5, BK21 генетически обособлены от MM2, MM3 и в то же время на ITS1 древе данной кластеризации нет. С одной стороны, известно, что метод GMYK может преувеличивать число «видов» (Pentinsaari et al., 2017; Luo et al., 2018). С другой стороны, мы отмечаем разный характер орнамен-



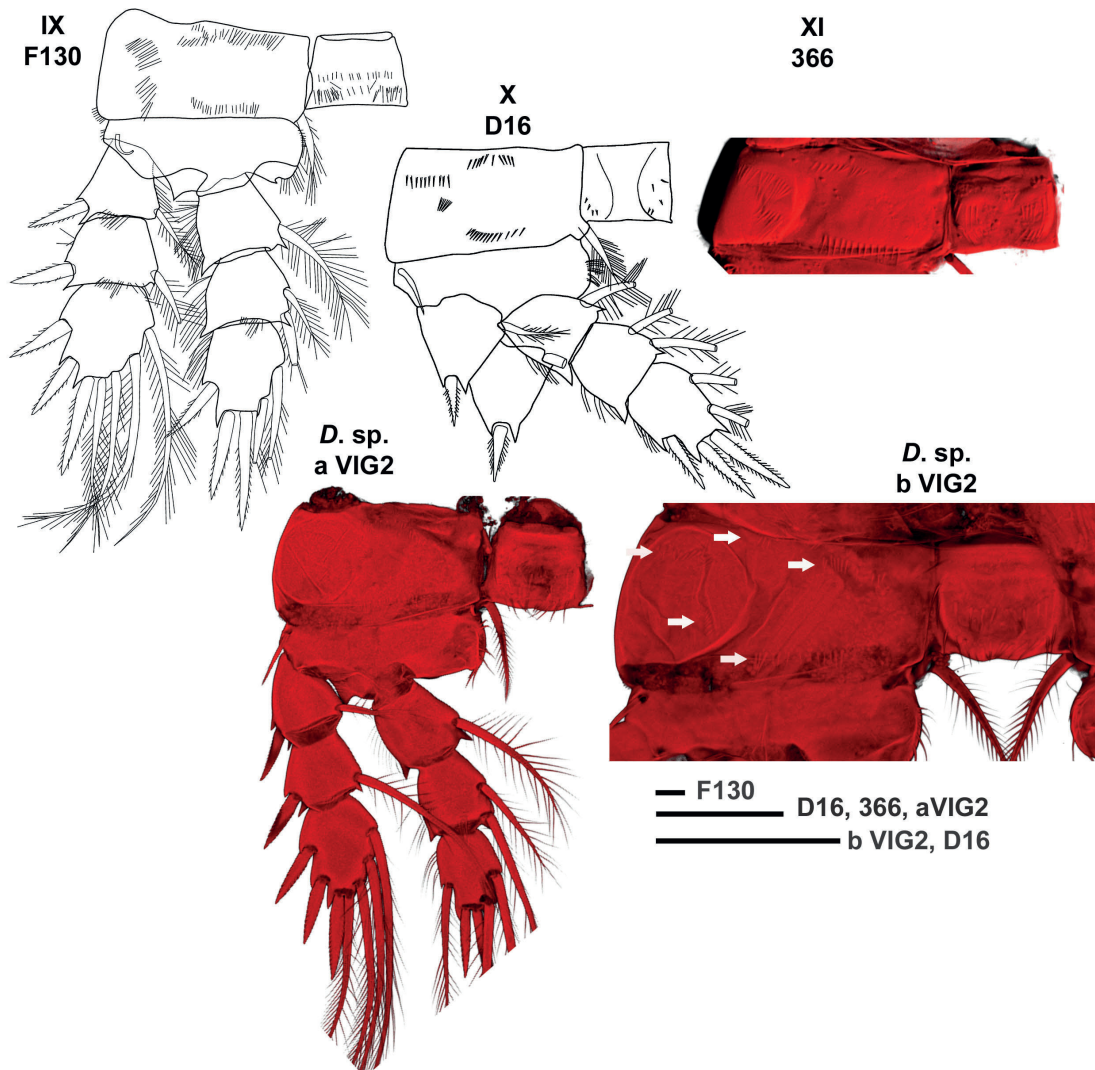
**Рис.6.** КЛСМ микрофотографии и рисунки каудальной стороны антенны *improcerus*-группы (366, VIG2), V генетической линии (F156-2) и *versutus*-группы (F193, F156-2, F156-3). Арабские числа означают номер особи, римские числа – номер генетической линии. Шипы на фронтальной поверхности показаны пунктирной линией. Шкала: F193, F156-2, F156-3 = 10  $\mu$ m; 366, VIG2 = 20  $\mu$ m.

талии соединительной пластинки P4 у MM3 и BG14, что вместе с орнаментацией базиподита антенны является таксономически важными признаками у циклопов и приводятся при их описании (Karanovic et al., 2013; Hołyńska et al., 2021). Линия VI (F156-1, F156-3) *versutus*-группы, по нашему мнению, может рассматриваться, как отдельный вид, так как имеет отличный характер микропризнаков базиподита антенны и соединительной пластинки P4, и по обоим молекулярным маркерам формирует отдельный кластер. Кроме того, особи F156-1, F156-3 отличаются от всех других особей в *versutus*-группе самым маленьким значением пропорции длины и ширины каудальных ветвей (Lf/Wf). Хотя этот признак, как отмечают для байкальских циклопов, варьирует на внутривидовом уровне и может быть не так таксономически важен, как в других родах циклопов, таких как *Eucyclops* к примеру (Rylov, 1948; Мазепова, 1978; Flössner, 1984). Тем не менее по результатам PCA анализа индекс Lf/Wf позволяет разграничить генетически сестринские *D. konstantini* и *versutus*-группу. Также можно использовать в идентификации особей VI линии такой качественный признак, как число щетинок на втором эндоподите

антенны, по которому он отличается от VIII линии.

Мы предполагаем, что особь F156-2 (V) также принадлежит к отдельному новому виду, наиболее близкому *versutus*-группе. Хотя по результатам PCA на основе морфометрических индексов этот потенциально новый вид не отделяется от *versutus*-группы, тем не менее он имеет качественные отличия от ее представителей в структуре третьего эндоподита и второго эндоподита антенны, орнаментации коксоподита P4 и базиподита антенны. Все три использованных метода делимитации видов, также выделяют F156-2 в отдельный вид, и его полная длина ITS1 (328 п.н.) отличается от таковых в *versutus*-группе.

Предполагаемые три вида *improcerus*-группы и генетически сестринского ей *D. sp.* (VIG2) перекрываются по результатам PCA, но ясно отличаются по обоим молекулярным маркерам, согласовано разграничиваются всеми используемыми методами делимитации видов и имеют отличия в орнаментации коксоподита P4. Они также имеют качественные отличия в структуре P4, что для большинства копепод приводится как диагностический признак даже различных родов (Boxshall and Halsey, 2004).



**Рис.7.** КЛСМ микрофотографии (а VIG2, б VIG2, 366) и рисунки каудальной стороны P4 *improcerus*-группы и *D. sp.* (VIG2). Арабские числа означают номер особи, римские числа – номер генетической линии. б VIG2 – P4, коксоподит, соединительная пластинка с каудальной стороны. Шкала: F130 = 10 μm; а VIG2, б VIG2, D16, 366 = 50 μm.

Каранович нашел сходство в короткой пропорции каудальных ветвей у эндемичного *D. ishidai* Karanovic, Grygier & Lee, 2013, обитающего в интерстициали рядом с древним озером Бива и байкальскими видами *D. improcerus*, *D. versutus*. В то же время он отметил ряд количественных отличий этого вида от *D. improcerus*, *D. versutus* даже на основе доступного ограниченного набора известных морфологических характеристик для *D. improcerus*, *D. versutus*. Мы можем дополнить эти отличия качественными признаками. Только XI линия *improcerus*-группы имеет схожее вооружение третьего эндоподита P4 (3 щетинки и 2 шипа), остальные линии этой группы и *versutus*-группы (VI-IX) отличаются по данному признаку (2 щетинки и 3 шипа). Все определенные генетические линии, *improcerus*- и *versutus*-группы имеют экзоподальную щетинку на базиподите антенны, тогда как у *D. ishidai* она отсутствует.

Большая часть особей из *improcerus*-группы, принадлежащие XI генетической линии, и часть особей *galbinus*-группы, принадлежащие I генетической линии, отличались от описаний *D. improcerus* и *D. galbinus* только меньшей пропорцией цефалоторака и остальных торакальных сегментов или более длинной антеннулой. Так как эти признаки состоят из телескопических сегментов, возможно, разная фиксация и хранение особей могли повлиять на точность их измерения, что также отмечается для Cyclozoidea (Huys and Boxshall, 1991; Karanovic and Krajicek, 2012). Кроме того, мы вычисляли соотношение длины цефалоторака к сумме длин 2-5 сегментов торака, но не уверены, что Г.Ф. Мазепова измеряла также, возможно, она использовала только длины 2-4 сегментов. Таким образом, возможно именно XI и I генетической линии представляют *D. improcerus* и *D. galbinus*. Полученные генетические и морфологические данные могут стать основой для интегративного переописания этих видов в будущем. Это особенно важно в условиях отсутствия типового материала для эндемичных циклопов *D. improcerus*, *D. versutus* и *D. galbinus* из озера Байкал.

Метод главных компонент с использованием морфометрических индексов, основанных на линейных измерениях, ограничен в разделении близких видов в пределах комплексов, хотя данные индексы широко используются в таксономии циклопов и указываются при описании видов. Возможно, более детальный морфометрический анализ позволит больше разграничить близкие виды в каждом из трех найденных комплексов, как было показано при разделении близких по морфологии видов из рода *Acanthocyclops*, считавшихся криптическими, (Karanovic and Bláha, 2019) или популяций гарпактикоиды *Bryocamptus pygmaeus* (G.O. Sars, 1863) (Novikov and Fefilova, 2021). Кроме того, мы уверены, что при детальном морфологическом анализе будут найдены новые качественные признаки, которые будут отличать близкие виды. Мы обратили внимание на базиподит антенны и каудальную сторону P4 и нашли отличия у особей

из разных генетических линий. Остаются еще не проанализированными большое число информативных характеристик на цефалотораксе, плавательных ногах, каудальных ветвях, как самок, так и самцов.

Таким образом, наши результаты показывают, что действительное разнообразие эндемичной фауны циклопов в озере Байкал выше, чем предполагалось ранее. Использование молекулярных методов позволило расширить понимание о видовом разнообразии таких ракообразных, как амфиподы, остракоды и гарпактикоиды, обитающих в озере Байкал, за счет обнаружения криптических видов (Schön et al., 2017; Väinölä and Kamal'tynov, 1999). В нашем исследовании мы обнаружили виды циклопов, которые имеют генетические и морфологические отличия и могут быть идентифицированы по последним. Данная группа нуждается в интегративном тщательном переописании, наряду с описанием новых видов.

Представители разных генетических линий всех трех групп встречаются в одних пробах и относятся к симпатрическим видам. Наиболее близкими генетически и встречающимися симпатрически являются сестринские V и VI линии. Г.Ф. Мазепова также обнаруживала в одной пробе *D. galbinus*, *D. improcerus* и *D. versutus* и отмечала их симпатрическое распространение. В каждой группе мы отметили по одной наиболее часто встречающейся генетической линии, особи которых мы периодически находили в разных местах. Интересно то, что особи этих наиболее представленных линий (I и XI) более других близки по морфологии к *D. galbinus* и *D. improcerus*, как отмечалось выше. Остальные генетические линии являются редкими и представлены одной двумя особями в нашем анализе. Возможно, обилие трех линий в данном исследовании связано с их обитанием на небольших глубинах начиная от уреза воды, откуда у нас была большая часть проб. Тогда как особи редких линий собраны с глубин от 10 до 30 м.

## 4.2. Филогения *Diacyclops* из озера Байкал

Несмотря на то, что род *Diacyclops* богат по видовому составу и на данный момент содержит более 100 видов, тем не менее генетические данные для этого рода остаются крайне ограниченными. Мы включили в анализ нуклеотидные последовательности не байкальских *Diacyclops*, и согласно обоим молекулярным маркерам байкальские *Diacyclops* формируют монофилетичную группу. Предыдущие исследования байкальских *Diacyclops* с использованием консервативного фрагмента 18S рРНК также показывали монофилетичность эндемичных видов *Diacyclops* из озера Байкал (Майор и др., 2010). С одной стороны, это может свидетельствовать об общей предковой форме для всех проанализированных байкальских *Diacyclops*, которая дивергировала и дала начало видовым комплексам,

наблюдаемым сейчас. Данный сценарий возможен в связи с уникальностью Байкала, который миллионы лет оставался рифугиумом и центром видообразования для многих групп животных, в том числе ракообразных: амфипод, остракод и гарпактицид (Тимошкин, 2001; Schön et al., 2017; Moskalenko et al., 2020). А с другой стороны в нашем наборе данных присутствуют виды *Diacyclops* из разных морфологических групп (видовых комплексов) и только байкальские виды относятся к *languidooides*-группе. Существует мнение, что род *Diacyclops* – поли- или парафилетичный и выявленные морфологические группы могут представлять отдельные роды (Monchenko, 2000; Karanovic, 2006). Морфологические группы выделены на основе членистости плавательных ног и антеннул. На нашем древе по 12S включены последовательности видов из трех групп: *languidooides*-, *bicuspidatus*- и *aticola*-групп. Считается, что эволюция у *Cyclopoida* идет в сторону олигомеризации придатков. Таким образом *bicuspidatus*- и *aticola*-группы являются самыми «примитивными» группами, тогда как *languidooides*-группа является более эволюционно продвинутой и успешной, являясь одной из самых богатых по числу видов (Pesce, 1994; Monchenko and Klein, 1999). В нашем анализе *languidooides*- и *aticola*-группы представлены эндемичными видами из Байкала и Австралии, *bicuspidatus*-группа представлена палеарктическими видами. Виды из трех групп предсказуемо сформировали три монофилетичные группы и интересным оказалось то, что *bicuspidatus*- является сестринской и более генетически близкой *languidooides*-группе, чем к схожей по морфологии *aticola*-группе. Для полного понимания картины взаимоотношений видовых комплексов в пределах рода *Diacyclops* необходимо дополнительное исследование консервативных ядерных молекулярных фрагментов и включение представителей всех морфологических групп.

В пределах монофилетичной группы проанализированных байкальских эндемичных *Diacyclops* обнаружены два кластера сестринских таксонов. Первый кластер формируют *D. sp.* (VIG2) и комплекс видов *improcerus*-группы, второй кластер включает *D. konstantini*, V линию, и *versutus*-группу. Особи *improcerus*-группы принадлежат к *Diacyclops* с наименьшей длиной тела в данном исследовании и в целом среди байкальских *Diacyclops* являясь крупнее только трех эндемичных видов: литорального *D. zhimulevi* и интерстициальных *D. biceri* и *D. eulithoralis*. Возможно, уменьшение размеров тела влияет на экологический успех *improcerus*-группы и связан с адаптацией к питанию мелкими формами животных, водорослей или детритом. Известно, что некоторые мелкие литоральные и интерстициальные циклопиды относятся к группе собирателей. Они обследуют детрит, стебли водных растений и включают в питание эпифитные водоросли, простейших, трупы мелких беспозвоночных (Монаков, 1998). В.И. Монченко, используя род *Diacyclops* в качестве модельного объекта, показал, что в ходе морфолого-эволюционного развития

*Cyclopoida* происходит уменьшение размеров тела и олигомеризация торакальных конечностей. При этом уменьшение размеров тела является ведущим процессом. Автор связывал оба процесса со значительно сокращающимися энергетическими затратами (Монченко, 2003).

Вероятно, первоначально предок *improcerus*-группы дивергировал симпатрически наряду с предками *versutus*- и *galbinus*-группы, в то время, как в дальнейшем в *improcerus*-группе могли происходить случаи и перипатрического видообразования. В нашем исследовании особь IX генетической линии *improcerus*-группы была найдена в географически том же месте и в одно время, что и часть особей XI линии, но с глубины 30 метров, тогда как особи XI линии были собраны с глубины 10 метров. Конечно, данное предположение о перипатрическом видообразовании IX и XI линий требует дополнительной проверки.

Самыми относительно эволюционно молодыми среди рассматриваемых *Diacyclops* являются потенциальные виды *versutus*-группы. Они имеют наименьшие генетические расстояния по COI и ITS1. Для дальнейшего исследования данной группы целесообразно использовать более полиморфные генетические маркеры. Например, ген *pad2* мтДНК, который у *Copepoda* имеет относительно более высокую скорость эволюции, чем COI (He et al., 2023). Данная группа характеризуется укороченными, утолщенными антеннулами, не достигающими заднего края цефалоторакса, армированные большим числом щетинок и вооружением третьего эндоподита P4 тремя шипами и двумя щетинками. Г.Ф. Мазепова связывала наличие большого числа щетинок на антеннуле у *D. versutus* с его обитанием на мягких грунтах, в том числе илах. В наших сборах особи *versutus*-группы были собраны с разного типа субстратов в том числе и твердых: с песка, камней и камней с песком. Возможно, изменение морфологии антеннул и эндоподита P4 у предковой формы *versutus*-группы также привело к экологическому успеху, как и уменьшение тела у *improcerus*-группы, и связано с преимуществом в хищном питании. Можно также предположить, что дальнейшее видообразование в группе, было перипатрическое вдоль градиента глубин. Так как особи VIII генетической линии были обнаружены на минимальных глубинах до 1 метра, а особи VII и VI линий найдены на больших глубинах 10 и 15 метров.

Самой загадочной в исследованных *Diacyclops* является *galbinus*-группа. Во-первых, валидность вида *D.galbinus* вызывала вопросы после его описания. В.И. Монченко считал этот вид синонимом *D. moravicus* (Sterba, 1956), обитающего в карстовых водах Моравии (Monchenko, 1974). К сожалению, сиквенсов *D. moravicus* нет в базах данных, чтобы сравнить его с *galbinus*-группой. Во-вторых, это единственный вид из описанных эндемичных *Diacyclops*, который найден за пределами озера Байкал, в озере Шартлинское и является таким образом субэндемиком. Из бентосных

байкальских копепоидов, обитающих в озере Байкал, известен также субэндемичный вид *Harpacticella inopinata*, встречающийся в реке Енисей. Молекулярное исследование этого вида из р. Енисей показало его относительно недавнее байкальское происхождение, вероятно, связанное с антропогенным вселением (Fefilova et al., 2023). Чтобы оценить пути расселения *galbinus*-группы необходимо провести анализ молекулярно-генетических данных из озера Шартлинское. И в-третьих, наше исследование показывает, что хоть *galbinus*-группа и входит в монофилетичную группу с остальными байкальскими *Diacyclops*, но тем не менее занимает дистантное положение. Можно предположить, что дивергенция предковой формы *galbinus*-группы, произошла на относительно ранних этапах эволюции Cyclopoidea в озере Байкал или, возможно, имела другую предковую форму *Diacyclops*, чем остальные анализируемые эндемичные *Diacyclops*. В нашем исследовании обнаружено наличие четырех генетических линий, среди особей, похожих по морфологии на *D.galbinus*. Возможно, каждая из них является потенциально новым видом.

## Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность коллегам из ЛИН СО РАН А.П. Федотову, Л.В. Сухановой, С.В. Усову, а также Е. Сафонову, А.Г. Лухневу за помощь в отборе материала. Мы также благодарны Е.Б. Фефиловой (Институт биологии Коми научного центра УО РАН), М. Холинска (Музей и Институт Польской Академии Наук) и Ю.П. Сапожниковой (ЛИН СО РАН) за их ценные консультации и помощь с переводом статьи. Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 0279-2021-0005 (121032300224-8). Секвенирование на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Синтол, Россия) и исследование на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе выполнено в Приборном центре коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП «Ультрамикрoанализ»).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Майор Т.Ю., Шевелева Н.Г., Суханова Л.В. и др. 2010. Молекулярно-филогенетический анализ циклопов (Copepoda: Cyclopoidea) из оз. Байкал и его водосборного бассейна. Генетика 46: 556-1564. DOI:[10.1134/S102279541011013X](https://doi.org/10.1134/S102279541011013X)

Майор Т.Ю., Галимова Ю.А., Шевелева Н.Г. и др. 2017. Молекулярно-филогенетический анализ *Diacyclops* и *Acanthocyclops* (Copepoda: Cyclopoidea) из озера Байкал на основе гена COI. Генетика 53: 252-258. DOI:[10.1134/S1022795417020041](https://doi.org/10.1134/S1022795417020041)

Мазепова Г.Ф. 1978. Циклопы озера Байкал. Наука: Новосибирск

Монаков А.В. 1998. Питание пресноводных беспозвоночных. Москва: Россельхозакадемия

Монченко В.И. 2003. Свободноживущие циклопообразные копепоиды Понто-Каспийского бассейна. Киев: Наукова Думка

Рылов В.М. 1948. Cyclopoidea пресных вод. М.: Л.

Тимошкин О.А. 2001. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: в 2 томах. Наука: Новосибирск

Шабурова Н.И. 2010. Биоразнообразие и зоогеография фауны коловраток и низших ракообразных оз. Саган-Марян и оз. Шартлинское (Б-ЛГЗ). Вторая межрегиональная научно-практическая конференция, посвященная 10-летию организации Тигиринского заповедника «Горные экосистемы Южной Сибири: изучение, охрана и рациональное природопользование 3:215-219

Alekseev V.A., Arov I.V. 1986. A New cyclopoid of the genus *Diacyclops* (Crustacea, Copepoda) from a costal zone of Lake Baikal. Zoologicheskii Zhurnal 65(7): 1084-1088

Bouckaert R., Heled J., Kühnert D. et al. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. PLoS Computer Biology 10: e1003537. DOI:[10.1371/journal.pcbi.1003537](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537)

Boxshall G.A., Evstigneeva T.D., Clark P.F. 1993. A New Interstitial Cyclopoid Copepod from a Sandy Beach on the Western Shore of Lake Baikal, Siberia. Hydrobiologia 268: 99-107. DOI:[10.1007/BF00006880](https://doi.org/10.1007/BF00006880)

Boxshall G.A., Halsey S.H. 2004. An Introduction to Copepod Diversity. Ray Society

Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. et al. 2012. jModelTest 2: More Models, New Heuristics and Parallel Computing. Nature Methods 9: 772. DOI:[10.1038/nmeth.2109](https://doi.org/10.1038/nmeth.2109)

Fefilova E., Popova E., Mayor T. et al. 2023. Morphological and Genetic Identification of *Harpacticella inopinata* (Harpacticoida, Copepoda) from Lake Baikal and the Yenisei River (Russia). Inland Water Biology 16: 863-872. DOI:[10.1134/S1995082923050061](https://doi.org/10.1134/S1995082923050061)

Flossner D. 1984. Two new species of the genera *Acanthocyclops* and *Diacyclops* (Crustacea, Copepoda) from Lake Baikal. Limnologica (Berlin) 15 (1): 149-156. (in German)

Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3: 294-299

Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4(1):1-9

He L., Zhou Z., Huang Y. et al. 2023. Evolutionary Rates Divergence Rates and Performance of Individual Mitochondrial Genes Based on Phylogenetic Analysis of Copepoda. Genes 14:1496. DOI:[10.3390/genes14071496](https://doi.org/10.3390/genes14071496)

Holyńska M., Sługocki Ł., Ghaouaci S. et al. 2021. Taxonomic Status of Macaronesian Eucyclops Agiloides Azorensis (Arthropoda: Crustacea: Copepoda) Revisited -Morphology Suggests a Palearctic Origin. European Journal of Taxonomy 750:1-28. DOI:[10.5852/ejt.2021.750.1357](https://doi.org/10.5852/ejt.2021.750.1357)

Huys R., Boxshall G.A. 1991. Copepod Evolution. The Ray Society. Nat. Hist. Mus. London.

Karanovic T. 2006. Two New Genera and Three New Species of Subterranean Cyclopoids (Crustacea Copepoda) from New Zealand with Redescription of *Goniocyclops silvestris* Harding 1958. Contributions to Zoology 74. 223-254. DOI:[10.1163/18759866-0740304002](https://doi.org/10.1163/18759866-0740304002)

Karanovic T., Bláha M. 2019. Taming Extreme Morphological Variability through Coupling of Molecular Phylogeny and Quantitative Phenotype Analysis as a New Avenue for Taxonomy. Scientific Reports 9:2429. DOI:[10.1038/s41598-019-38875-2](https://doi.org/10.1038/s41598-019-38875-2)

- Karanovic T., Grygier M., Lee W. 2013. Endemism of Subterranean Diacyclops in Korea and Japan with Descriptions of Seven New Species of the Languidoides-Group and Redescriptions of *D. Brevifurcus* Ishida 2006 and *D. Suoensis* Ito 1954 (Crustacea Copepoda Cyclopoida). *ZooKeys* 267: 1–76. DOI:[10.3897/zookeys.267.3935](https://doi.org/10.3897/zookeys.267.3935)
- Karanovic T., Krajicek M. 2012. First Molecular Data on the Western Australian Diacyclops (Copepoda Cyclopoida) Confirm Morpho-Species but Question Size Differentiation and Monophyly of the Alticola-Group. *Crustaceana* 85: 1549-1569. DOI:[10.1163/156854012X651709](https://doi.org/10.1163/156854012X651709)
- Kochanova E., Nair A., Sukhikh N. et al. 2021. Patterns of Cryptic Diversity and Phylogeography in Four Freshwater Copepod Crustaceans in European Lakes. *Diversity* 13. DOI:[10.3390/d13090448](https://doi.org/10.3390/d13090448)
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology Evolution* 35:1547-1549. DOI:[10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096)
- Letunic I., Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Nucleic Acids Research* 49:W293-W296. DOI:[10.1093/nar/gkab301](https://doi.org/10.1093/nar/gkab301)
- Li G.Q., Hu Y.L., Kanu S. et al. 2003. PCR Amplification and Sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides* Arakawae. *Veterinary Parasitology* 112:101-108. DOI:[10.1016/S0304-4017\(02\)00409-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00409-0)
- Luo A., Ling C., Ho S.Y.W. et al. 2018. Comparison of Methods for Molecular Species Delimitation Across a Range of Speciation Scenarios. *Systematic Biology* 67: 830–846. DOI:[10.1093/sysbio/syy011](https://doi.org/10.1093/sysbio/syy011)
- Machida R.J., Miya M.U., Nishida M. 2002. Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda). *Marine Biotechnology* 4: 406-417. DOI:[10.1007/s10126-002-0033-x](https://doi.org/10.1007/s10126-002-0033-x)
- Mayor T., Zaidykov I., Kirilchik S. 2019. Morphological and Genetic Polymorphism of New Diacyclops Taxonomic Group from Lake Baikal (Copepoda: Cyclopoida). *Limnology and Freshwater Biology*. DOI:[10.31951/2658-3518-2019-A-1-163](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2019-A-1-163)
- Michels J., Büntzow M. 2010. Assessment of Congo Red as a Fluorescence Marker for the Exoskeleton of Small Crustaceans and the Cuticle of Polychaetes. *Journal of Microscopy* 238: 95-101. DOI:[10.1111/j.1365-2818.2009.03360.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03360.x)
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O. et al. 2020. R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution* 37:1530-1534. DOI:[10.1093/molbev/msaa015](https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015)
- Monchenko V.I. 1974. *Gnathostoma Cyclopoida Cyclopidae*. Fauna of Ukraine. Kiev: Naukova dumka. (in Ukrainian)
- Monchenko V.V., Klein J.C. 1999. Oligomerization in Copepoda Cyclopoida as a kind of orthogenetic evolution in the animal kingdom. *Crustaceana* 72: 241-264. DOI:[10.1163/156854099503320](https://doi.org/10.1163/156854099503320)
- Monchenko V.I. 2000. Cryptic species in *Diacyclops bicuspidatus* (Copepoda:Cyclopoida): evidence from crossbreeding studies. *Hydrobiologia* 417: 101–107. DOI:[10.1023/A:1003811606429](https://doi.org/10.1023/A:1003811606429)
- Moskalenko V.N., Neretina T.V., Yampolsky L.Y. 2020. To the origin of Lake Baikal endemic gammarid radiations with description of two new Eulimnogammarus spp. *Zootaxa* 4766 (3):zootaxa.4766.3.5. DOI: [10.11646/zootaxa.4766.3.5](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4766.3.5)
- Novikov A., Fefilova E. 2021. Morphology of the Cephalothorax Integument of *Bryocamptus Pygmaeus* (Copepoda: Harpacticoida: Canthocamptidae) Based on a New Research Method. *Zoosystematica Rossica* 30:320–330. DOI:[10.31610/zsr/2021.30.2.320](https://doi.org/10.31610/zsr/2021.30.2.320)
- Pentinsaari M., Vos R., Mutanen M. 2017. Algorithmic Single-Locus Species Delimitation: Effects of Sampling Effort Variation and Nonmonophyly in Four Methods and 1870 Species of Beetles. *Molecular Ecology Resources* 17: 393–404. DOI:[10.1111/1755-0998.12557](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12557)
- Pesce G.L. 1994. The genus *Diacyclops* Kiefer in Italy: a taxonomic ecological and biogeographical up-to-date review (Crustacea Copepoda Cyclopidae). *Arthropoda Selecta* 3(3-4):13-19
- Phillips R.B., Matsuoka M.P., Konon I. et al. 2000. Phylogenetic Analysis of Mitochondrial and Nuclear Sequences Supports Inclusion of *Acantholingua Ohridana* in the Genus *Salmo*. *Copeia* 2: 546–550 DOI:[10.1643/0045-8511\(2000\)000\[0546:PAOMAN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2000)000[0546:PAOMAN]2.0.CO;2)
- Puillandre N., Brouillet S., Achaz G. 2021. ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning. *Molecular Ecology Resources* 21: 609-620. DOI:[10.1111/1755-0998.13281](https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281)
- Reid J.W., Strayer D.L. 1994. *Diacyclops dimorphus* a new species of copepod from Florida with comments on morphology of interstitial cyclopinae cyclopids. *Journal of the North American Benthological Society* 13(2): 250-265
- Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X. et al. 2003. DnaSP DNA Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497. DOI:[10.1093/bioinformatics/btg359](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359)
- Schön I., Pieri V., Sherbakov D.Y. et al. 2017. Cryptic Diversity and Speciation in Endemic *Cytherissa* (Ostracoda, Crustacea) from Lake Baikal. *Hydrobiologia* 800: 61-79. DOI:[10.1007/s10750-017-3259-3](https://doi.org/10.1007/s10750-017-3259-3)
- Sheveleva N.G., Mirabdullaev I.M., Ivankina E.A. et al. 2012. The species composition and ecology of Cyclopoids in Lake Baikal. In: International Conference “Actual problems of studying of the Crustaceans of continental waters”, Borok, Russia, November 5-6, 2012; Kostroma Printing House: Kostroma
- Sheveleva N.G., Proviz V.I., Lukhnev A.G. et al. 2013. Biology of the coastal zone of Lake Baikal. Part 4. Taxonomic diversity of the benthic fauna in the splash zone of Lake Baikal (in the vicinity of Berezovy Cape – Bol’shye Koty Bay) *Izvestia Irkutskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seria “Biologia. Ecologiya”* 2: 132–143
- Sheveleva N., Timoshkin O., Aleksandrov V. et al. 2010. A New Psammophilic Species of the Genus *Diacyclops* (Crustacea: Cyclopoida) from the Littoral Zone of Lake Baikal (East Siberia). *Invertebrate zoology* 7: 47–54, DOI:[10.15298/invertzool.07.1.03](https://doi.org/10.15298/invertzool.07.1.03)
- Sheveleva N.G., Mirabdullaev I.M. 2017. Redescription of the Female and the First Description of the Male of *Diacyclops Arenosus* (Mazepova 1950) (Copepoda, Cyclopoida) from Lake Baikal. *Zoologicheskii Zhurnal* 96: 631–640. DOI:[10.7868/S0044513417060095](https://doi.org/10.7868/S0044513417060095)
- Sukhikh N., Abramova E., Holl A. et al. 2020. Comparative Analysis of Genetic Differentiation of the E. Affinis Species Complex and Some Other Eurytemora Species, Using the CO1, nITS and 18SrRNA Genes (Copepoda, Calanoida). *Crustaceana* 93: 931–955. DOI:[10.1163/15685403-bja10074](https://doi.org/10.1163/15685403-bja10074)
- Väinölä R., Kamal’tynov R.M. 1999. Species diversity and speciation in the endemic amphipods of Lake Baikal: molecular. *Crustaceana* 72: 945-956
- Zagoskin M.V., Lazareva V.I., Grishanin A.K. et al. 2014. Phylogenetic Information Content of Copepoda Ribosomal DNA Repeat Units: ITS1 and ITS2 Impact. *BioMed Research International*: e926342. DOI:[10.1155/2014/926342](https://doi.org/10.1155/2014/926342)
- Zhang J., Kapli P., Pavlidis P. et al. 2013. General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements. *Bioinformatics* 29: 2869–2876. DOI:[10.1093/bioinformatics/btt499](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499)