

<https://doi.org/10.25221/kurentzov.32.11>

<http://zoobank.org/References/71E00BAB-8A4D-4AD4-9E0E-9B699481960B>

**НОВЫЕ ДАННЫЕ ПО ТИХОХОДОКАМ РОДА *MILNESIUM*
(TARDIGRADA, EUTARDIGRADA, MILNESIIDAE) ДАЛЬНЕГО
ВОСТОКА РОССИИ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНОГО БАРКОДИНГА**

Е.В. Маськин¹, П.В. Гребенкин¹, Л.В. Железнова^{1*}, Д.В. Туманов^{2,3}

¹ Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

² Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

³ Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

*Корреспондирующий автор, E-mail: zheleznova.lv@dvfu.ru

Методами интегративной таксономии, включающими анализ морфологических и молекулярно-биологических данных, проведено исследование наземных тихоходок рода *Milnesium* Douyère, 1840 острова Русский (Приморский край, г. Владивосток). Впервые для острова приводятся 3 вида, из них *M. inceptum* Morek, Suzuki, Schill, Georgiev, Yankova, Marley et Michalczyk, 2019 впервые указывается для фауны России. Получены новые данные о распространении и генетическом разнообразии *M. tardigradum* Douyère, 1840. Третий вид, *Milnesium* sp., близок к *M. tardigradum*, но отличается от него присутствием характерной зоны утолщенной кутикулы у основания коготков четвертой пары ног и, вероятно, представляет собой новый для науки вид.

Тихоходки (Tardigrada) – тип микроскопических первичноводных многоклеточных животных, наряду с онихофорами и членистоногими принадлежащий к кладе Panarthropoda. На данный момент этот тип включает 2 класса, 8 отрядов, 32 семейств, 152 рода, 1354 вида (Degma et al., 2009–2020; Pilato, Binda, 2010). Тардиграды встречаются в наземных, морских и пресноводных экосистемах по всему миру (Nelson et al., 2018). Сухопутные тардиграды распространены на всех материках и обитают в субстратах, хотя бы периодически содержащих жидко-капельную воду – во мху, в лишайниках, в опавшей листве и почве. Однако, невзирая на широкую встречаемость, эта группа животных остается слабо изученной в силу микроскопических размеров, методических трудностей и малого числа исследователей (Bartels et al., 2016; Guil, Cabrero-Sañudo, 2007).

Фауна наземных тихоходок островов российского Дальнего Востока исследована недостаточно полно. Так, с острова Попова описан *Paramacrobiotus lorenae* (Biserov, 1996), с острова Итуруп – *Stellariscus latifasciatus* (Dudichev et Biserov, 2000), с Командорских островов – *Dactylobiotus dervizi* (Biserov, 1998), а с Сахалина – *Hypsibius stiliferus* (Abe, 2004) (Бисеров, 1996; Бисеров, 1998; Дудичев, Бисеров, 2000; Abe, 2004).

Кроме того имеются незначительные данные по фауне морских тардиград Японского моря (Tchesunov, Mokievsky, 1995; Бисеров, 1998). Всего на данный момент для территории Дальнего Востока зафиксировано 10 видов гетеротардиград и 55 видов эутардиград.

Целью нашего исследования является изучение видового разнообразия тихоходок о. Русского (г. Владивосток, Фрунзенский район).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Тихоходки были собраны в октябре 2020 года на острове Русский в лишайниках согласно стандартной методике (Stec et al., 2015; Киоса, 2017). Часть найденных тихоходок использовалась для экстракции ДНК, а часть – для приготовления препаратов. Тихоходки монтировались на предметных стеклах с использованием среды Хойера и помещались в термостат на 2 дня при температуре 60°C, затем покровное стекло по контурам покрывалось прозрачным лаком для ногтей. Фотографии сделаны при помощи микроскопа Leica DM2500, цифровой камеры Nikon DS-Fi3 и программного обеспечения NIS software. Морфометрические измерения тихоходок были сделаны по шаблонам, разработанным Михальчиком и Качmareком (Michalczyk, Kaczmarek, 2013) и в соответствии с рекомендациями Туманова (Tumanov, 2006) и Михальчика (Michalczyk et al., 2012). Морфологические описания составлены по исследованным нами экземплярам с острова Русский.

Молекулярно-генетический анализ. Для экстракции ДНК из пробы отбирались отдельные экземпляры живых тихоходок, дважды промывались в дистиллированной воде, для очистки от загрязнений, после чего помещались индивидуально в среду QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen Corporation, USA). Протокол экстракции детально описан в работе (Tumanov, 2020). Выделенная тотальная ДНК использовалась для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР), с последующим секвенированием последовательности нуклеотидов по Сэнгеру. Продукты ПЦР были визуализированы в 1.5% агарозном геле с окраской бромистым этидием. Все ампликоны были секвенированы с помощью ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) на ABI Prism 310 Genetic Analyzer в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Сиквенсы были обработаны в программе ChromasPro (Technelysium, USA). Были определены последовательности фрагмента митохондриального гена COI, который является наиболее широко применяемым в систематике тихоходок баркодом, позволяющим проводить видовую идентификацию. Генетическая дистанция между гаплотипами вычислялась как “uncorrected pairwise distance” при помощи программы MEGA7 (Kumar, 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Класс Eutardigrada Richters, 1926

Отряд Apochela Schuster et al., 1980

Семейство Milnesiidae Ramazzotti, 1962

Род *Milnesium* Doyère, 1840

Milnesium tardigradum Doyère, 1840

Рис. 1–3

Исследованный материал. Приморский край: г. Владивосток, о. Русский, мыс Маргаритова, 43°02'12.7"N, 131°53'39.0"E, октябрь 2020, 20 экз. (Е.В. Маськин, П.В. Гребенкин).

Описание. Тело у молодых особей прозрачное, у более крупных – слегка желтовато-коричневое. Глаза присутствуют у живых особей, однако они растворяются у большей части образцов, фиксируемых средой Хойера. Кутикула гладкая, без скульптуры и псевдопор. Имеются две боковые и шесть окологротовых папилл, также ротовое отверстие окружено окологротовыми ламеллами. Ротовой аппарат типа *Milnesium*. Ротовая трубка цилиндрической формы. Глотка удлинённая и имеет грушевидную форму без плакоидов. Коготки типа *Milnesium*. Конфигурация коготков [2-3]-[3-2] (согласно Michalczyk et al., 2012). Под коготками присутствует одиночная поперечная кутикулярная полоска. Яйца гладкие, желтые, овальные, отложенные в экзувий.

Замечания. Исследованные экземпляры полностью соответствуют ранее опубликованному морфологическому описанию *M. tardigradum* (Michalczyk et al., 2012).

Молекулярно-генетический анализ. Анализ последовательности фрагмента митохондриального гена COI подтвердил, что обнаруженные нами особи относятся к виду *M. tardigradum*. Нами были обнаружены два ранее не описанных в литературе гаплотипа из γ-подгруппы (согласно Morek et al., 2019a), которая является предковой в филогенетических реконструкциях (Morek et al., 2019a). Оба обнаруженных гаплотипа наиболее близки к описанному с территории Японии (Sugiura et al., 2020; Genbank accession number LC511103), один из них практически идентичен с японским (генетическая дистанция 0,8%), второй более удален (генетическая дистанция 2,8%). При этом между собой обнаруженные гаплотипы различаются на 3,1%.

Распространение. Для территории России *M. tardigradum* ранее указывался неоднократно (Biserov, 1991), однако, в свете современных представлений о роде *Milnesium*, большинство этих указаний должны рассматриваться как сомнительные (Tumanov, 2006, 2021; Michalczyk et al., 2012). Достоверно, т. е. с использованием метода молекулярного баркодинга, *M. tardigradum* был обнаружен на территории России лишь в окрестностях Иркутска (Morek, Michalczyk, 2020). Интересно отметить, что выявленный в работе Морека и Михальчика гаплотип так же относится к γ-подгруппе. Наши данные позволяют уточнить

ареал *M. tardigradum* на территории России. На основании полученных методом молекулярного баркодинга данных *M. tardigradum* впервые достоверно отмечается в Приморском крае.

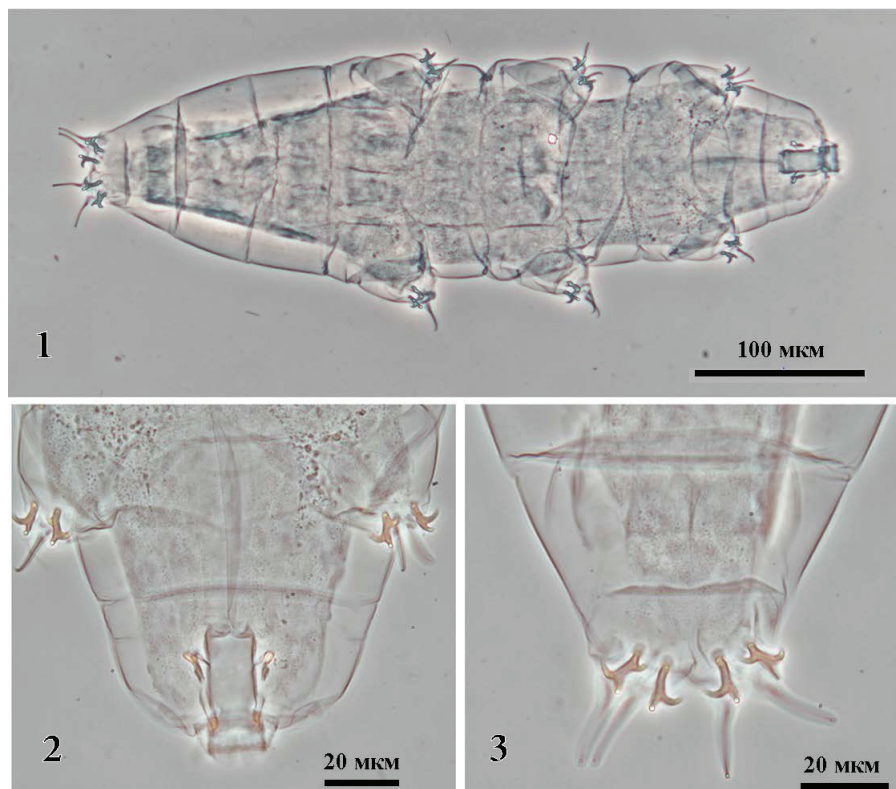


Рис. 1–3. *Milnesium tardigradum*. 1 – общий вид; 2 – структура ротового аппарата; 3 – коготки VI пары ног.

***Milnesium inceptum* Morek, Suzuki, Schill, Georgiev, Yankova, Marley et Michalczyk, 2019**

Рис. 4–6

Исследованный материал. Приморский край: г. Владивосток, о. Русский, мыс Маргаритова, 43°02'12.7"N, 131°53'39.0"E, октябрь 2020, 7 экз. (Е.В. Маськин, П.В. Гребенкин).

Описание. Тело вытянутое, желтоватое. Глаза присутствуют у живых особей, однако они растворяются у большей части образцов, фиксируемых средой Хойера. Кутикула гладкая, псевдопоры не видны в световой микроскоп. Имеются

две боковых и шесть околоротовых папилл, также ротовое отверстие окружено околоротовыми ламеллами. Рототовой аппарат типа *Milnesium*. Ротовая трубка воронкообразной формы. Глоточная луковица удлинненная и имеет грушевидную форму без плакоидов. Коготки типа *Milnesium* с конфигурацией [3-3]-[3-3] (согласно Michalczyk et al., 2012). Под коготками ног 1-3 пары присутствует одиночная поперечная кутикулярная полоска у большинства особей. Самцов обнаружено не было. Молодые особи морфологически идентичны взрослым за исключением отсутствия кутикулярных полосок под коготками ног 1-3 у большинства обследованных особей. Яйца овальные, желтые, гладкие, отложенные в экзувий.

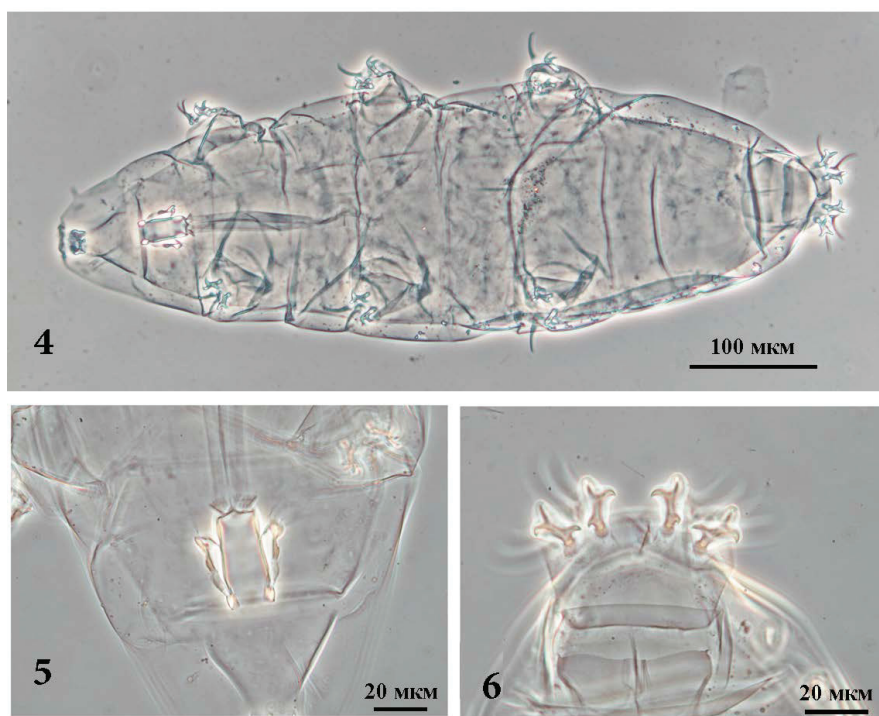


Рис. 4–6. *Milnesium inceptum*: 4 – общий вид; 5 – структура ротового аппарата; 6 – коготки VI пары ног.

Замечания. Приведенное выше морфологическое описание полностью соответствует первоописанию вида (Morek et al., 2019b).

Морфологически *Milnesium inceptum* очень схож с *M. alpigenum* Ehrenberg, 1853; для дифференциации этих видов необходимо с особой тщательностью проводить морфометрический анализ и использовать современные генетические методы.

Молекулярно-генетический анализ. Анализ последовательности фрагмента митохондриального гена COI подтвердил, что обнаруженные нами особи относятся к виду *M. inceptum*. Обнаруженный в нашем материале гаплотип слабо отличается от ранее опубликованных гаплотипов (генетическая дистанция 0,5–0,9%).

Распространение. *Milnesium inceptum* был впервые обнаружен на территории России, ранее сообщалось о наличии популяций на территории Японии, Германии, Швейцарии, Болгарии и Австралии (Morek et al., 2019b; Morek, Michalczyk, 2020).

***Milnesium* sp.**

Рис. 7–9

Исследованный материал. Приморский край: г. Владивосток, о. Русский, мыс Маргаритова, 43°02'12.7"N, 131°53'39.0"E, октябрь 2020, 1 экз. (Е.В. Маськин, П.В. Гребенкин).



Рис. 7–9. *Milnesium* sp. 7 – общий вид; 8 – структура ротового аппарата; 9 – коготки VI пары ног.

Замечания. Нами был обнаружен один экземпляр тихоходки, относящейся к роду *Milnesium*, близкой к представителям вида *M. tardigradum* (конфигурация коготков [2-3]-[3-2], отсутствие псевдопластинок кутикулы и псевдопор). Этот экземпляр характеризуется присутствием характерной зоны утолщенной кутикулы у основания коготков четвертой пары ног. Распространенность и изменчивость подобных образований для представителей Aroschela ранее не изучалась, так как в известной нам литературе такие структуры не были отмечены. Кроме этого, обнаруженный экземпляр имеет отчетливо зазубренные края базальных утолщений коготков всех пар ног – признак также ранее не отмечавшийся у Milnesiidae. К сожалению, изученный экземпляр имеет поврежденную ротовую трубку, что препятствует корректному морфометрическому сравнению с другими видами рода. Не исключено, что мы имеем дело с новым для науки видом.

ЛИТЕРАТУРА

- Бисеров В.И. 1996.** *Macrobiotus lorenae* sp. n., новый вид тихоходок (Eutardigrada Macrobiotidae) с Дальнего Востока России. *Arthropoda Selecta*, 5(1/2): 145–149.
- Бисеров В.И. 1998** Тихоходки (Tardigrada) морей России. *Зоологический журнал*, 77: 486–488.
- Дудичев А.Л., Бисеров В.И. 2000.** Тихоходки (Tardigrada) островов Итуруп и Парамушир Курильской гряды. *Зоологический журнал*, 79(7): 771–778.
- Киося Е.А. 2017.** Современные методы фаунистических исследований наземных тихоходок (Tardigrada). *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University*, 29: 59–70.
- Abe W. 2004.** A New Species of the Genus *Hypsibius* (Tardigrada: Parachela: Hypsibiidae) from Sakhalin Island, Far East Russia. *Zoological science*, 21: 957–962.
- Bartels P.J., Apodaca J.J., Mora C., Nelson D.R. 2016.** A global biodiversity estimate of a poorly known taxon: phylum Tardigrada. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(4): 730–736.
- Biserov V.I. 1991.** An annotated List of Tardigrada from European Russia. *Zoologische Jahrbücher Abteilung für Systematik*, 118: 193–216.
- Biserov V.I. 1998.** The Tardigrada of the Komandorskiye Islands, with a description of *Dactylobiotus dervizi* sp. n. (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Entomologische Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Hamburg*, 12: 327–336.
- Degma P., Bertolani R., Guidetti R. 2009-2020.** *Actual checklist of Tardigrada species* (2009–2020, 39th Edition: 7-12-2020). Available at: <http://www.evozo.unimore.it/site/home/documento1080026927.html>
- Guil N., Cabrero-Sañudo F. 2007.** Analysis of the species description process of a little known invertebrate group: the limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada). *Biodiversity and Conservation*, 16: 1063–1086.
- 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.
- Michalczyk L., Kaczmarek L. 2013.** The Tardigrada Register: a comprehensive online data repository for tardigrade taxonomy. *Journal of Limnology*, 72(1s): 175–181.
- Michalczyk, L., We Inicz, W., Frohme, M., Kaczmarek, L. 2012.** Redescriptions of three *Milnesium* Doyere, 1840 taxa (Tardigrada: Eutardigrada: Milnesiidae), including the nominal species for the genus. *Zootaxa*, 3154, 1–20.

- Morek W., Michalczyk L. 2020.** First extensive multilocus phylogeny of the genus *Milnesium* (Tardigrada) reveals no congruence between genetic markers and morphological traits. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 3(188): 681–693.
- Morek W., Stec D., Gąsiorek P., Surmacz B., Michalczyk L. 2019a.** *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840: The first integrative study of interpopulation variability in a tardigrade species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 57:1–23.
- Morek W., Suzuki A.C., Schill R.O., Georgiev D., Yankova M., Marley N.J., Michalczyk L. 2019b.** Redescription of *Milnesium alpigenum* Ehrenberg, 1853 (Tardigrada: Apochela) and a description of *Milnesium inceptum* sp. nov., a tardigrade laboratory model. *Zootaxa*, 4586(1): 35–64.
- Nelson D.R., Bartels P.J., Guil N. 2018.** Tardigrade Ecology. In: Schill R.O. (Ed.) *Water Bears: The Biology of Tardigrades. Zoological Monographs*, vol 2. Cham: Springer. P. 163–210.
- Pilato G. 1981.** Analisi di nuovi caratteri nello studio degli Eutardigradi. *Animalia*, 8: 51–57.
- Pilato G., Binda M.G. 2010.** Definition of families, subfamilies, genera and subgenera of the Eutardigrada, and keys to their identification. *Zootaxa*, 2404: 1–54.
- Stec D., Smolak R., Kaczmarek L., Michalczyk L. 2015.** An integrative description of *Macrobotus paulinae* sp. nov. (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobotidae: hufelandi group) from Kenya. *Zootaxa*, 4052(2): 501–526.
- Sugiura K., Minato H., Matsumoto M., Suzuki A.C. 2020.** *Milnesium* (Tardigrada: Apochela) in Japan: The First Confirmed Record of *Milnesium tardigradum* s.s. and Description of *Milnesium pacificum* sp. nov. *Zoological Science*, 37(5): 476–495.
- Tchesunov A.V., Mokievsky V.O. 1995.** A new marine tardigrade, *Batillipes crassipes* sp. nov., from the Japan Sea (Tardigrada, Arthrotardigrada, Batillipedidae). *Cahiers de Biologie Marine*, 36: 153–257.
- Tumanov D.V. 2006.** Five new species of the genus *Milnesium* (Tardigrada, Eutardigrada, Milnesiidae). *Zootaxa*, 1122: 1–23.
- Tumanov D.V. 2020.** Integrative redescription of *Hypsibius pallidoides* Pilato et al., 2011 (Eutardigrada: Hypsibiodea) with the erection of a new genus and discussion on the phylogeny of Hypsibiidae. *European Journal of Taxonomy*, 681: 1–37.
- Tumanov D.V. 2021.** Presence of *Notahypsibius pallidoides* (Pilato et al., 2011) (Tardigrada: Hypsibiidae) in the fauna of Russia confirmed with the methods of DNA barcoding. *Biological Communications* (in press)

NEW DATA ON TARDIGRADES OF THE GENUS *MILNESIUM* (TARDIGRADA,
EUTARDIGRADA, MILNESIIDAE) FROM THE RUSSIAN FAR EAST,
OBTAINED USING THE METHOD OF MOLECULAR BARKODING

E.V. Maskin¹, P.V. Grebenkin¹, L.V. Zheleznova^{1*}, D.V. Tumanov^{2,3}

¹ Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

³ Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

*Corresponding author, E-mail: zheleznova.lv@dvfu.ru

A study of terrestrial tardigrades of the genus *Milnesium* Doyère, 1840 collected in Russky Island (Primorsky kray, Vladivostok) was carried out using the methods of integrative taxonomy, including the analysis of morphological and molecular biological data. Three species are recorded from this island, of which *M. inceptum* Morek, Suzuki, Schill, Georgiev, Yankova, Marley et Michalczyk, 2019 is new for the fauna of Russia. New data were obtained on the distribution and genetic diversity of *M. tardigradum* Doyère, 1840. The third species, *Milnesium* sp., is similar to *M. tardigradum* but differs from latter in the presence of a characteristic thickened cuticle zone at the base of the claws of the fourth pair of legs and is probably a new for science species.