

УДК 57.06

УНИКАЛЬНЫЕ ГАПЛОТИПЫ *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) В ГИПЕРСОЛЕНОМ оз. САСЫК-СИВАШ (КРЫМ)

© 2023 г. А. О. Лантушенко^а, Я. В. Мегер^{а*}, А. В. Гаджи^а, Е. В. Ануфриева^{а, б}, Н. В. Шадрин^{а, б}

^аСевастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

^бФедеральный исследовательский центр Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук, Севастополь, Россия

*e-mail: meger_yakov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.11.2022 г.

После доработки 22.03.2023 г.

Принята к публикации 14.04.2023 г.

Исследована генетическая структура популяции вида *Artemia salina* (L., 1758), из гиперсоленого оз. Сасык-Сиваш на основе фрагмента гена первой субъединицы цитохром оксидазы с COI митохондриальной ДНК. Реконструкция филогении выполнена с использованием всех имеющихся в международной базе данных GenBank (NCBI) нуклеотидных последовательностей данного гена для вида *salina*. Установлены генеалогические связи между COI гаплотипами и выявлены филогеографические паттерны. В западно-средиземноморских популяциях отмечены общие гаплотипы, что может быть следствием их расположения в едином миграционном коридоре птиц, которые, как известно, способствуют пассивному распространению покоящихся стадий артемии. Географически изолированные группы популяций из Ливии, Туниса, Египта, Кипра и Крыма характеризуются уникальными гаплотипами, в настоящее время не обнаруженными в других средиземноморских популяциях. Высказано предположение, что уникальные гаплотипы могут быть эндемичными для географически удаленных регионов.

Ключевые слова: филогенетический анализ, митохондриальная ДНК, *Artemia salina*, гаплотипы

DOI: 10.31857/S032096522305008X, **EDN:** REАНСК

ВВЕДЕНИЕ

Фауна отдельных водных экосистем, например озер, состоит как из активно распространяющихся животных (амфибионтные летающие насекомые, амфибии), так и пассивно распространяемых беспозвоночных, переносимых ветром или подвижными животными (Fontaneto, 2019; Hessen et al., 2019). При этом птицами и летающими насекомыми переносятся чаще всего покоящиеся стадии этих животных (Green et al., 2005; Frisch et al., 2007; Naceur, 2020). Изучение структуры популяций и филогеографические образцы пассивно расселяемых водных беспозвоночных показало, что, несмотря на их высокую способность к колонизации новых местообитаний в покоящихся стадиях, эти организмы часто демонстрируют неожиданно высокую степень генетической дифференциации и локального эндемизма вследствие низкого потока генов между такими популяциями (Hebert, 1998; De Meester, 2002; Hebert et al.,

2003b; Penton et al., 2004; De Gelas, De Meester, 2005; Paland et al., 2005; Ishida, Taylor, 2007). В настоящее время для таких популяций в основном рассматривается два крайних варианта филогеографической структуры. Во-первых, относительно старые популяции в плейстоценовых убежищах или вокруг них демонстрируют глубокую дивергенцию/диверсификацию генетической структуры и сильные межпопуляционные различия с высокой степенью локального эндемизма (Gómez et al., 2000, 2007; Zierold et al., 2007). Во втором случае обнаруживается незначительно дифференцированная географическая структура и пониженное генетическое разнообразие, что свидетельствует о недавнем и быстром расширении ареала в новую доступную область, либо после естественной колонизации, часто послеледниковой, или после интродукции человеком (Weider et al., 1999; Mergaey et al., 2005; Ishida, Taylor, 2007). Сочетание обоих вариантов может быть обнаружено у одного и того же вида в зависимости от возраста его локальных популяций по всему ареалу (Ishida, Taylor, 2007). Для понимания закономерностей

Сокращения: COI – первая субъединица цитохромоксидазы с, H – гаплотип.

формирования филогеографических образцов вида необходимы данные о молекулярно-генетической структуре его локальных популяций на различных пространственных масштабах (Gómez et al., 2002; Adamowicz et al., 2005, 2007).

Удобными модельными объектами для филогеографических исследований являются виды рода *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca), широко распространенные в мире, играющие важную роль в функционировании экосистем гиперсоленых водоемов и имеющие большую коммерческую ценность (Sanchez et al., 2016; Marden et al., 2020; Van Stappen et al., 2020). В водоемах Крыма при соленостях >100 г/л артемии часто доминируют и достигают весьма высокой численности в гиперсоленых озерах и лагуне Сиваш – >75 тыс. экз./м³ (Балушкина и др., 2009; Anufrieva et al., 2022). Они играют ключевую роль в пищевых сетях этих водоемов, питаются фитопланктоном, и служат пищей для различных беспозвоночных и водных птиц (Sanchez et al., 2016; Marden et al., 2020). Как организмы-фильтраторы виды рода *Artemia* участвуют в образовании лечебных грязей (Балушкина и др., 2009) и очищении воды от ртути (Shadrin et al., 2022).

В настоящее время в мире наряду с партеногенетическими популяциями признано существование пяти валидных видов двуполых артемий: *A. salina* (L., 1758), *A. urmiana* Günther, 1890, *A. monica* Verrill, 1869 (= *A. franciscana* Kellogg, 1906) и *A. sinica* Cai, 1989, *A. persimilis* Piccinelli and Prosdocimi, 1968 (Sainz-Escudero et al., 2021). В Крыму, крупнейшем п-ве Черного моря, в многочисленных гиперсоленых водоемах отмечено существование четырех двуполых видов (*A. salina*, *A. urmiana*, *A. monica* и *A. sinica*) и множество разноплоидных партеногенетических популяций *Artemia* (Shadrin, Anufrieva, 2017; Lantushenko et al., 2022). *Artemia salina* – аборигенный вид Средиземноморско-Черноморского региона, характеризующийся высоким локальным генетическим разнообразием (Munoz et al., 2008). Вселение *A. monica* (= *A. franciscana*) в гиперсоленые водоемы этого региона ведет к исчезновению локальных популяций *A. salina* и, следовательно, к снижению генетического разнообразия вида (Munoz et al., 2008). Разнообразии гаплотипов в крымских популяциях *A. salina* ранее не изучали.

Цель работы – дать анализ гаплотипического разнообразия и оценить уровень его уникальности в популяции *A. salina* из оз. Сасык-Сиваш, крупнейшего гиперсоленого озера Крыма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В Крыму зарегистрировано >50 гиперсоленых озер, оз. Сасык-Сиваш (45°09'10" с.ш., 33°31'04" в.д.) – крупнейшее среди них (Shadrin et al.,

2022). Площадь озера 75.3 км². Озеро мелководное (глубина ≤1.5 м), полимиксное, характеризуется высокой сезонной и многолетней изменчивостью различных характеристик. В настоящее время озеро разделено на две части – с низкой и высокой соленостью. В период наблюдений (2016–2022 гг.) соленость в гиперсоленой части озера колебалась от 220 до 350 г/л (Shadrin et al., 2022), средняя соленость была ~280 г/л.

В июле 2021 г. в оз. Сасык-Сиваш собраны взрослые особи *A. salina*, плотность популяции рачков достигала 220 экз./м³ при солености 245 г/л и температуре ~35°C. Пробы отбирали путем фильтрации воды через малую планктонную сеть Джеди с размером ячеек газа 50 мкм. Живых рачков доставляли в лабораторию для дальнейшего анализа. Одновременно с взятием проб в озере измеряли соленость и температуру воды с помощью портативного рефрактометра WZ212 (Kellong Electron Co. Ltd., Фуань, Китай) и электронного pH-метра РНН-830 (OMEGA Engineering Inc., Норуолк, США) соответственно.

Тотальную ДНК выделяли с помощью набора ДНК-Экстран 2 (Синтол, Россия) согласно инструкции производителя. Качество выделенных продуктов оценивали на нанофотометре Implen N60 (Germany) и с помощью электрофореза на 1.5%-ном агарозном геле. Фрагмент маркерного митохондриального гена COI амплифицировали с помощью ПЦР набора Screen-Mix (Eurogen, Россия) в объеме 25 мкл с использованием двух праймеров 2COI_Fol-F (5'-ATTCTACGAATCACAAGGATATTGG-3') и 2COI_Fol-R (5'-TACACTTCAGGATGGCCAAA) (Munoz, 2008). Протокол амплификации включал следующие стадии: предварительная денатурация 5 мин – 95°C, 34 цикла амплификации 30 с – 95°C, 30 с – 48°C, 45 с – 72°C и финальная элонгация 5 мин – 72°C. Очистку от остаточных продуктов ПЦР-смеси осуществляли методом сорбционной экстракции ДНК набором Colgen (Синтол, Россия). Для проверки однородности размерного состава амплифицированных фрагментов проводили визуализацию с помощью электрофореза на 1.5%-ном агарозном геле, концентрацию полученного продукта контролировали спектрофотометрически на нанофотометре Implen N60. При секвенировании использовали набор реагентов Big Dye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, США), визуализацию продуктов секвенирования осуществляли при помощи капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Синтол, Россия) в Центре коллективного пользования “Молекулярная структура вещества” Севастопольского гос. университета. Всего получено и проанализировано восемь нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI мтДНК длиной 559 пн.

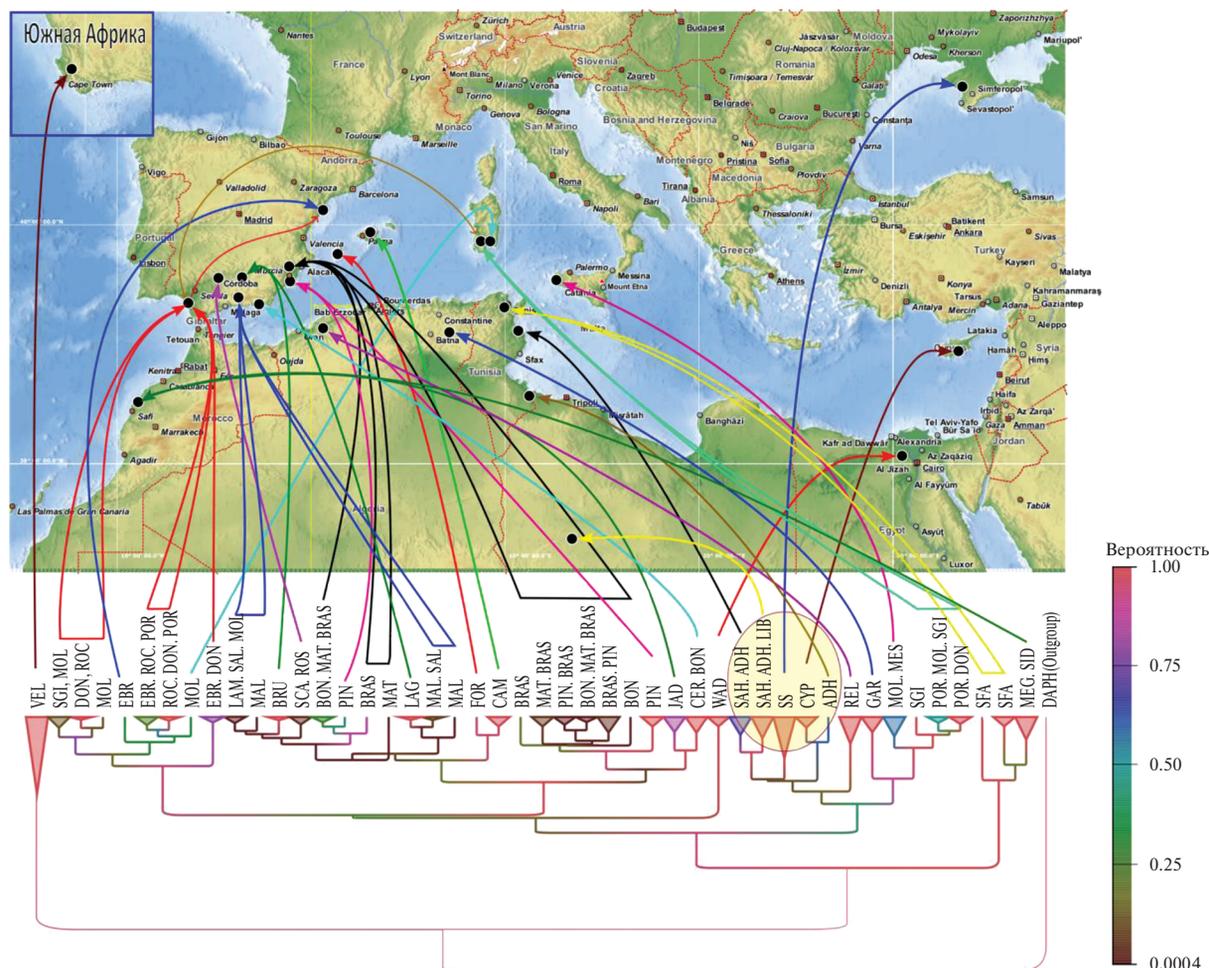


Рис. 1. Карта ареала обитания *A. salina* и филогенетическое дерево вида. Дерево построено с помощью байесовских методов в MrBayes v.3.2: цветом выделена клада, сформированная уникальными гаплотипами из различных популяций; на цветовой шкале отображена поддержка узлов. ● — анализируемые популяции (всего 38).

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей проводили вручную в программе Bioedit v.7.2.5 (Hall et al., 2011). В дополнение к полученным оригинальным данным в анализ включали все последовательности гена COI *A. salina*, доступные в международной базе данных GenBank (NCBI), общее число последовательностей длиной 559 пн – 115 (табл. 1). Выравнивание проводили в программе Mega-X (Kumar, 2018) с помощью алгоритма MUSCLE, гаплотипический анализ – в DnaSP6 (Rozas, 2017). Гаплотипическую сеть реконструировали методом TCS (Templeton, Crandall and Sing, 1992) в программе PopART v.1.7 (Leigh, Bryant, 2015). Карту географического распространения гаплотипов составляли на основе координат, соответствующих исследованным популяциям. Филогенетический анализ для *A. salina* проводили с помощью байесовских методов в MrBayes v.3.2 (Ronquist, 2012). Он включал 10 млн итераций, 25% первых исключали из дальнейшего анализа. Топологию резуль-

тирующего дерева выбирали по лучшей достоверности клад, длину ветвей вычисляли по средним значениям параметров промежуточных деревьев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованной популяции *A. salina* обнаружено четыре гаплотипа Н1-Н4 (табл. 1, рис. 1). Один из выделенных гаплотипов был найден у пяти особей, три остальных – единожды. Важно отметить, что все четыре гаплотипа отмечены только в популяции из оз. Сасык-Сиваш, следовательно, их можно считать уникальными, и, возможно, эндемичными для п-ова Крым.

Всего для вида *A. salina* выявлено 76 гаплотипов (табл. 1), 16 из них – общие для разных популяций, 60 – уникальные, встречающиеся только в одной популяции. Популяционно-генетические параметры свидетельствуют о достаточно высоком разнообразии гаплотипов у *A. salina* (табл. 2). Для обитающих в Европе особей инвазивного вида

Таблица 1. Гаплотипы (H) *Artemia salina*, найденные в разных частях ареала и проанализированные в данной работе

Гаплотип— число особей	Сокращенное название популяции	Географическое расположение	Номера в ГенБанке (NCBI)	Литературный источник
H1–5	SS	оз. Сасык-Сиваш, Крым	OQ376365 ON872209 OP753708 ON872211 ON872210	Данные авторов
H2–1	SS	То же	ON872208	То же
H3–1	SS	»	ON872206	»
H4–1	SS	»	ON872207	»
H5–6	BON, BRAS, MAT, PIN	Испания	DQ426827, DQ426836, DQ426851	Munoz et al., 2008
H6–1	MAT	То же	DQ426828	То же
H7–1	MAT	»	DQ426829	»
H8–1	BON, BRAS, MAT	»	DQ426830	»
H9–6	DON, EBR, ROC, POR, MOL, SGI	Испания, Италия	DQ426831, DQ426832, DQ426853, DQ426857, EU543475, EU543477	»
H10–1	DON, POR, ROC	Испания	DQ426833	»
H11–2	DON, POR	То же	DQ426834, DQ426856	»
H12–1	BRAS	»	DQ426835	»
H13–1	BRAS	»	DQ426837	»
H14–1	BRAS	»	DQ426838	»
H15–1	BRAS	»	DQ426839	»
H16–1	BRAS	»	DQ426840	»
H17–1	PIN	»	DQ426841	»
H18–1	PIN	»	DQ426842	»
H19–1	PIN	»	DQ426843	»
H20–1	PIN	»	DQ426844	»
H21–1	PIN	»	DQ426845	»
H22–1	PIN	»	DQ426846	»
H23–1	CER	»	DQ426847	»
H24–1	CER	»	DQ426848	»
H25–1	CER	»	DQ426849	»
H26–1	BON, CER	»	DQ426850	»
H27–1	POR	»	DQ426854	»
H28–1	MOL, POR, SGI	Испания, Италия	DQ426855	»
H29–1	EBR	Испания	DQ426858	»
H30–1	ROS	То же	EU543444	»
H31–7	SCA, MAL, LAM, SAL	»	EU543445, EU543446, EU543449, OM486989, OM486990, OM486995, OM486996	Sainz-Escudero et al., 2022
H32–1	MAL	»	EU543447	Munoz et al., 2008
H33–1	MAL	»	EU543448	То же
H34–5	CAM, SAL, SNT	»	EU543450, OM486997, OM486998, OM486999, OM487000	Sainz-Escudero et al., 2022, Eimanifar et al., 2014
H35–1	CAM	»	EU543451	Munoz et al., 2008
H36–1	JAD	Марокко	EU543452	То же

Таблица 1. Окончание

Гаплотип— число особей	Сокращенное название популяции	Географическое расположение	Номера в ГенБанке (NCBI)	Литературный источник
H37—1	JAD	То же	EU543453	»
H38—6	JAD, MEG	Марокко, Тунис	EU543454, KF691509, KF691510, KF691511, KF691512, KF691513	Munoz et al., 2008, Eimanifar et al., 2014
H39—1	JAD	Марокко	EU543455	Munoz et al., 2008
H40—2	ADH, SAH	Тунис	EU543456, EU543458	То же
H41—2	ADH, LIB	Тунис, Ливия	EU543457, EU543460	»
H42—1	ADH	Тунис	EU543459	»
H43—1	ADH	То же	EU543461	»
H44—1	ADH	»	EU543462	»
H45—1	LIB, SAH	»	EU543463	»
H46—1	LIB, SAH	»	EU543464	»
H47—1	SAH	»	EU543466	»
H48—1	GAR	Алжир	EU543467	»
H49—2	GAR, REL	То же	EU543468, KF691135	Munoz et al., 2008, Sainz- Escudero et al., 2022
H50—1	GAR	»	EU543469	Munoz et al., 2008
H51—1	WAD	Египет	EU543470	То же
H52—1	WAD	То же	EU543471	»
H53—1	LIB	Тунис	EU543472	»
H54—2	CYP, LAR	Кипр	EU543473, OM486981	Munoz et al., 2008, Sainz- Escudero et al., 2022)
H55—1	SGI	Италия	EU543474	Munoz et al., 2008
H56—1	SGI	То же	EU543476	То же
H57—1	MOL	»	EU543478	»
H58—1	MOL	»	EU543479	»
H59—1	MES	»	EU543480	»
H60—1	MES	»	EU543481	»
H61—1	VEL	Южная Африка	EU543482	»
H62—1	VEL	То же	EU543483	»
H63—1	VEL	»	EU543484	»
H64—1	VEL	»	EU543485	»
H65—1*	DAPH	—	HQ972028	—
H66—2	REL	Алжир	KF691133, KF691134	Eimanifar et al., 2014
H67—1	REL	То же	KF691136	То же
H68—1	MEG	Тунис	KF691514	»
H69—4	SFA	То же	KF691515, KF691517, KF691518, KF691519	»
H70—1	SFA	»	KF691516	»
H71—1	LAR	Кипр	OM486980	Sainz-Escudero et al., 2022
H72—3	SID	Марокко	OM486982, OM486984, OM486985	То же
H73—1	SID	То же	OM486983	»
H74—1	FOR	Испания	OM486988	»
H75—2	BRU	То же	OM486991, OM486992	»
H76—2	LAG	»	OM486993, OM486994	»

Примечание. * — нуклеотидная последовательность использовалась в качестве внешней группы; “—” данные отсутствуют.

Таблица 2. Популяционно-генетические параметры исследованных *A. salina*

<i>N</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>H_d</i>	π	<i>k</i>	<i>M</i>
135	109	76	0.982	0.01868	9.6	115

Примечание. *h* – число гаплотипов, *H_d* – гаплотипическое разнообразие, *k* – среднее число нуклеотидных различий на популяцию, *M* – общее число нуклеотидных замен, *N* – число образцов, π – нуклеотидное разнообразие, *S* – число вариабельных сайтов.

A. franciscana характерны более низкие значения гаплотипического разнообразия *H_d* (0.54) (Eimanifar, 2014), чем для *A. salina* (0.98) (табл. 2). Для коренных обитателей Евразии также отмечены более высокие значения *H_d*: *A. sinica* – 0.86, *A. urmiana* – 0.90, *A. tibetiana* – 0.98 (Eimanifar, 2014). Можно предположить, что найденные уникальные гаплотипы *A. salina* будут обнаружены и в других популяциях вида из гиперсоленых водоемов п-ова Крым. Не вызывает сомнений, что при дальнейших более масштабных исследованиях разнообразие гаплотипов существенно увеличится.

На рис. 1 дана карта ареала обитания *A. salina* с указанием мест расположения 37 различных локальных популяций, данные по которым приведены в табл. 1. Исследованные в нашей работе особи из двупольных популяций оз. Сасык-Сиваш образовали общую кладу с *A. salina* из Туниса, Ливии и Кипра (рис. 1: выделенная область на филогенетическом дереве). Анализ данных позволил

выделить в структуре гаплотипической сети группу, в которую входят уникальные гаплотипы *A. salina* из Ливии, Туниса, Египта, Кипра и Крыма, не обнаруженные в западной части средиземноморского региона (рис. 2: пунктирная область). Возможно, места обитания этих уникальных популяций можно отнести к плейстоценовым рефугиумам.

Выделенная группа популяций характеризуется уникальным генетическим разнообразием. Следует отметить, что западно-средиземноморские популяции с множеством общих гаплотипов находятся в одном миграционном коридоре птиц. Можно считать, что между популяциями существует регулярный обмен генами за счет транспортировки цист мигрирующими птицами (Green et al., 2005). Ранее было убедительно показано, что структура миграционных путей птиц – важный фактор, определяющий филогеографию *Artemia* (Munoz et al., 2013). Подобное предположение было сделано и для другого вида ракообразных (копеподы *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885)), также имеющего покоящиеся яйца и широко распространенного в Средиземноморско-Черноморском регионе (Anufrieva, Shadrin, 2015).

Появление инвазивных видов *Artemia*, в первую очередь *A. monica* (= *A. franciscana*), может повлечь за собой сокращение крымского ареала *A. salina* и, следовательно, быстрое и значительное снижение генетического разнообразия. Важно отметить, что высокой адаптируемости *A. monica* (возможно, и других видов *Artemia*) в новых условиях обитания способствует наличие различ-

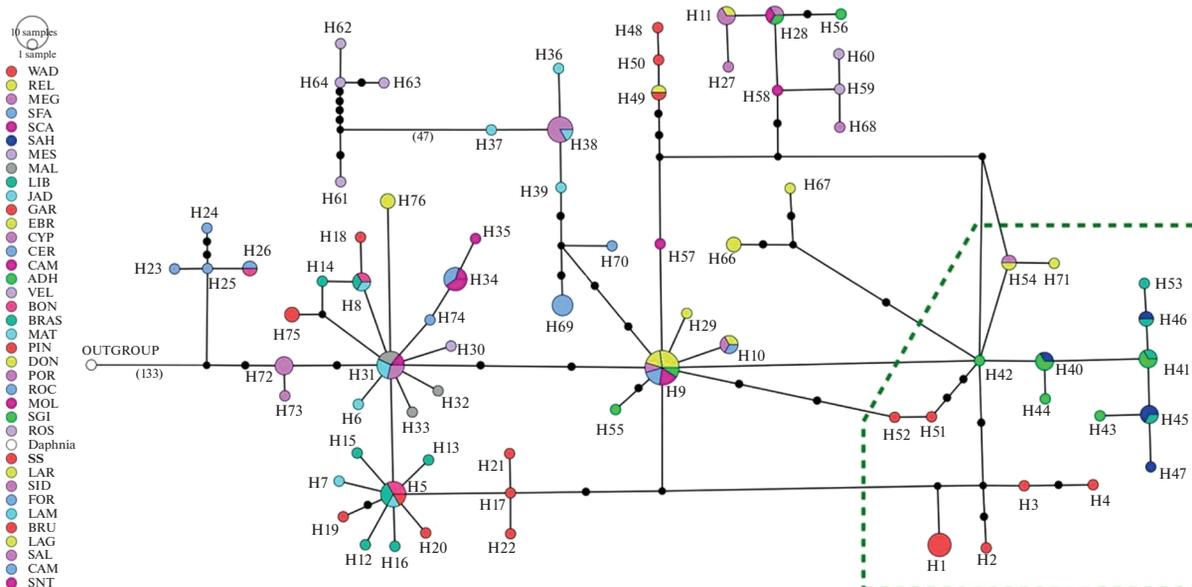


Рис. 2. Генеалогические связи между COI гаплотипами из популяций *A. salina* (TCS сеть). Пунктирной линией выделены уникальные гаплотипы из Ливии, Туниса, Египта, Кипра и Крыма. Черные точки – число мутаций; в скобках – число нуклеотидных замен. Жирным курсивом указана популяция озера Сасык-Сиваш (SS).

ных альтернативных паттернов экспрессии генов (De Vos et al., 2021; Lee et al., 2022). Таким образом, наличие альтернативных вариантов реализации генотипа обеспечивает возможность перехода в новых условиях от одних гомеостатических стратегий к другим, что может повышать инвазивность и адаптацию вида к новым местам обитаниям. Однако, исходя из большого разнообразия и временной изменчивости гиперсоленых водоемов в Крыму, высокой адаптивной способности видов *Artemia* и наличие у них цист, можно с высокой степенью вероятности предположить, что все четыре двуполовых вида *Artemia* будут устойчиво сосуществовать с партеногенетическими популяциями в Крыму, сменяя друг друга. Будет ли при этом снижаться генетическое разнообразие аборигенных популяций *A. salina*, смогут показать лишь дальнейшие многолетние исследования.

Выводы. Изучение филогенетических связей и филогеографической структуры популяций *A. salina*, проведенное по митохондриальному маркерному гену COI, позволило выделить две разнородные группы популяций. Для западно-средиземноморских популяций характерно наличие множества общих гаплотипов, что может быть обусловлено их расположением в одном миграционном коридоре птиц. Географически изолированные группы популяций из Ливии, Туниса, Египта, Кипра и Крыма характеризуются уникальными гаплотипами, не встречающимися в западной части средиземноморского региона. В крымской популяции артемии зарегистрированы уникальные, предположительно эндемичные для Крыма, гаплотипы. Появление инвазионных видов *Artemia*, в первую очередь *A. monica* (= *A. franciscana*), может повлечь за собой быстрое сокращение крымского ареала *A. salina* и вызванное этим значительное снижение генетического разнообразия вида.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Генетические исследования проведены в рамках программы “Приоритет – 2030” Севастопольского гос. университета (стратегический проект № 3, № 121121700318-1). Полевые исследования оз. Сасык-Сиваш выполнены в рамках Госзадания Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН № 121041500203-3 “Изучение особенностей структуры и динамики экосистем соленых озер и лагун в условиях климатической изменчивости и антропогенной нагрузки для создания научных основ их рационального использования”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Балушкина Е.В., Голубков С.М., Голубков М.С. и др. 2009. Влияние абиотических и биотических факторов на структурно-функциональную организацию

экосистем соленых озер Крыма // Журн. общ. биол. Т. 70. № 6. С. 504.

- Adamowicz S.J., Purvis A. 2005. How many branchiopod crustacean species are there? Quantifying the components of underestimation // *Global Ecol. Biogeogr.* V. 14. P. 455.
https://doi.org/10.1111/j.1466-822X.2005.00164.x
- Adamowicz S.J., Menu-Marque S., Hebert P.D., Purvis A. 2007. Molecular systematics and patterns of morphological evolution in the Centropagidae (Copepoda: Calanoida) of Argentina // *Biol. J. Linnean Soc.* V. 90. P. 279.
https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00723.x
- Anufrieva E.V., Shadrin N.V. 2015. Morphometric variability of Arctodiaptomussalinus (Copepoda) in the Mediterranean-Black Sea region // *Zool. Res.* V. 18. № 36(6). P. 328.
- Anufrieva E., Kolesnikova E., Revkova T. et al. 2022. Human-Induced Sharp Salinity Changes in the World's Largest Hypersaline Lagoon Bay Sivash (Crimea) and Their Effects on the Ecosystem // *Water.* V. 14 (3)403.
https://doi.org/10.3390/w14030403
- De Gelas K., De Meester L. 2005. Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe // *Mol. Ecol.* V. 14. P. 753.
https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02434.x
- De Meester L., Gómez A., Okamura B., Schwenk K. 2002. The Monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms // *Acta Oecologica.* V. 23. P. 121.
https://doi.org/10.1016/S1146-609X(02)01145-1
- De Vos S., Rombauts S., Coussement L. et al. 2021. The genome of the extremophile *Artemia* provides insight into strategies to cope with extreme environments // *BMC Genom.* V. 22 (1). P. 1. https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-021-07937-z
- Eimanifar A., Van Stappen G., Marden B., Wink M. 2014. *Artemia* biodiversity in Asia with the focus on the phylogeography of the introduced American species *Artemia franciscana* Kellogg, 1906. // *Mol. Phylogen. and Evol.* V. 79. P. 392.
https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.06.027
- Frisch D., Green A.J., Figuerola J. 2007. High dispersal capacity of a broad spectrum of aquatic invertebrates via waterbirds // *Aquat. Sci.* V. 69(4). P. 568.
https://doi.org/10.1007/s00027-007-0915-0
- Fontaneto D. 2019. Long-distance passive dispersal in microscopic aquatic animals // *Mol. Ecol.* V. 7. P. 10.
https://doi.org/10.1186/s40462-019-0155-7
- Green A.J., Sánchez M.I., Amat F. et al. 2005. Dispersal of invasive and native brine shrimps *Artemia* (Anostraca) via waterbirds // *Limnol., Oceanogr.* V. 50. P. 737.
- Gómez A., Carvalho G.R., Lunt D.H. 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankton: mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks // *Proc. Royal Soc. Series B.* V. 267. P. 2189.
https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.2.0737
- Gómez A., Serra M., Carvalho G.R., Lunt D.H. 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera) // *Evolution.* V. 56. P. 1431.
https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01455.x

- Gómez A., Montero-Pau J., Lunt D.H. et al. 2007. Persistent genetic signatures of colonization in *Brachionus manjavacas* rotifers in the Iberian Peninsula // *Mol. Ecol.* V. 16. P. 3228.
https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03372.x
- Hebert P.D. 1998. Variable environments and evolutionary diversification in inland waters // *Adv. Mol. Ecol.* P. 267.
- Hebert P.D., Witt J.D., Adamowicz S.J. 2003. Phylogeographical patterning in *Daphnia ambigua*: Regional divergence and intercontinental cohesion // *Limnol., Oceanogr.* V. 48. P. 261.
https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.1.0261
- Hessen D.O., Jensen T.C., Walseng B. 2019. Zooplankton diversity and dispersal by birds; insights from different geographical scales // *Frontiers in Ecol. and Evol.* V. 20. P. 7.
https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00074
- Hall T., Biosciences I., Carlsbad C. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology // *GERF Bull Biosci.* V. 2(1) P. 60.
- Ishida S., Taylor D.J. 2007. Mature habitats associated with genetic divergence despite strong dispersal ability in an arthropod // *BMC Evol. Biol.* V. 7. P. 52.
https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-52
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. 2018. MEGAX: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* V. 35(6). P. 1547.
https://doi.org/10.1093/molbev/msy096
- Lantushenko A., Meger Y., Gadzhi A. et al. 2022. *Artemia* spp. (Crustacea, Anostraca) in Crimea: New Molecular Genetic Results and New Questions without Answers // *Water.* V. 14(17). P. 2617.
https://doi.org/10.3390/w14172617
- Le J., Cho B.C., Park J.S. 2022. Transcriptomic analysis of brine shrimp *Artemia franciscana* across a wide range of salinities // *Mar. Genom.* V. 61: 100919.
https://doi.org/10.1016/j.margen.2021.100919
- Leigh J.W., Bryant D. 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction // *Meth. Ecol. and Evol.* V. 6. № 9. P. 1110.
https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410
- Marden B., Brown P., Bosteels T. 2020. Great Salt Lake *Artemia*: ecosystem functions and services with a global reach // *Great Salt Lake Biol.* P. 175.
https://doi.org/10.1080/10454438.2018.1484838
- Mergeay J., Verschuren D., De Meester L. 2005. Cryptic invasion and dispersal of an American *Daphnia* in East Africa // *Limnol., Oceanogr.* V. 50. P. 1278.
https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.4.1278
- Munoz J., Gomez A., Green A.J. et al. 2008. Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) // *Mol. Ecol.* V. 17(13). P. 3160.
https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03818.x
- Muñoz J., Amat F., Green A.J. et al. 2013. Bird migratory flyways influence the phylogeography of the invasive brine shrimp *Artemia franciscana* in its native American range // *Peer J.* V. 1. P. 200.
https://doi.org/10.7717/peerj.200
- Naceur H.B., Romdhan M.S., Stappen G.V. 2020. Potential Use of fatty acid profile for *Artemia* spp. discrimination // *Inland Water Biol.* V. 13. № 3. P. 434.
https://doi.org/10.1134/S199508292003013X
- Paland S., Colbourne J.K., Lynch M. 2005. Evolutionary history of contagious asexuality in *Daphnia pulex* // *Evolution.* V. 59. P. 800.
https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01754.x
- Penton E.H., Hebert P.D., Crease T.J. 2004. Mitochondrial DNA variation in North American populations of *Daphnia obtusa*: continentalism or cryptic endemism? // *Mol. Ecol.* V. 13. P. 97.
https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02024.x
- Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P. et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Syst. Biol.* V. 61. P. 539.
https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029
- Rozas J. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets // *Mol. Biol. Evol.* V. 34. P. 3299.
https://doi.org/10.1093/molbev/msx248
- Sainz-Escudero L., López-Estrada E.K., Rodríguez-Flores P.C., García-París M. 2021. Settling taxonomic and nomenclatural problems in brine shrimps, *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca), by integrating mitogenomics, marker discordances and nomenclature rules // *Peer J.* V. 9. P. 10865.
https://doi.org/10.7717/peerj.10865
- Sainz-Escudero L., López-Estrada E.K., Rodríguez-Flores P.C., García-París M. 2022. Brine shrimps adrift: Historical species turnover in Western Mediterranean *Artemia* (Anostraca) // *Biol. Invasions.* V. 24. P. 2477.
https://doi.org/10.1007/s10530-022-02779-6
- Sanchez M.I., Paredes I., Lebouvier M., Green A.J. 2016. Functional role of native and invasive filter-feeders, and the effect of parasites: learning from hypersaline ecosystems // *PLoS One.* V. 11(8). e0161478.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161478
- Shadrin N., Stetsiuk A., Anufrieva E. 2022. Differences in mercury concentrations in water and hydrobionts of the Crimean saline lakes: does only salinity matter? // *Water.* V. 14(17): e2613.
https://doi.org/10.3390/w14172613
- Templeton A., Crandall K., Sing C. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequencedata. III. Cladogram estimation // *Genetics.* № 132. P. 619.
https://doi.org/10.1093/genetics/132.2.619
- Van Stappen G., Sui L., Hoa V.N. et al. 2020. Review on integrated production of the brine shrimp *Artemia* in solar salt ponds // *Rev. Aquac.* V. 12. P. 1054.
https://doi.org/10.1111/raq.12371
- Weider L.J., Hobaek A., Hebert P.D., Crease T.J. 1999. Holarctic phylogeography of an asexual species complex-II. Allozymic variation and clonal structure in Arctic *Daphnia* // *Mol. Ecol.* V. 8. P. 1.
https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00522.x
- Zierold T., Hanfling B., Gómez A. 2007. Recent evolution of alternative reproductive modes in the "living fossil" *Triops cancriformis* // *BMC Evol. Biol.* V. 7. P. 161.
https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-161

Unique Haplotypes of *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Hypersaline Lake Sasyk-Sivash (Crimea)

A. O. Lantushenko¹, Ya. V. Meger^{1, *}, A. V. Gadzhi¹, E. V. Anufrieva^{1, 2}, and N. V. Shadrin^{1, 2}

¹Sevastopol State University, Sevastopol, Russia

²Federal Research Center A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of the Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

*e-mail: meger_yakov@mail.ru

The genetic structure of the population of the *Artemia salina* (L., 1758) species from the hypersaline lake Sasyk-Sivash was studied on the basis of a fragment of the gene of the first subunit of cytochrome oxidase c (COI) of mitochondrial DNA. The phylogeny reconstruction was performed using all available nucleotide sequences of this gene for the *salina* species in the GenBank (NCBI) international database. Genealogical connections between COI haplotypes have been established and phylogeographic patterns have been revealed. Common haplotypes have been noted in Western Mediterranean populations, which may be a consequence of their location in a single migration corridor of birds, which, as is known, contribute to the passive spread of dormant stages of artemia. Geographically isolated groups of populations from Libya, Tunisia, Egypt, Cyprus and Crimea are characterized by unique haplotypes that are not currently found in other Mediterranean populations. It is suggested that unique haplotypes may be endemic to geographically remote regions.

Keywords: phylogenetic analysis, mitochondrial DNA, *Artemia salina*, haplotypes