© Ершова Е.А., 2020, Океанологические исследования, 2020, Том 48, № 1, С. 62–72

УДК 550.380 DOI: 10.29006/1564-2291.JOR-2020.48(1).4

РУТИННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧЕТЫРЕХ СИМПАТРИЧЕСКИХ ВИДОВ КАЛЯНОИДНЫХ КОПЕПОД *PSEUDOCALANUS* SPP. В АТЛАНТИЧЕСКОМ СЕКТОРЕ АРКТИКИ С ПОМОЩЬЮ ВИДО-СПЕЦИФИЧНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Ершова Е.А.

Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, 117997, Москва, Нахимовский проспект, д. 36, e–mail: eershowa@gmail.com
Тихоокеанский океанологический институт (ТОИ), Дальневосточного отделения Российской Академии наук (ДВО РАН), 690041, Владивосток, Балтийская улица, 43
Статья поступила в редакцию 24.09.2019, одобрена к печати 23.03.2020

Каляноидные копеподы рода *Pseudocalanus* играют важную роль в планктонных сообществах арктических и субарктических морей, часто доминируя в них по численности и составляя существенную долю биомассы зоопланктона. Несмотря на массовость и значимость *Pseudocalanus* в шельфовых планктонных сообществах, изучение биологии видов этой группы существенно затруднено крайне малыми морфологическими различиями между ними, особенно на ювенильных стадиях, на которых они фактически неразличимы. В данной работе мы описываем новый, рутинный и недорогостоящий молекулярно-генетический метод определения комплекса видов *Pseudocalanus* spp., обитающих в Атлантическом секторе Арктики: арктических *P. acuspes*, *P. minutus* и бореальных *P. moultoni* и *P. elongatus* и применяем его для предварительного описания распределения этих видов в четырех регионах Арктики и Субарктики. С помощью разработанного метода видо-специфичной полимеразной цепной реакции потенциально возможно массовое определение рачков на любой стадии развития, включая науплиев. Данный метод может служить прекрасным инструментом для изучения видо-специфичной биологии данной группы, описания их жизненных циклов, а также мониторинга изменений в арктических морских экосистемах под влиянием меняющихся климатических условий.

Ключевые слова: зоопланктон, пелагические экосистемы, копеподы, Copepoda, *Pseudocalanus*, виды-двойники, видо-специфичная полимеразная цепная реакция, Арктика

Введение

Каляноидные копеподы рода *Pseudocalanus* являются одной из самых широко распространенных и многочисленных групп в зоопланктоне бореальных и арктических морей, где они нередко доминируют по численности среди зоопланктона и могут составлять существенную долю общей биомассы (Кособокова, Перцова, 2012). Они также являются значимыми кормовыми объектами молоди сельди, мойвы и сайки (Dolgov et al., 2016), а потому играют важнейшую роль в морских пищевых цепях.

Всего род *Pseudocalanus* (Frost, 1989) представлен 7 видами, и, как правило, в одном и том же регионе одновременно встречаются несколько представителей рода. Несмотря на их массовость и значимость в шельфовых планктонных сообществах, изучение биологии видов этой группы существенно затруднено крайне малыми морфологическими различиями между ними, особенно на ювенильных стадиях, на которых они фактически неотличимы (Frost, 1989). Авторы большинства планктонных работ объединяют всех представителей рода в сборную группу *Pseudocalanus* spp., либо определяют до вида лишь взрослых самок. В последние годы, с развитием технологий молекулярной генетики, появилась возможность определения видов морских беспозвоночных по генотипу (Grabbert et al., 2010; Aarbakke et al., 2014; Bucklin et al., 2015). На основе генетических данных во многих регионах недавно были обнаружены виды, не отмеченные там ранее. Например, помимо двух известных для Арктики видов *Pseudocalanus acuspes* и *P. minutus* во фьорде Шпицбергена был обнаружен бореальный вид *P. moultoni*, заносимый туда теплыми атлантическими течениями (Aarbakke et al., 2011). Молекулярно-генетический анализ до недавнего времени оставался трудоемким и дорогостоящим методом, не позволяющим массовую количественную обработку материала. Лишь в последние годы с помощью видо-специфичных генетических маркеров стало возможным относительно быстро и недорого определять до вида особей любой стадии развития (Ershova et al., 2017).

По мере изменений климатических условий в арктических и субарктических морях, меняются и морские экосистемы (Wrona et al., 2016). Ожидается, что значимость заносимых бореальных видов в арктических водах вскоре может существенно возрасти (Ershova et al., 2015), в то время как арктические виды могут сократить свои ареалы и численность в условиях конкурентной борьбы с бореальными (Ershova et al., 2017). Видовой комплекс рода *Pseudocalanus*, состоящий из арктических видов и бореальных видов, может послужить прекрасной моделью для изучения возможного изменения состава сообществ в будущей «безледной» Арктике, но только при наличии данных о видо-специфичных характеристиках и экологических различиях между видами.

В данной работе мы описываем новый, рутинный и недорогостоящий молекулярно-генетический метод определения комплекса всех видов *Pseudocalanus* spp., отмеченных в Атлантическом секторе Арктики и Субарктики: арктических *P. acuspes*, *P. minutus* и бореальных *P. moultoni* и *P. elongatus*. С помощью видо-специфичной полимеразной цепной реакции возможно массовое определение рачков любой стадии развития, включая науплиев. Данный метод может послужить прекрасным инструментом для изучения видо-специфичной биологии данной группы, для описания их жизненных циклов, а также мониторинга изменений в Арктических морских экосистемах под влиянием меняющихся климатических условий.

Материалы и методы

Выделение ДНК

ДНК из рачков была получена с помощью упрощенного метода выделения HotShot (Montero-Pau et al., 2008). Этот метод требует минимальных затрат по времени (30 мин.) и использует недорогостоящие реагенты, легко доступные в любой лаборатории. Протокол выделения: рачки были индивидуально отобраны из спиртовых проб, помещены в каплю с дистиллированной водой на 3–5 мин., затем перенесены стерильным пинцетом в лунки 96-луночной плашки, содержащие 20 мкл Алкалинного лизисного раствора (25 мМ NaOH/ 0.2 мМ EDTA). Плашки инкубировали 30 минут при температуре 95°C в термоциклере, затем охлаждали до 4°C и в каждую лунку добавляли 20 мкл нейтрализирующего буффера (40 мМ Tris-HCl). Очищение выделенной ДНК не проводили. ДНК хранили при температуре 4°C для краткосрочного использования и при –20°C для долгосрочного хранения.

Разработка праймеров и протокола всПЦР

Таблица 1. Список используемых праймеров

Вид	Название	Длина участка (н.п.)	Последовательность
Общий (прямой)	PseudoF-mod	–	5’-TTCGAATASARYTRGGHMVRGY-3’
P. acuspes (обратный)	acuspes280R	280	5’-AGAGGAGGGTATACAGTTCACC-3’
P. minutus (обратный)	minutus480R	480	5’-CGCAAACARAGGTATTTGGTCT-3’
P. elongatus (обратный)	elongatus345R	345	5’-AGCAAAGTCTACRGACCCTC-3’
P. moultoni (прямой)	moultoni307F	–	5’-GCATGCAGGAGGTTCTGTTG-3’
P. moultoni (обратный)	moultoni520R	213	5’-ACAATATTGTAATTGCMCCAGC-3’

Комплекс видо-специфичных дегенеративных праймеров был разработан для четырех видов *P. acuspes*, *P. minutus, P. moultoni* и *P. elongatus* на основе консенсуса из 30–50 сиквенсов каждого вида, имеющихся в базе BOLD (Barcode of Life, http://www.boldsystems.org) и самостоятельно полученных по методу Сангера сиквенсов, на основе праймеров jgLCO1490/jgHCO2198 (Geller et al., 2013). Праймеры подбирали для каждого вида на участках консенсуса общих внутри вида, но различающихся между ними минимум на 2 нуклеотидные пары, таким образом, что продукт амплификации отличался для каждого вида от других на 50–150 нуклеотидных пар. Праймеры выбирали с температурой плавления, варьирующейся в пределах не более, чем на 3–4 градуса, комплекс праймеров проверяли на температурную совместимость и формирование димеров с помощью онлайн приложения Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Для каждого вида было подобрано 2–3 варианта комбинаций праймеров, отвечающих вышеперечисленным условиям. Различные комбинации разработанных праймеров для всех четырех видов тестировали с помощью выделенной ДНК от 5–10 особей каждого вида, секвенированных по Сангеру. Температурный оптимум подбирали сразу

для смеси праймеров в мультиплексной реакции. В итоге был выбран комплекс 6 праймеров, которые наиболее успешно работали в одной реакции (табл. 2). Среди них два прямых праймера (PseudoF, общий для трех видов: *P. acuspes*, *P. minutus,* и *P. elongatus* и moultoni307F, специфичный для *P. moultoni*), и 4 обратных (для каждого вида). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью готовой полимерзной смеси ToughMix (QuantaBio), содержащей оптимальные концентрации $MgCl_2$ и DNTP. Данная смесь прекрасно подходит для амплификации не очищенной ДНК, где возможно наличие солей, белков и других веществ, препятствующих ПЦР. Для экономии реагентов ПЦР реакция ставилась на минимальный объем (10 мкл) и состояла из 5 мкл полимеразной смеси, 0.5 мкл каждого праймера (10 мМ), 0.7 мкл дистиллированной воды, 0.2 мкл красителя (для дальнейшего электрофореза) и 1.5 мкл ДНК. Опытным путем был установлен следующий протокол: 5 мин 95°C; 35 циклов 40 сек 94°C, 40 сек 62°C, 50 сек 72°C, 7 мин 72°C. Полученный продукт амплификации наносили на 2% агарозный гель и определение проводили визуально по размеру фрагмента (рис. 1). Праймеры для *P. moultoni* иногда давали две полоски вместо одной (рис. 1), но, тем не менее, были хорошо отличимы от всех других видов. Для 16 особей, определенных с помощью данного метода, также были получены сиквенсы фрагмента COI в 313 н.п. с помощью платформы Illumina по методике, описанной в (Ershova et al., 2019), которые были определены до вида с помощью базы данных BOLD (http://www.boldsystems.org).

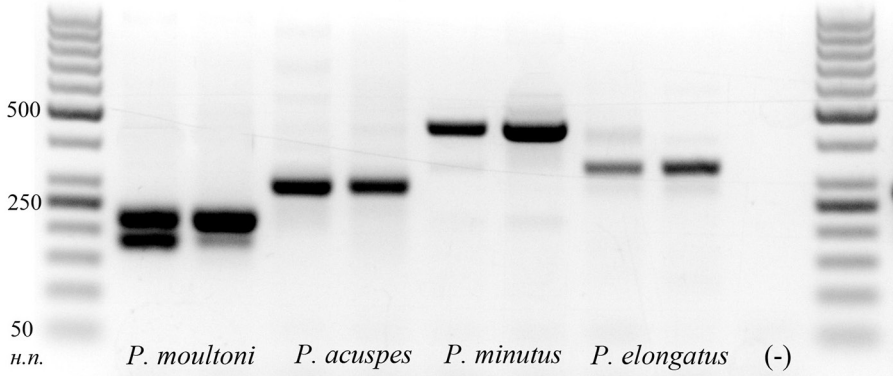

Рис. 1. Пример результатов электрофореза ДНК продуктов, полученных с помощью видоспецифичной ПЦР.

С помощью описанного протокола было проведено определение 132 особей (копеподитные стадии CV-CVI) *Pseudocalanus* spp. с четырех станций в различных регионах Арктики и Субарктики, где ранее было отмечено не более 2-х видов *Pseudocalanus* (табл. 2). В каждой партии присутствовал отрицательный и четыре положительных контроля (один для каждого вида). Для двух образцов мы получили смешанный продукт ПЦР двух длин. В данном случае, поскольку полученные полосы на агарозном геле значительно различались по яркости, определение вида проводили по наиболее яркой полосе.

Таблица 2. Список материала, использованного для тестирования протокола видо-специфичного ПЦР и результаты анализа. Жирным шрифтом выделены виды, отмеченные в данном регионе впервые

Место сбора	Дата сбора	Ранее отмеченные виды	Кол-во особей	*P. acus-pes*	*P. minu-tus*	*P. moul-toni*	*P. elon-gatus*	Не опреде-лено
Белое море, Кандалакш-ский залив	08/2018	*P. acuspes, P. minutus* (Косо-бокова и Перцо-ва, 2012)	46	13	33	0	0	0
Северное, Баренцево море	07/2018	*P. acuspes, P. minutus* (Falk-Peterson et al., 1999)	32	7	10	**13**	0	2
Биллефьорд, Шпицберген	08/2018	*P. minutus, P. moulton*i (1%) (Aarbakke et al., 2011)	32	**12**	2	16	0	2
Рамфьорд, Норвежское море	11/2018	*P. acuspes* (Barth-el et al., 1995)	32	6	**1**	**9**	**15**	1

Результаты

Из 142 реакций достаточное количество продукта амплификации для определения видов было получено для 137 особей (96%), из которых 38 были определены как *P. acuspes*, 46 как *P. minutus*, 38 как *P. moultoni* и 15 как *P. elongatus*. Две реакции на электрофорезе показали две видо-специфичные полоски одинаковой яркости, три были пустыми. Отсутствие продукта амплификации в данных реакциях может быть объяснено плохой сохранностью материала, ошибкой при выделении ДНК, мутациями на участке, комплементарном праймеру, или принадлежностью данных особей к другому виду или видам, чем те, которые учитывались нами. Видовая принадлежность 16 секвенированных особей также на 100% совпала с результатами всПЦР. Количественное соотношение между видами на четырех исследуемых станциях было резко неравномерным (рис. 2), и почти на всех станциях, за исключением Белого моря, были зафиксированы виды, не отмеченные там ранее. В Биллефьорде были представлены *P. moultoni* и *P. acuspes*, причем первый доминировал по численности; *P. minutus*, как минимум на поздних стадиях развития, был представлен всего двумя особями. В северном Баренцевом море также доминировал *P. moultoni,* но *P. acuspes* и *P. minutus* также составляли существенную долю рачков. В Белом море среди взрослых особей и старших копеподитов доминировал *P. minutus*, в то время как *P. acuspes* встречался реже, а *P. moultoni* и *P. elongatus* полностью отсутствовали. Все четыре вида были отмечены в Рамфьорде (северное Норвежское море), но доминировал там бореальный *P. elongatus*, а *P. minutus* был наиболее редким.

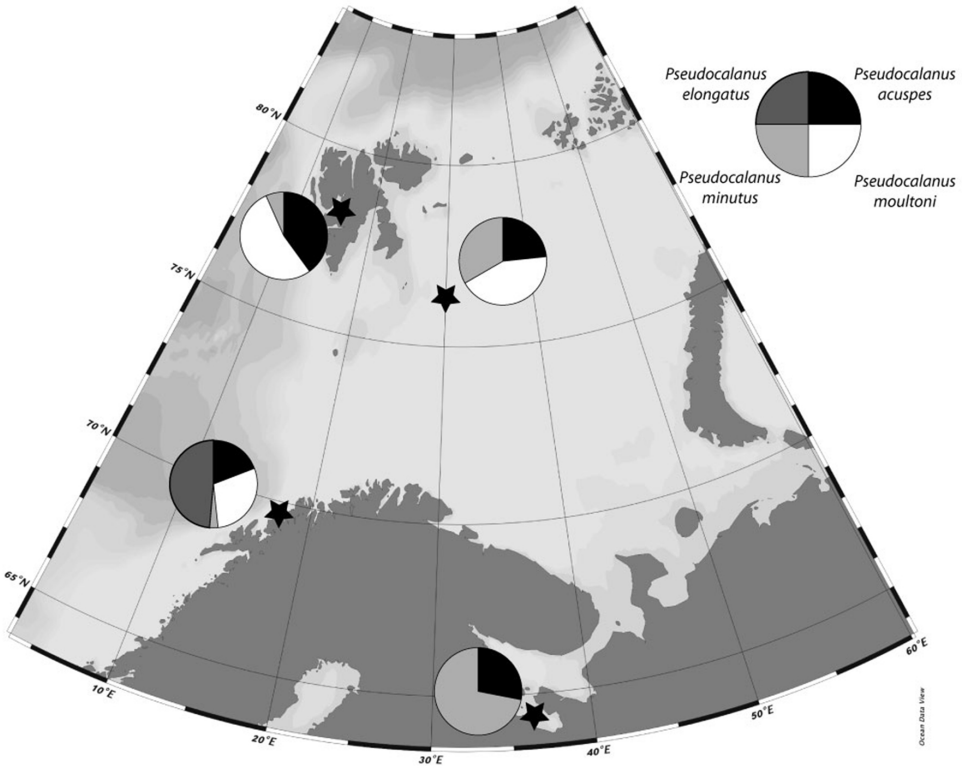

Рис. 2. Соотношение четырех видов *Pseudocalanus* spp. среди взрослых особей и старших копеподитов в четырех регионах Атлантического сектора Арктики на основе определения с помощью всПЦР.

Обсуждение

Несмотря на морфологическое сходство, виды-двойники часто значительно различаются по предпочитаемой среде обитания, жизненным циклам, продуктивности и значению для высших и низших трофических уровней. На сей день существует лишь небольшое число исследований, посвященных видоспецифичной биологии *Pseudocalanus*, но, тем не менее, все они подтверждают биогеографические и экологические различия между видами (Ершова и др., 2016; Aarbakke et al., 2017; Cleary et al., 2015; Renz et al., 2008; Ershova et al., 2017). Например, в Северном море, где совместно обитают *P. elongatus* и *P. acuspes*, первый имеет 3–4 генерации в год, в то время как второй – всего лишь одну, таким образом, внося очень неравномерный вклад во вторичную продукцию, несмотря на сопоставимую численность обоих видов (Renz et al., 2008). В Тихоокеанском секторе Арктики распределение четырех сосуществующих видов *Pseudocalanus* оказалось тесно связанным с распределением водных масс в регионе, и изучение структуры популяций этих видов показало, что, скорее всего, эти бореальные виды не могут завершить жизненный цикл в нынешних условиях в Арктике (Ershova et al., 2017).

Предварительные данные, полученные нами, также показывают неоднородность в распределении видов этого рода в разных регионах Атлантического сектора Арктики, скорее всего, также связанную с гидроло-

гическими условиями. Значительным результатом нашего исследования стало выявление присутствия бореального *P. moultoni* в высокой Арктике – в северной части Баренцева моря и во фьордах Шпицбергена, где как минимум на старших стадиях развития этот вид доминировал по численности. Несмотря на то, что *P. moultoni* был отмечен в Биллефьорде и ранее (Aarbakke et al., 2011), тогда он составил всего 1% от исследованных *Pseudocalanus*, в то время как в нашей работе этот вид доминировал в данном регионе. Наблюдаемое ускоренное таяние льдов в Арктике и усиление теплых Атлантических течений в Северном Ледовитом океане может позволить этому и другим бореальным видам расширить свой ареал на север. Предлагаемый нами метод поможет определить степень проникновения данного вида в Арктику, а также определить, является ли он там стерильным экспатриантом, как *Calanus finmarchicus*, или же он способен размножаться в арктических водах и может составить конкуренцию обитающим там *P. acuspes* и *P. minutus*. Ответы на эти вопросы невозможно получить, используя только традиционный морфологический анализ.

За последние годы было разработано несколько видо-специфичных ПЦР-протоколов, позволяющих определять до вида разные комбинации видов *Pseudocalanus* spp. В основном, это комплексы из двух видов (Bucklin et al., 2015; Aarbakke et al., 2011), но для Тихоокеанского сектора Арктики также описан протокол, позволяющий определять все 4 вида, встречающиеся в этом регионе (Ershova et al., 2017). Преимуществом описанного в данной работе протокола над разработанными ранее является возможность определения всех четырех видов, совместно обитающих в Арктических морях Атлантического сектора. Также в отличие от методов, описанных ранее, где в пробирку с ПЦР реакцией помещался весь рачок, нами предлагается выделение ДНК по упрощенному протоколу. Таким образом, это не «деструктивный» метод, и ДНК этих особей может в дальнейшем быть использовано для анализа других генов или оставлено для долгосрочного хранения. Протокол, описанный нами, является недорогостоящим (<1 у.е. на реакцию) и подходит для массовой обработки материала. Недостатком нашего и описанных ранее подобных методов является то, что видовой состав определен «априори» по добавляемым видо-специфичным праймерам, и протокол не зафиксирует наличие других видов *Pseudocalanus*, которые теоретически тоже могут наблюдаться в этих или близлежащих регионах. Оптимальным решением была бы разработка протокола, который может определить любую комбинацию из 7 видов данного рода, но такая разработка является непростой задачей, так как длина гена COI всего ~600 нуклеотидных пар, и подобрать достаточное количество видо-специфичных участков и разработать праймеры, работающие в одной ПЦР реакции, очень сложно.

Автор надеется, что описанный в данной работе метод станет важным инструментом для более точного описания планктонных сообществ Арктики и мониторинга экосистем в связи с меняющимися климатическими условиями, а также для изучения видо-специфичной биологии, экологии и жизненных стратегий этой важнейшей группы планктонных копепод.

Автор благодарит К.Н. Кособокову, Д. Юрикову, О. Воробьеву и Р. Декатё за помощь в сборе и обработке материала, К.Н. Кособокову за стилистические правки текста, а также К. Прабел и Т.В. Неретину за предоставление рабочего места для выполнения молекулярной работы. Автор также благодарит двух рецензентов за ценные советы и замечания. Работа выполнена в рамках госзадания ИО РАН 0149-2019-0008. Молекулярная обработка материала проводилась при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 18-35-00341 мол_а; сбор материала проводился при финансовой поддержке РНФ в рамках проекта № 19-17-00058.

Литература

Ершова Е.А., Кособокова К.Н., Воробьева О.В. Изменение интенсивности размножения двух видов копепод рода *Pseudocalanus* в Белом море в зависимости от температуры // Океанология. 2016. Т. 56. № 4. С. 592–598.

Кособокова К.Н., Перцова Н.М. Зоопланктон Белого моря: структура, динамика и экология сообществ // Лисицин А.П. (ред.) Система Белого моря: Природная среда водосбора Белого моря. М.: Научный мир, 2012. С. 640–675.

Aarbakke O.N.S, Bucklin A., Halsband C., Norrbin F. Comparative phylogeography and demographic history of five sibling species of *Pseudocalanus* (Copepoda: Calanoida) in the North Atlantic Ocean // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2014. Vol. 461. P. 479–488. DOI: 10.1016/j.jembe.2014.10.006.

Aarbakke O.N.S., Bucklin A., Halsband-Lenk C., Norrbin F. Discovery of *Pseudocalanus moultoni* (Frost, 1989) in Northeast Atlantic waters based on mitochondrial COI sequence variation // Journal of Plankton Research. 2011. Vol. 33. No. 10. P. 1487–1495. DOI: 10.1093/plankt/fbr057.

Aarbakke O.N.S., Fevolden S.-E., Weydmann. A. Relative summer abundances and distribution of *Pseudocalanus* spp. (Copepoda: Calanoida) adults in relation to environmental variables in the Nordic Seas and Svalbard fjords // Polar Biology. 2017. Vol. 40. No. 1. P. 51–59. DOI: 10.1007/s00300-016-1923-0.

Barthel K.-G., Noji T.T., Noji C. Zooplankton dynamics during the onset of winter in a northern Norwegian fjord. Vertical distribution and metabolic activity in relation to phytoplankton and sedimentation // Sarsia. 1995. Vol. 80. No. 1. P. 23–32. DOI: 10.1080/00364827.1995.10413575.

Bucklin A., McGillicuddy D.J.J., Wiebe P.H., Davis C.S. Habitat usage by the cryptic copepods *Pseudocalanus moultoni* and *P. newmani* on Georges Bank (Northwest Atlantic) // Continental Shelf Research. 2015. Vol. 111. No. A. P. 83–94. DOI: 10.1016/j.csr.2015.11.001.

Cleary A.C., Durbin E.G., Rynearson T.A. Feeding by *Pseudocalanus* copepods in the Bering Sea: Trophic linkages and a potential mechanism of niche partitioning // Deep Sea Research Part II. 2015. Vol. 134. P. 181–189. DOI: 10.1016/j.dsr2.2015.04.001

Dolgov A.V., Dalpadado P., Prokopchuk I.P., Orlova A.S., Gordeeva A.S., Benzik A.N. Zooplankton communities and pelagic fish diet in the Barents Sea during recent warming period // ICES/PICES 6th Zooplankton Production Symposium “New Challenges in a Changing Ocean”, 9–13 May 2016, Scandic Bergen City, Bergen, Norway. No. 70.

Ershova E.A., Hopcroft R.R., Kosobokova K.N., Matsuno K., Nelson R.J., Yamaguchi A., Eisner L. Long-term changes in summer zooplankton communities of the western Chukchi Sea, 1945–2012 // Oceanography. 2015. Vol. 28. No. 3. P. 100–115. DOI: 10.5670/oceanog.2015.60.

Ershova E.A., Questel J.M., Kosobokova K.N., Hopcroft R.R. Population structure and production of four sibling species of Pseudocalanus spp. in the Chukchi Sea // Journal of Plankton Research. 2017. Vol. 39. P. 48–64. DOI: 10.1093/plankt/fbw078.

Ershova E.A., Descoteaux R., Wangensteen O.S., Iken K., Hopcroft R.R., Smoot C., Grebmeier J., Bluhm B.A. Diversity and distribution of meroplanktonic larvae in the Pacific Arctic and connectivity with adult benthic invertebrate communities // Frontiers in Marine Science. 2019. DOI: 10.3389/fmars.2019.00490.

Falk-Petersen S., Pedersen G., Kwasniewski S., Hegseth E.N., Hop H. Spatial distribution and life-cycle timing of zooplankton in the marginal ice zone of the Barents Sea during the summer melt season in 1995 // Journal of Plankton Research. 1999. Vol. 21. No. 7. P. 1249–1264. DOI: 10.1093/plankt/21.7.1249.

Frost B.W. A taxonomy of the marine calanoid copepod genus *Pseudocalanus* // Canadian Journal of Zoology. 1989. Vol. 67. P. 525–551.

Geller J., Meyer C., Parker M., Hawk H. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys // Molecular Ecology Resources. 2013. Vol. 13. P. 851–861. DOI: 10.1111/1755-0998.12138.

Grabbert S., Renz J., Hirche H.-J., Bucklin A. Species-specific PCR discrimination of species of the calanoid copepod *Pseudocalanus*, *P. acuspes* and *P. elongatus*, in the Baltic and North Seas // Hydrobiologia. 2010. Vol. 652. P. 289–297.

Montero-Pau J., Gomez A., Munoz J. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs // Limnology and Oceanography Methods. 2008. Vol. 6. P. 218–222.

Renz J., Mengedoht D., Hirche H.-J. Reproduction, growth and secondary production of *Pseudocalanus elongatus* Boeck (Copepoda, Calanoida) in the southern North Sea // Journal of Plankton Research. 2008. Vol. 30. No. 5. P. 511–528. DOI: 10.1093/plankt/fbn016.

Wrona F.J., Johansson M., Culp J.M., Jenkins A., Mård J., Myers-Smith I.H., Prowse T.D., Vincent W.F., Wookey P.A. Transitions in Arctic ecosystems: Ecological implications of a changing hydrological regime // Journal of Geophysical Research Biogeosciences. 2016. Vol. 121. P. 650–674. DOI: 10.1002/2015JG003133.

ROUTINE IDENTIFICATION OF FOUR SYMPATRIC SPECIES OF CALANOID COPEPODS *PSEUDOCALANUS* SPP. IN THE ATLANTIC ARCTIC USING A SPECIES-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION

Ershova E.A.

Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences,
36 Nahimovskiy prospekt, Moscow, 117997, Russia, e–mail: eershowa@gmail.com
Pacific Oceanological Institute (POI), Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (FEBRAS), Vladivostok, Russia
Submitted 24.09.2019, accepted 23.03.2020

Calanoid copepods of the genus *Pseudocalanus* play an important role in the plankton communities of the Arctic and boreal seas, often dominating in numbers and constituting a significant proportion of the biomass of zooplankton. Despite their high presence and significance in the shelf plankton communities, species-specific studies of the biology of

these are significantly hampered by extremely small morphological differences between them, especially at the juvenile stages, at which they are virtually indistinguishable. In this paper, we describe a new, routine and low-cost molecular method for identifying all *Pseudocalanus* species found in the Atlantic sector of the Arctic: the Arctic *P. acuspes*, *P. minutus* and the boreal *P. moultoni* and *P. elongatus*, and apply it to describe the relative distribution of these species in four locations of the Arctic and sub-Arctic. With this method, species-specific polymerase chain reaction (ssPCR), mass identification of individuals of any developmental stage, including nauplii, is possible. This method can serve as an excellent tool for studying the species-specific biology of this group, describing their life cycles, as well as monitoring changes in Arctic marine ecosystems under the influence of changing climate.

Keywords: zooplankton, pelagic ecosystems, Copepoda, species complex, molecular identification, ssPCR, Arctic ecosystems

Acknowledgements: The author thanks K.N. Kosobokova, D. Yurikova, O. Vorobyova and R. Descoteaux for help in collecting and processing samples, K.N. Kosobokova for stylistic edits to the text, as well as K. Præbel and T.V. Neretina for providing laboratory space and equipment for molecular work. The author also thanks the two reviewers for valuable advice and comments. This work was carried out within the State assignment IO RAS No. 0149-2019-0008. The molecular analysis of the material was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research in the framework of Project No. 18-35-00341 mol_a. Sample collection was financially supported by the Russian Science Foundation in the framework of Project No. 19-17-00058.

References

Aarbakke O.N.S., Bucklin A., Halsband C., and Norrbin F. Comparative phylogeography and demographic history of five sibling species of *Pseudocalanus* (Copepoda: Calanoida) in the North Atlantic Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2014, Vol. 461, pp. 479–488, doi: 10.1016/j.jembe.2014.10.006.

Aarbakke O.N.S., Bucklin A., Halsband-Lenk C., and Norrbin F. Discovery of *Pseudocalanus moultoni* (Frost, 1989) in Northeast Atlantic waters based on mitochondrial COI sequence variation. *Journal of Plankton Research,* 2011, Vol. 33, No. 10, pp. 1487–1495, doi: 10.1093/plankt/fbr057.

Aarbakke O.N.S., Fevolden S.-E., and Weydmann A. Relative summer abundances and distribution of *Pseudocalanus* spp. (Copepoda: Calanoida) adults in relation to environmental variables in the Nordic Seas and Svalbard fjords. *Polar Biology*, 2017, Vol. 40, No. 1, pp. 51–59, doi: 10.1007/s00300-016-1923-0.

Barthel K.-G., Noji T.T., and Noji C. Zooplankton dynamics during the onset of winter in a northern Norwegian fjord. Vertical distribution and metabolic activity in relation to phytoplankton and sedimentation. *Sarsia*, 1995, Vol. 80, No. 1, pp. 23–32, doi: 10.1080/00364827.1995.10413575.

Bucklin A., McGillicuddy D.J.J., Wiebe P.H., and Davis C.S. Habitat usage by the cryptic copepods *Pseudocalanus moultoni* and *P. newmani* on Georges Bank (Northwest Atlantic). *Continental Shelf Research*, 2015, Vol. 111, No. A, pp. 83–94, doi: 10.1016/j.csr.2015.11.001.

Cleary A.C., Durbin E.G., and Rynearson T.A. Feeding by *Pseudocalanus* copepods in the Bering

Sea: Trophic linkages and a potential mechanism of niche partitioning. *Deep Sea Research Part* II, 2015, Vol. 134, pp. 181–189, doi: 10.1016/j.dsr2.2015.04.001

Dolgov A.V., Dalpadado P., Prokopchuk I.P., Orlova A.S., Gordeeva A.S., and Benzik A.N. Zooplankton communities and pelagic fish diet in the Barents Sea during recent warming period. Proc. of PICES 6th Zooplankton Production Symposium "New Challenges in a Changing Ocean", 9–13 May 2016, Scandic Bergen City, Bergen, Norway, No. 70.

Ershova E.A., Kosobokova K.N., and Vorobyeva O.V. Changes in the egg production rates of two species of *Pseudocalanus* in relation to temperature in the White Sea. *Oceanology,* 2016, Vol. 56, No. 4, pp. 592–598.

Ershova E.A., Hopcroft R.R., Kosobokova K.N., Matsuno K., Nelson R.J., Yamaguchi A., and Eisner L. Long-term changes in summer zooplankton communities of the western Chukchi Sea, 1945–2012. *Oceanography*, 2015, Vol. 28, No. 3, pp. 100–115, doi: 10.5670/oceanog.2015.60.

Ershova E.A., Questel J.M., Kosobokova K.N., and Hopcroft R.R. Population structure and production of four sibling species of *Pseudocalanus* spp. in the Chukchi Sea. *Journal of Plankton Research,* 2017, Vol. 39, pp. 48–64, doi: 10.1093/plankt/fbw078.

Ershova E.A., Descoteaux R., Wangensteen O.S., Iken K., Hopcroft R.R., Smoot C., Grebmeier J., and Bluhm B.A. Diversity and distribution of meroplanktonic larvae in the Pacific Arctic and connectivity with adult benthic invertebrate communities. *Frontiers in Marine Science*, 2019, doi: 10.3389/fmars.2019.00490.

Falk-Petersen S., Pedersen G., Kwasniewski S., Hegseth E.N., and Hop H. Spatial distribution and life-cycle timing of zooplankton in the marginal ice zone of the Barents Sea during the summer melt season in 1995. *Journal of Plankton Research*, 1999, Vol. 21, No. 7, pp. 1249–1264, doi: 10.1093/plankt/21.7.1249.

Frost B.W. A taxonomy of the marine calanoid copepod genus *Pseudocalanus. Canadian Journal of Zoology*, 1989, Vol. 67, pp. 525–551.

Geller J., Meyer C., Parker M., and Hawk H. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, 2013, Vol. 13, pp. 851–861, doi: 10.1111/1755-0998.12138.

Grabbert S., Renz J., Hirche H.-J., and Bucklin A. Species-specific PCR discrimination of species of the calanoid copepod *Pseudocalanus*, *P. acuspes* and *P. elongatus*, in the Baltic and North Seas. *Hydrobiologia*, 2010, Vol. 652, pp. 289–297.

Kosobokova K.N. and Pertsova N.M. Zooplankton Belogo Morya: struktura, dinamika i ekologia soobshestv. Lisitsin A.P. (ed.) Sistema Belogo Morya: Prirodnaya sreda vodosbora Belogo morya. Moscow: Nauchnyj Mir, 2012, pp. 640–675.

Montero-Pau J., Gomez A., and Munoz J. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography Methods*, 2008, Vol. 6, pp. 218–222.

Renz J., Mengedoht D., and Hirche H.-J. Reproduction, growth and secondary production of *Pseudocalanus elongatus* Boeck (Copepoda, Calanoida) in the southern North Sea. *Journal of Plankton Research,* 2008, Vol. 30, No. 5, pp. 511–528, doi: 10.1093/plankt/fbn016.

Wrona F.J., Johansson M., Culp J.M., Jenkins A., Mård J., Myers-Smith I.H., Prowse T.D., Vincent W.F., and Wookey P.A. Transitions in Arctic ecosystems: Ecological implications of a changing hydrological regime. *Journal of Geophysical Research Biogeosciences*, 2016, Vol. 121, pp. 650–674, doi: 10.1002/2015JG003133.