
... ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ... ZOOLOGY AND ECOLOGY ...

УДК: 595.412:59.087

Сучасні методи фауністичних досліджень наземних тихоходів (Tardigrada) Є.О.Киося

*Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)
yevgenkiosya@karazin.ua*

Тихоходи (тип Tardigrada) – мікроскопічні безхребетні, що населяють водойми, а також водні плівки в наземних екосистемах. До числа «наземних» тихоходів належать представники еутардиград (клас Eutardigrada) і панцирних тихоходів (клас Heterotardigrada, родина Echiniscidae), яких можна знайти у ґрунті, рослинному опаді, у мохах, лишайниках та деяких інших субстратах. На сьогоднішній день фауни тихоходів досліджені вкрай неповно та нерівномірно. Крім того, численні відомості, отримані давно, вже застаріли через значні зміни в таксономії цієї групи, що відбулися протягом останніх десятиліть. У статті наведено огляд літературних даних з методів дослідження фауни наземних тихоходів. Передусім описані методи збору та зберігання зразків субстратів, заселених тихоходами, й техніки добування тихоходів із різних типів зразків. Далі обговорюються систематичні ознаки тихоходів, підходи до їх визначення та основні методи, необхідні для рутинної ідентифікації видів, у першу чергу – виготовлення мікропрепаратів та їх дослідження методами світлової мікроскопії. Єдиного стандарту для багатьох методів, що обговорюються, наразі не існує, тому описані різні підходи, ефективність яких була підтверджена експериментально і вважається задовільною. Також описані методики електронної мікроскопії та генетичних досліджень тихоходів.

Key words: *тихоходи, фауна, таксономія, мікроскопія, ДНК-баркування.*

Modern methods of the faunistic research of terrestrial water bears (Tardigrada) Ye.O.Kiosya

Water bears (phylum Tardigrada) are microscopic invertebrates inhabiting water pools as well as thin water films in terrestrial ecosystems. So called "terrestrial" tardigrades include representatives of eutardigrades (class Eutardigrada) and armoured tardigrades (class Heterotardigrada, family Echiniscidae) which can be found in soil, leaf litter, in mosses, lichens and some other habitats. At the moment faunas of tardigrades are studied insufficiently and very unevenly. Besides, a lot of data obtained a long time ago became outdated and new studies are needed. A review of methods commonly used in faunistic studies of terrestrial tardigrades is given here. First of all, methods of sampling and storage of samples containing tardigrades are described. Further, systematic criteria of tardigrades and approaches to their identification are discussed along with the methods of routine species identification (the main of them are making slides and studying them with various techniques of light microscopy). The universal standard for many methods does not exist, so different approaches are discussed, that were experimentally proven to be effective and are widely accepted as satisfactory. The methods of electron microscopy and genetic studies of tardigrades are also described.

Ключові слова: *tardigrades, fauna, taxonomy, microscopy, DNA-barcoding.*

Современные методы фаунистических исследований наземных тихоходок (Tardigrada) Е.А.Киося

Тихоходки (тип Tardigrada) – микроскопические беспозвоночные, населяющие водоёмы, а также водные плёнки в наземных экосистемах. К числу «наземных» тихоходок принадлежат представители эутардиград (класс Eutardigrada) и панцирных тихоходок (класс Heterotardigrada, семейство Echiniscidae), которых можно обнаружить в почве, растительной подстилке, во мхах, лишайниках и некоторых других местообитаниях. В настоящий момент фауны тихоходок исследованы крайне неполно и неравномерно. Кроме того, многие сведения, полученные давно, уже устарели из-за значительных изменений в таксономии этой группы, произошедших за последние десятилетия. В

статье приводится обзор литературных данных по методам исследования фауны наземных тихоходок. Прежде всего, описаны методы сбора и хранения образцов субстрата, населённых тихоходками, и техники извлечения тихоходок из различных типов образцов. Далее обсуждаются систематические признаки тихоходок, подходы к их определению и основные методы, необходимые для рутинной идентификации видов, прежде всего – изготовление микропрепаратов и их исследование методами световой микроскопии. Единого стандарта для многих обсуждаемых методов не существует, поэтому описаны различные подходы, эффективность которых была подтверждена экспериментально и считается удовлетворительной. Также описываются методики электронной микроскопии и генетических исследований тихоходок.

Ключевые слова: тихоходки, фауна, таксономия, микроскопия, ДНК-штрихкодирование.

Введение

Несмотря на повышенный интерес к сверхустойчивости тихоходок, связанный с перспективами прикладных биомедицинских и космических разработок (Persson et al., 2011; Hashimoto et al., 2016), разнообразие этой группы животных остаётся недостаточно изученным. Особенно это справедливо по отношению к морским тихоходкам: вероятно, на сегодняшний день описана только небольшая часть (около 20%) из реально существующих видов (Bartels et al., 2016).

Более полно исследовано разнообразие тихоходок, обитающих в пресных водоёмах, а также «наземных», то есть таких, которые населяют водные плёнки в наземных экосистемах. Тем не менее, на многих территориях фауна наземных тихоходок либо вовсе не изучалась, либо о ней имеются лишь отрывочные и устаревшие сведения. Кроме того, многие фаунистические сводки, составленные давно, уже устарели из-за значительных изменений в таксономии этой группы, произошедших за последние десятилетия (Pilato et al., 2011). Также дебатировался и требует дальнейших исследований вопрос о том, применимы ли стандартные зоогеографические концепции к тихоходкам (и другим микроскопическим беспозвоночным) или же для них справедлив принцип «всё есть везде», как для многих бактерий (Pilato, Binda, 2001; Guil et al., 2009).

В данной статье приводится обзор литературы, описывающей актуальные методики, применяющиеся в исследовании фауны тихоходок.

Сбор образцов

Тихоходки – очень малы (0,1–1 мм) и практически не видны невооружённым глазом, поэтому сбор и непосредственный учёт отдельных особей в природе невозможен. Вместо этого следует собирать пробы субстратов, в которых тихоходки предположительно могут находиться. В наземных экосистемах это могут быть лишайники, мхи, печёночники, плауны, некоторые мелкие покрытосеменные, а также растительная подстилка и верхний слой почвы (до 5 см). Кроме того, можно собирать тихоходок из мелких временных водоёмов, таких как заливаемые водой дупла деревьев (Ramazzotti, Maucchi, 1983).

Место сбора следует описывать как можно более точно, чтобы впоследствии на него можно было вернуться и собрать образцы повторно. Для этого рекомендуется отмечать координаты с помощью геолокации (GPS), дополняя эту информацию подробными текстовыми описаниями и фотографиями исследуемых участков. На этикетке образца помимо локации желательно указывать дату сбора, тип фитоценоза, тип образца субстрата и основания, с которого его собрали, а для гористой местности – также и высоту над уровнем моря.

Рекомендуемый размер исследуемой площадки и число образцов, собираемых с неё, имеющимися методиками сбора чётко не определены и устанавливаются каждым исследователем на своё усмотрение. По этой причине сложно корректно сравнивать между собой данные по видовому разнообразию тихоходок, изученному в разных местах разными людьми. В среднем, адекватной выборкой считается от нескольких десятков до нескольких сотен образцов с площадки до 100 м².

Экология тихоходок слабо исследована, что несколько осложняет выбор образцов для сбора. Не установлено приуроченности большинства видов тихоходок к отдельным видам мхов, лишайников или конкретным типам иного субстрата (Meyer, 2006a), которая напоминала бы связь

между растениями и насекомыми-фитофагами. Тем не менее, разные виды, вероятно, отличаются друг от друга по своим предпочтениям. Для них могут быть важны такие параметры, влияющие на микроклимат, как общая структура куртины мха, слоевища лишайника, почвы или подстилки, режим влажности, кислотность и уровень инсоляции (Hallas, 1978; Jönsson, 2003; Авдоница, 2011). Соответственно, для получения наиболее полной картины, следует брать образцы, различающиеся по этим параметрам.

Исследование сезонной динамики заселения тихоходками мха *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst показало, что численное соотношение тихоходок различных видов изменяется в течение года (Schuster, Greven, 2007). Одни виды практически исчезают из проб летом, когда уменьшается количество осадков, а другие, напротив, снижают численность при обилии осадков.

При сборе образцов важно принимать во внимание высокую степень мозаичности в распределении тихоходок по внешне одинаковым или однородным субстратам. Было показано, например, что мхи и лишайники, растущие на соседних камнях или деревьях в довольно сходных условиях, могут резко отличаться по видовому разнообразию и численному обилию тихоходок (Meuer, 2006b). Также было изучено распределение тихоходок по образцу размером 18×18 см, взятому из куртины мха *Hypnum cupressiforme* Hedw. Этот образец был разделён на 25 равных частей, и в каждой из них по отдельности было исследовано наличие тихоходок. Оказалось, что тихоходки распределены по этому образцу крайне неравномерно – в некоторых частях встречались десятки особей нескольких разных видов, тогда как в других ни одной тихоходки обнаружено не было (Degma et. al., 2011). В этой же работе было показано, что распределение тихоходок по образцу напрямую не зависело от градиента влажности в его пределах. Кроме того, в другом исследовании было продемонстрировано, что в случае постепенного высыхания образца мха *Grimmia alpicola* Hedw тихоходки не были склонны к миграциям, направленным на то, чтобы дольше оставаться в зоне повышенной влажности (Nelson, Adkins, 2001).

Таким образом, как по внешнему виду образцов субстрата, так и по их относительной влажности точно предсказать, в каких из них будут тихоходки, а в каких нет, практически невозможно. Мозаичность связана, прежде всего, с характером расселения тихоходок. Повидимому, их активное перемещение между подходящими для их жизни участками субстрата крайне ограничено, и в подавляющем большинстве случаев они распространяются пассивно, с ветром и потоками воды (Ramazzotti, Maucsi, 1983). Исходя из описанного выше, ясно, что не стоит ограничиваться сбором одного образца каждого типа, а следует собирать несколько однотипных образцов из каждого локалитета.

Размер образцов, изымаемых из биотопа, также строго не регламентируется методиками. Однако необходимо иметь в виду, что он должен быть достаточным для многократного (повторного) исследования каждого образца. На один разбор, в среднем, уходит кусочек образца 5×5 см, то есть общий его размер должен быть в несколько раз больше.

Хранение образцов

Пробы почвы и растительной подстилки нежелательно хранить более нескольких суток, после чего эффективность извлечения тихоходок из них снижается. Напротив, срок хранения собранных мхов и лишайников может быть очень продолжительным. Это связано с различными методическими подходами к извлечению тихоходок из разных типов субстрата.

Образцы мхов и лишайников для хранения предварительно высушивают в тени, без специального нагревания. При этом тихоходки переходят в состояние ангидробิโอа. В этом состоянии они являются метаболически неактивными, но сохраняют жизнеспособность на протяжении длительного времени и могут быть возвращены к активной жизни размачиванием пробы в воде (Nelson, 2002). Собственно, для микроскопирования и определения по морфологическим признакам не важно, будут ли тихоходки живыми на момент их обнаружения в образцах. Этим тихоходки выгодно отличаются от, например, бделлоидных коловраток, попадающихся в тех же пробах (Ricci, Melone, 2000). Однако для некоторых методик молекулярно-генетических и цитогенетических исследований всё же предпочтительно наличие живых особей (см. далее).

Точные временные пределы выживаемости тихоходок в состоянии ангидробиоза не установлены, хотя отдельные работы по ее оценке предпринимались. В научно-популярных источниках часто можно встретить упоминания о тихоходках, якобы успешно переживающих в высушенном виде более ста лет. Эта информация, вероятнее всего, не соответствует действительности и основана на единичном наблюдении Тины Франчески за тихоходками из пробы мха, хранившегося в гербарии около 120 лет. В тексте этой работы 1948 г. отмечено, что после регидратации одна из тихоходок слегка пошевелила передними ногами, что трудно признать полноценным и массовым возвращением к активной жизни (Jönsson, Bertolani, 2001).

Для проверки способности тихоходок переживать столь долгое высушивание были исследованы 63 пробы мхов и лишайников, хранившихся в коллекциях от 9 до 138 лет (Guidetti, Joensson, 2002). Из этих проб удалось извлечь около 1500 тихоходок и более 500 их яиц, однако жизнеспособность сохранили лишь четыре яйца тихоходок *Ramazzottius oberhaeuseri* (Doyere), из проб, высушенных 9 лет назад. Также была изучена выживаемость тихоходок *R. oberhaeuseri* и *Echiniscus* spp. из пробы лишайника, разделённой на множество частей, которые размачивали через разные промежутки времени. В рамках данного исследования выяснилось, что после трёх-четырёх лет хранения проб в бумажных конвертах при комнатной температуре тихоходки этих видов утрачивают жизнеспособность (Rebecchi et al., 2006). Притом надо заметить, что тихоходки родов *Ramazzottius* и *Echiniscus* – это одни из самых засухоустойчивых, адаптированных к часто пересыхающим местообитаниям. Многие другие виды способны переносить в высушенном состоянии лишь несколько месяцев (Rebecchi et al., 2006).

Существует предположение, что тихоходки значительно дольше сохраняют жизнеспособность в пробах субстрата, которые замораживают, чем в тех, которые хранят при комнатной температуре. Так, недавние исследования (Tsujiimoto et al., 2016) продемонстрировали успешное возвращение в активное состояние тихоходок *Acutuncus antarcticus* (Richters) из пробы мха, собранной в 1983 году и более 30 лет хранившейся в морозильной камере при температуре -20°C. Конечно, данный конкретный случай можно было бы объяснить специфическими приспособлениями антарктических видов тихоходок к местному холодному климату. Однако вероятно, что все тихоходки, независимо от их местообитания, лучше переносят ангидробиоз при пониженных температурах.

Также предполагается, что на жизнеспособность ангидробиотических тихоходок может положительно влиять ограничение доступа воздуха. В покоящемся состоянии метаболизм тихоходок практически приостанавливается, так что поглощать кислород для дыхания им не нужно. В то же время, в присутствии кислорода проходят процессы окисления, повреждающие ткани (Rebecchi et al., 2009).

Таким образом, высушенные части наиболее ценных образцов субстрата может быть целесообразно перекладывать из бумажных конвертов в герметичные пластиковые пакеты и замораживать.

Извлечение тихоходок из образцов

Существует множество методик для извлечения тихоходок из проб, однако все они включают два основных этапа: 1) вымывание тихоходок и других мелких животных из образца субстрата в воду или фиксирующую жидкость и 2) просматривание этой жидкости и отбор индивидуальных тихоходок и их яиц.

Мхи, лишайники и прочие образцы, подобные им по структуре, можно просто размачивать в воде, ждать, пока тихоходки выйдут из ангидробиоза (0,5–3 часа), а затем встряхивать и отжимать воду. Это можно делать довольно интенсивно – тихоходки слишком малы для того, чтобы быть раздавленными этими движениями. Поскольку активные тихоходки могут крепко удерживаться на субстрате при помощи коготков, рекомендуется наркотизировать их перед встряхиванием прибавлением к размоченному субстрату раствора этилового спирта (Morgan, King, 1976).

С пробами почвы и большинством образцов растительной подстилки простое размачивание не даёт хорошего результата, так как обнаружить тихоходок в толще мелких частиц чрезвычайно сложно и затратно по времени. Поэтому тихоходок необходимо как-то отделять от общей массы

частиц. Метод флотации, часто применяемый для извлечения, например, клещей, для тихоходок малопригоден, так как они скорее тонут в жидкости, чем всплывают на её поверхность. Остаются такие варианты, как механическое просеивание (промывание) проб через сита и активное изгнание тихоходок из пробы.

Для просеивания, как правило, используют систему из двух сит. Первое сито, с крупными ячейками (более 2 мм) служит для удаления крупных частиц, сами же тихоходки оседают на втором сите с ячейками 30–40 мкм (Nelson, 2002).

Для изгнания тихоходок из проб часто используют воронки Берманна (Harada, Ito, 2006; Guil et al., 2015). Впрочем, показано, что более эффективным является метод, изначально предложенный для извлечения бделлоидных коловраток (Devetter, 2010). При этом методе в чашку Петри заливают воду и помещают в неё образец, лежащий на целлюлозном фильтре. Снизу образец охлаждают, а сверху подсвечивают флуоресцентными (ненагревающими) лампами. Тогда мелкие животные, включая тихоходок и коловраток, начинают мигрировать прочь от света и выходят в воду. Недостатком данного метода является то, что с его помощью нельзя добыть яйца тихоходок, а также уже мертвых особей.

Воду или фиксирующую жидкость с тихоходками просматривают в небольшой чашке Петри при увеличении $\times 25$ – 50 стереомикроскопа, в падающем свете, на тёмном поле (Kinchin, 1994). Микроскопы, предусматривающие рассматривание объектов на стекле в проходящем свете, для выбора тихоходок из проб малопригодны. Во-первых, у них слишком маленькие поля зрения и глубина резкости для эффективного обнаружения мелких беспозвоночных, рассеянных в жидкости. Во-вторых, в поле зрения такого микроскопа неудобно производить манипуляции с найденными животными.

Обнаруженных тихоходок и их яйца, в зависимости от цели дальнейших исследований, переносят на предметное стекло или в небольшую ёмкость с водой, из стекла или пластика. Для переноса можно использовать пипетки Пастера (с тонким носиком), микропипетки, петли Ирвина или микроложечки, которые можно собственноручно изготовить, например, из игл для шприцев.

Изготовление микропрепаратов тихоходок

Для хранения в коллекциях, определения видов и установления типовых экземпляров новых таксонов изготавливают постоянные микропрепараты. Для этого монтируют тихоходок на предметные стёкла. При этом либо приклеивают к каждому стеклу бумажную этикетку, либо подбирают стёкла с шлифованным полем для записи, на котором указывается необходимая информация для идентификации.

При изготовлении препаратов тихоходок помещают в поливинил-лактофенол или же в среды на основе хлоральгидрата и гуммиарабика (жидкость Фора, жидкость Хойера, жидкость Берлезе и т.п.), также применяющиеся для изготовления препаратов клещей, тлей и других мелких членистоногих. Все эти среды являются водосовместимыми и не предусматривают специального предварительного обезвоживания тихоходок (Kinchin, 1994).

Недавно на клоне партеногенетических тихоходок *Milnesium* cf. *alpigenum* были проведены исследования, целью которых было определить оптимальную процедуру изготовления микропрепаратов, при которой тихоходки оптимальным образом расправляются, но не деформируются (Morek et al., 2016). В этой работе сравнивались результаты девяти процедур, различающихся способом подготовки тихоходок к монтированию на препарат, количеством применяемой среды, а также варианты с надавливанием на покровное стекло и без надавливания. Оказалось, что наилучших результатов позволяет добиться методика, описанная ниже.

Сначала тихоходок инактивируют в ёмкости с горячей водой (30 минут при $+60^{\circ}\text{C}$ в термостате), при этом они погибают и расправляются. Далее их переносят на предметное стекло в каплю воды; наблюдая в стереомикроскоп, убирают почти всю воду и заключают тихоходку в каплю среды (около 50 μl в расчёте на покровное стекло 18×18 мм). Накрывают покровным стеклом, ждут, пока среда растечётся и заполнит собой всё пространство под ним, и затем слегка надавливают сверху энтомологической булавкой, чтобы среда чуть выступила по краям покровного стекла. Затем среда между стеклами сохнет на протяжении длительного времени (5

дней в термостате при +60°C или несколько недель при комнатной температуре), после чего края покровного стекла окантовывают прозрачным лаком для ногтей, чтобы избежать пересушивания среды, её кристаллизации и растрескивания. Во время просушки препараты необходимо хранить горизонтально; после просушки и окантовки лаком можно ставить их в коробки вертикально.

Поскольку тихоходки – мелкие и полупрозрачные, а среда, в которую их заключают, ещё больше просветляет их, то на препаратах их практически не видно, и даже при больших увеличениях светового микроскопа они выглядят очень слабоконтрастными. По этой причине для исследования тихоходок методами световой микроскопии рекомендуется применять либо технику фазового контраста, либо микроскопию Номарского, то есть технику дифференциального интерференционного контраста (англ. DIC) (Frohlich, 2008). Данные техники не предусматривают предварительного окрашивания тихоходок красителями, и оно не требуется для определения видов (см. ниже). Однако для исследования соотношения полов, различения раздельнополых и партеногенетических популяций можно перед заключением в среду окрасить тихоходок ацетокармином или лактоацетоорсеином (Bertolani, 1994).

Определение видов при помощи световой микроскопии

Определение таксономической принадлежности тихоходок традиционно производят, исследуя их морфологические признаки, прежде всего – строение ротоглоточного аппарата и строение коготков на ногах. Для панцирных тихоходок (класс *Heterotardigrada*, семейство *Echiniscidae*) важно также строение щитков панциря и отходящих от них выростов, а для некоторых эутардиград (класс *Eutardigrada*) – скульптура кутикулы (Nelson, 2002; Pilato, Binda, 2010). Другие признаки, такие как окраска, форма тела, наличие и цвет глаз и прочие имеют ограниченное значение и используются для определения видов лишь в редких случаях. Следует особо отметить, что у тихоходок отсутствуют наружные гениталии, которые часто исследуются для различения близких видов во многих группах членистоногих. Теоретически в качестве таксономического признака также может быть использована ультраструктура сперматозоидов (Guidi, Rebecchi, 1996), однако на практике исследовать этот признак сложно, и в определительных таблицах он практически не фигурирует.

Развитие наземных тихоходок проходит с несколькими линьками. Метаморфоз отсутствует либо же слабо выражен. У ювенильных особей панцирных тихоходок (сем. *Echiniscidae*) имеются определённые отличия от взрослых (часто – меньшее число коготков и выростов панциря), поэтому у них для определения надёжнее брать более крупных особей. У эутардиград важные морфологические признаки развивающихся особей, как правило, не отличаются от таковых у взрослых. Однако важно помнить, что незадолго до линьки тихоходки выбрасывают через ротовое отверстие все твёрдые кутикулярные части своего ротоглоточного аппарата и переходят в так называемую «симплекс-стадию», в которой их определение крайне затруднено (Kinchin, 1994).

Самцы и самки большинства видов раздельнополых наземных тихоходок не различаются по систематически важным морфологическим признакам, хотя для многих морских и пресноводных видов обычен половой диморфизм (Morgan, King, 1976). Из исключений наиболее известны тихоходки рода *Milnesium*, у самцов которых видоизменены коготки на передних ногах, что, вероятно, необходимо для удержания самки при спаривании (Tumanov, 2006).

Поскольку тело тихоходок полупрозрачно, внутренние органы просвечивают и хорошо видны. При этом хорошо заметны различия в их видимой структуре между тихоходками, находящимися на разных стадиях цикла линек и репродуктивного цикла (Rebecchi, Bertolani, 1994). Более того, под стереомикроскопом эти отличия зачастую видны лучше, чем отличия между тихоходками разных видов. На постоянных микропрепаратах внутренние органы сильно просветляются и становятся малозаметны, а для определения видов их строение не используется.

Некоторые различия между таксонами носят скорее количественный, чем качественный характер. Это, прежде всего, морфометрические показатели. Для их получения тихоходок измеряют при помощи окуляр-микрометра или специализированного программного обеспечения фотокамер. Поскольку размеры тихоходки зависят от возраста и индивидуальных особенностей развития, во внимание принимаются не абсолютные показатели промеров, а индексы,

отражающие пропорции и соотношения. Наиболее часто используются индексы системы *pt* (от англ. percent ratio и tube), показывающие отношение между измеряемым параметром и длиной ротовой трубки тихоходки (Pilato et al., 2007).

Стабильность и надёжность морфометрических признаков, применяющихся в систематике, были недавно проверены методами так называемой экспериментальной таксономии (Kozstyla et al., 2016). В этой работе исследовали клоны 6 партеногенетических видов тихоходок из 4 семейств класса Eutardigrada. Каждый клон разделили на несколько групп особей, которых культивировали в различных условиях (отличающихся по температуре и доступности пищи) и затем сравнивали по морфометрическим показателям. Всего таким образом было исследовано более двух тысяч тихоходок, на которых провели в общей сложности около 28 000 измерений. В результате исследования было установлено, что условия развития влияют на морфометрические признаки тихоходок, однако влияние это – незначительное и практически не существенное для целей систематики.

Также было подсчитано, что для корректной оценки морфометрических показателей тихоходок необходимо делать промеры на выборке в 20–30 особей каждого вида (Stec et al., 2016). Поэтому при выборе тихоходок из проб важно не ограничиваться несколькими экземплярами.

Помимо признаков взрослых и растущих особей тихоходок для систематики многих таксонов важны признаки откладываемых яиц. У разных представителей стратегия по защите яиц от поедания различается, но в большинстве случаев она сводится к двум основным вариантам: откладка гладких яиц в экзувии, то есть в сбрасываемую кутикулу (рода *Hypsibius* spp., *Isohypsibius* spp., *Diphascion* spp., *Echiniscus* spp. и др.) и свободная откладка яиц с орнаментированным хорионом (например, *Macrobotus* spp., *Paramacrobotus* spp., *Mesobiotus* spp., *Ramazzottius* spp.). Значение экзувиев с яйцами для определения видов – ограничено, хотя на экзувиях, как и на целых тихоходках, можно исследовать строение когтей. Зато орнаментированные яйца могут быть очень полезны для определения. Многие виды тихоходок, неразличимые по признакам взрослых особей, можно надёжно отличить только по признакам яиц, таким как число и форма отростков, а также мелкие детали их строения (Nelson, 2002). Также на определённых стадиях развития в яйцах просматриваются ротоглоточные аппараты эмбрионов, что позволяет связать морфологию яиц с морфологией взрослых особей. Поэтому для эффективного определения очень важно уметь различать яйца тихоходок, выбирать их из проб и помещать на микропрепараты.

Единого актуального определителя видов тихоходок в настоящий момент не существует. Сводный определитель, которым пользовались ранее (Ramazzotti, Maucchi, 1983), сейчас уже безнадежно устарел, равно как и большинство региональных определителей, таких как «Тихоходки Польши» (Dastych, 1988) или «Тихоходки Британии» (Morgan, King, 1976), а полноценная замена им пока не создана. Для идентификации отрядов, семейств и родов эутардиград хорошо подходит определитель Пилато и Бинды (Pilato, Binda, 2010), где также ясно и подробно описаны главные систематические признаки тихоходок. Определение видов в пределах рода – значительно более проблематично. Конечно, для некоторых родов и групп видов были опубликованы обновленные определительные таблицы (Tumanov, 2006; Kaczmarek, Michalczyk, 2017 и др.). Однако из-за высоких темпов описания всё новых видов тихоходок (Guil, Cabrero-Sanudo, 2007) эти ключи быстро становятся неполными, поэтому помимо них необходимо обращаться к новым статьям с оригинальными описаниями.

Задачу поиска свежих публикаций по определённым родам или группам видов тихоходок сильно облегчает актуальный список видов (англ. check-list). Изначально он был опубликован в виде статьи (Guidetti, Bertolani, 2005), затем в ещё одной статье вышли первые дополнения к нему (Degma, Guidetti, 2007), а далее обновления уже не публиковались на бумаге, но продолжают регулярно выходить в электронном виде на сайте рабочей группы по тихоходкам университета Модены и Реджо-Эмилии: www.tardigrada.modena.unimo.it. Кроме того, свежие публикации по систематике тихоходок удобно отслеживать на сайте “Tardigrada Newsletter”: www.tardigrada.net.

Иногда для различения близких видов (и практически всегда для описания новых таксонов) работы со статьями бывает недостаточно, и требуется сравнительное исследование типовых экземпляров разных видов, хранящихся в музейных и частных коллекциях (Pilato et al., 2011). К

счастью, ввиду малого размера тихоходок, перевозка и пересылка необходимых для этого микропрепаратов значительно облегчена в сравнении с транспортировкой типовых образцов многих других животных.

Электронная микроскопия

Основы морфологической систематики тихоходок были заложены исключительно при помощи методов световой микроскопии. Однако в последние десятилетия для изучения мелких деталей строения этих животных также применяется сканирующая, или растровая электронная микроскопия (РЭМ, англ. SEM).

Препараты для РЭМ готовят, тщательно промывая тихоходок, извлечённых из пробы, и затем обезживая их проведением через батарею сольвентов или переходом через критическую тройную точку (англ. critical point drying) в абсолютном спирте (Mitchell, Miller, 2008).

Так как РЭМ позволяет изучить только наружные признаки (структура кутикулы, когтей или орнамента хориона яиц) и не показывает внутреннее строение, была отдельно разработана методика для изучения пространственной структуры и мелких деталей строения ротоглоточного аппарата тихоходок (Eibye-Jacobsen, 2001). По этой методике необходимо препарировать тихоходку в капле раствора перхлората натрия (NaClO_4), источником которого может быть бытовой отбеливатель. При помощи тонких заточенных иголок тихоходку необходимо разорвать, извлечь ротоглоточный аппарат из передней части тела и тщательно промыть дистиллированной водой. Альтернативно можно отсаживать живых тихоходок, готовящихся к линьке, в мелкие ёмкости с водой и ждать активного выброса ротоглоточного аппарата перед вхождением в симплекс-стадию (Guidetti et al., 2012).

Для РЭМ исследуемый образец должен находиться на металлическом столике (англ. SEM stub). Ротоглоточный аппарат можно монтировать прямо на нём. Тотальные препараты тихоходок и их яиц необходимо переносить на липкую подложку (двусторонний токопроводящий скотч), приклеиваемую к столику. Поскольку переносимый препарат уже должен быть обезвожен, его невозможно перенести пипеткой или микроложкой. Поэтому для переноса используется, например, кисточка с одним волоском, к которому сухие тихоходки притягиваются электростатически. Впоследствии на препараты напыляют сверху тонкий токопроводящий слой и исследуют их, изготавливая микрофотографии.

Цитогенетические исследования

Хромосомные числа и в целом кариотипы различных видов тихоходок мало отличаются, поэтому подсчет хромосом практически не используется для идентификации таксонов тихоходок. В то же время, цитогенетический анализ может быть интересным для особенностей изучения репродуктивной биологии этой группы животных (Bertolani, 1994). В пределах одного «морфотипа», или «морфологического вида» тихоходок можно обнаружить несколько «цитотипов», различающихся плоидностью и способом размножения (раздельнополые и с мейотическим или амейотическим партеногенезом).

Для цитогенетических исследований нужны делящиеся клетки. У тихоходок их непросто найти, так как их тела состоят из относительно небольшого числа клеток, и клеточные деления у них редки. Тем не менее, истинно эутеличными тихоходки не являются. У них можно наблюдать митотические деления в тканях кишечника, а также мейоз при формировании половых клеток. Самые крупные и хорошо различимые хромосомы можно наблюдать в созревающих ооцитах самок (Киося, 2010).

Молекулярно-генетические исследования

Поскольку определение тихоходок по морфологическим признакам сложно и доступно лишь узкому кругу таксономистов, активно разрабатываются более универсальные методы идентификации. Одним из них является методика ДНК-штрихкодирования тихоходок (Cesari et al., 2009), основные этапы которой описаны ниже.

1. Живую тихоходку фиксируют 96% этиловым спиртом и гомогенизируют при помощи тонких вольфрамовых игл.

2. Экстрагируют ДНК в буферный раствор и очищают от примесей.

3. Амплифицируют нуклеотидные последовательности определённых генов (например, 18S rRNA и COI) путём полимеразной цепной реакции (ПЦР) в термоблоке.

4. Выделяют амплифицированные последовательности путём электрофореза в агарозном геле.

5. Очищают амплифицированные гены от геля и проверяют концентрацию ДНК в продуктах ПЦР на спектрофотометре (этот этап не является обязательным).

6. Последовательность нуклеотидов в исследуемом участке ДНК определяют с помощью реакции секвенирования, визуализируют и корректируют.

7. Для предотвращения путаницы, связанной с возможным загрязнением образцов чужеродной ДНК, проверяют нуклеотидные последовательности по базам данных и удостоверяются, что они действительно принадлежат тихоходкам.

8. Сопоставляют нуклеотидные последовательности исследованных видов с ранее опубликованными данными (например, из базы GenBank) и строят филогенетические деревья.

После смерти тихоходки ДНК постепенно разрушается, поэтому исследовать лучше недавно собранные или замороженные пробы, в которых тихоходки ещё живы. Изучение ДНК из старых образцов также возможно, но гораздо менее эффективно (Rebecchi et al., 2009).

Из-за малого размера тихоходок из каждой особи можно взять лишь один образец для исследования ДНК, причём впоследствии данный экземпляр уже нельзя использовать для исследования морфологии, а значит, его видовая принадлежность может быть поставлена под сомнение. С другой стороны, особь, помещённая на микропрепарат и использованная для изучения морфологии, как правило, не может быть источником ДНК. Поэтому для надёжного сопоставления морфологических и молекулярных данных можно использовать методику подбора так называемых «гарантийных», или «ваучерных экземпляров» (англ. "voucher specimens") тихоходок (Cesari et al., 2013). В соответствии с этой методикой из пробы выбирают живых (подвижных) самок тихоходок с крупными ооцитами, отсаживают их по одной в небольшие ёмкости с водой и содержат при +7°C до откладки яиц. Самку, отложившую яйца, фиксируют, изготавливают из неё постоянный микропрепарат и используют для исследования морфологии, а сами отложенные яйца инкубируют при +7°C. Когда из яиц вылупляется следующее поколение тихоходок, скорлупу яиц помещают на микропрепараты, а ювенильных особей – используют для исследования ДНК. Так может быть гарантировано однозначное соответствие между морфологией взрослой особи, морфологией яиц и изучаемыми нуклеотидными последовательностями ДНК и, таким образом, обеспечивается точная идентификация видов (Bertolani et al., 2010). Также подобный подход помогает выявить филогенетические связи тихоходок на уровне родов и семейств (Bertolani et al., 2014).

Опытные исследователи могут использовать модификацию этой техники, в которой «ваучерные экземпляры» на микропрепаратах заменяют микрофотографиями живых тихоходок, из которых впоследствии экстрагируют ДНК. Поскольку подвижную тихоходку сложно качественно сфотографировать, исследуемых особей предварительно ненадолго замораживают: после размораживания тихоходки некоторое время сохраняют неподвижность (Cesari et al., 2011). Следуя этой методике, нужно с самого начала понимать, что и как следует сфотографировать, так как возможности провести повторное исследование тихоходки этот метод не предусматривает.

Альтернативный подход к молекулярно-генетическим исследованиям видового разнообразия тихоходок предполагает исследования ДНК сразу всех тихоходок, находящихся в пробе субстрата (Blaxter et al., 2004; Robeson et al., 2009). При этом самих тихоходок либо вовсе не извлекают из пробы и не определяют по морфологическим признакам, либо приблизительно (до рода) определяют по фотографиям. Для описания разнообразия в этом случае оперируют понятием "молекулярные таксономические единицы" (англ. MOTU – molecular operational taxonomic units). При помощи подобных методов, то есть только по нуклеотидным последовательностям ДНК, без морфологического анализа были даже описаны три новых вида тихоходок рода

Paramacrobiotus (Schill et al., 2010). Этот подход сравнительно прост и удобен, а значит – может быть использован широким кругом исследователей. Однако пока не вполне ясно, как сопоставлять данные, полученные с его помощью, с огромным массивом данных, ранее полученных методами традиционной морфологической систематики.

Выводы

1. Фаунистические исследования тихоходок имеют ряд особенностей, связанных, прежде всего, с мелкими размерами этих животных.
2. Методика сбора образцов субстрата с тихоходками нуждается в стандартизации.
3. Для точной идентификации видов рекомендуется использовать не только традиционные методы световой микроскопии, но и электронную микроскопию, а также молекулярно-генетические методы. Это обстоятельство, а также необходимость исследования определённых стадий жизненного цикла и мозаичность распределения тихоходок в субстратах обуславливают необходимость сбора большого числа однотипных образцов из одного локалитета.

Список литературы

- Авдонина А.М. Экология наземных тихоходок (Tardigrada): аутэкологический аспект // *Invertebrate Zoology*. – 2011. – Т.8 (Вып.1). – С. 11–22. /Avdonina A.M. Ecologiya nazemnykh tikhokhodok (Tardigrada): autecologicheskii aspekt // *Invertebrate Zoology*. – 2011. – Т.8 (Vyp.1). – С. 11–22./
- Киося Е.А. Цитогенетика созревания ооцитов тихоходки *Macrobiotus glebkai* (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія*. – 2010. – Вип.12 (№920). – С. 26–30. /Kiosya Ye.O. Tsitogenetika sozrevaniya ootsitov tikhokhodki *Macrobiotus glebkai* (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) // *Visnik Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya*. – 2010. – Vyp.12 (no. 920). – С. 26–30./
- Bartels P.J., Apodaca J.J., Mora C., Nelson D.R. A global biodiversity estimate of a poorly known taxon: phylum Tardigrada // *Zoological Journal of the Linnean Society*. – 2016. – Vol.178. – P. 730–736.
- Blaxter M., Elsworth B., Daub J. DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades // *Proceedings of Royal Society of London, Biology letters*. – 2004. – Vol.271 (Suppl. 4). – P. 189–192.
- Bertolani R. Tardigrada // In: *Reproductive biology of invertebrates*, ed. K.G.Adiyodi. – New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co, 1994. – Vol.VI, part B. – P. 25–37.
- Bertolani R., Rebecchi L., Cesari M. A model study for tardigrade identification // In: *Tools for identifying biodiversity: progress and problems* / Ed. P.L.Nimis, R.Vignes Lebbe. – 2010. – P. 333–339.
- Bertolani R., Guidetti R., Marchioro T. et al. Phylogeny of Eutardigrada: new molecular data and their morphological support lead to the identification of new evolutionary lineages // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2014. – Vol.76. – P. 110–126.
- Cesari M., Bertolani R., Rebecchi L., Guidetti R. DNA barcoding in Tardigrada: the first case study on *Macrobiotus macrocalix* (Eutardigrada, Macrobiotidae) // *Molecular Ecology Resources*. – 2009. – Vol.9. – P. 699–706.
- Cesari M., Giovannini I., Bertolani R., Rebecchi L. An example of problems associated with DNA barcoding in tardigrades: a novel method for obtaining voucher specimens // *Zootaxa*. – 2011. – Vol.3104. – P. 42–51.
- Cesari M., Guidetti R., Rebecchi L. et al. A DNA barcoding approach in the study of tardigrades // *Journal of Limnology*. – 2013. – Vol.72 (Suppl.). – P. 182–198.
- Dasty H. Tardigrada of Poland // *Monografie Fauny Polski*. – 1988. – Vol.16. – 286p.
- Degma P., Guidetti R. Notes to the current checklist of Tardigrada // *Zootaxa*. – 2007. – Vol.1579. – P. 41–53.
- Degma P., Katina S., Sabatovicova L. Horizontal distribution of moisture and Tardigrada in a single moss cushion // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. – 2011. – Vol.49 (Suppl.1). – P. 71–77.
- Devetter M. A method for efficient extraction of rotifers (Rotifera) from soils // *Pedobiologia*. – 2010. – Vol.53. – P. 115–118.

- Eibye-Jacobsen J. A new method for making SEM preparations of the tardigrade buccopharyngeal apparatus // *Zoologischer Anzeiger*. – 2001. – Vol.240. – P. 309–319.
- Frohlich V.C. Phase Contrast and Differential Interference Contrast (DIC) Microscopy // *Journal of visualized experiments*. – 2008. – Vol.17 (844).
- Guidetti R., Joensson K.I. Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans // *Journal of Zoology*. – 2002. – Vol.257. – P. 181–187.
- Guidetti R., Bertolani R. Tardigrade taxonomy: an updated check list of the taxa and a list of characters for their identification // *Zootaxa*. – 2005. – Vol.845. – P. 1–46.
- Guidetti R., Altiero T., Marchioro T. et al. Form and function of the feeding apparatus in Eutardigrada (Tardigrada) // *Zoomorphology*. – 2012. – Vol.131. – P. 127–148.
- Guidi A., Rebecchi L. Spermatozoan morphology as a character for tardigrade systematics: comparison with sclerified parts of animals and eggs in eutardigrades // *Zoological Journal of the Linnean society*. – 1996. – Vol.116 (1–2). – P. 101–113.
- Guil N., Cabrero-Sanudo F.J. Analysis of the species description process for a little known invertebrate group: the limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada) // *Biodiversity and Conservation*. – 2007. – Vol.16. – P. 1063–1086.
- Guil N., Sanchez-Moreno S., Machordom A. Local biodiversity patterns in micrometazoans: Are tardigrades everywhere? // *Systematics and Biodiversity*. – 2009. – Vol.7 (No. 3). – P. 259–268.
- Guil N., Rodrigo E., Machordom A. Soil tardigrade biodiversity with the description of a new eutardigrade genus and its phylogenetic position // *Systematics and Biodiversity*. – 2015. – Vol.13 (3). – P. 234–256.
- Hallas T.E. Habitat preference in terrestrial tardigrades // *Annales Zoologici Fennici*. – 1978. – Vol.15. – P. 66–68.
- Harada H., Ito M.T. Soil-inhabiting tardigrade communities in forests of Central Japan // *Hydrobiologia*. – 2006. – Vol.558. – P. 119–127.
- Hashimoto T., Horikawa D.D., Saito Y. et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein // *Nature Communications*. – 2016. – Vol.7. – P. 1–14.
- Jönsson K.I., Bertolani R. Facts and fiction about long-term survival in tardigrades // *Journal of the Zoological Society of London*. – 2001. – Vol.255. – P. 121–123.
- Jönsson K.I. Population density and species composition of moss-living tardigrades in a boreo-nemoral forest // *Ecography*. – 2003. – Vol.26. – P. 356–364.
- Kaczmarek L., Michalczyk L. The *Macrobotus hufelandi* group (Tardigrada) revisited // *Zootaxa*. – 2017. – Vol.4363 (1). – P. 101–123.
- Kinchin I.M. *Biology of tardigrades* – London: Portland Press, 1994. – 185p.
- Kosztyla P., Stec D., Morek W. et al. Experimental taxonomy confirms the environmental stability of morphometric traits in a taxonomically challenging group of microinvertebrates // *Zoological Journal of the Linnean Society*. – 2016. – Vol.178. – P. 765–775.
- Meyer H.A. Interspecific association and substrate specificity in tardigrades from Florida, Southeastern United States // *Hydrobiologia*. – 2006a. – Vol.558. – P. 129–132.
- Meyer H.A. Small-scale spatial distribution variability in terrestrial tardigrade populations // *Hydrobiologia*. – 2006b. – Vol.558. – P. 133–139.
- Mitchell C., Miller W.R. A simple SEM (scanning electron microscope) preparation protocol for tardigrades // *Journal of the Pennsylvania Academy of Science*. – 2008. – Vol.81 (2/3). – P. 86–90.
- Morek W., Stec D., Gasiorek P. et al. An experimental test of eutardigrade preparation methods for light microscopy // *Zoological Journal of the Linnean Society*. – 2016. – Vol.178. – P. 785–793.
- Morgan C.I., King P.E. *British tardigrades*. – London-NY: Academic Press, 1976. – 133p.
- Nelson D.R., Adkins R.G. Distribution of tardigrades within a moss cushion: do tardigrades migrate in response to changing moisture conditions? // *Zoologischer Anzeiger*. – 2001. – Vol.240. – P. 493–500.
- Nelson D.R. Current status of the Tardigrada: evolution and ecology // *Integrative and Computational Biology*. – 2002. – Vol.42. – P. 652–659.

- Persson D., Halberg K.A., Jorgensen A. et al. Extreme stress tolerance in Tardigrades: surviving space conditions in low earth orbit // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. – 2011. – Vol.49. – P. 90–97.
- Pilato G., Binda M.G. Biogeography and limno-terrestrial tardigrades: are they truly incompatible binomials? // *Zoologischer Anzeiger*. – 2001. – Vol.240. – P. 511–516.
- Pilato G., Costa G., Conti E. et al. Morphometric analysis of some metric characters of two *Macrobiotus* species (Eutardigrada, Macrobiotidae) // *Journal of Limnology*. – 2007. – Vol.66 (Suppl.1). – P. 26–32.
- Pilato G., Binda M.G. Definition of families, subfamilies, genera and subgenera of the Eutardigrada, and keys to their identification // *Zootaxa*. – 2010. – Vol.2404. – P. 1–54.
- Pilato G., Kiosya Ye., Lisi O. et al. Annotated list of Tardigrada records from Ukraine with the description of three new species // *Zootaxa*. – 2011. – Vol.3123. – P. 1–31.
- Ramazzotti G., Maucci W. Il Phylum Tardigrada // *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* – 1983. – Vol.41. – P. 1–1012. (English translation by C.Beasley, 1995)
- Rebecchi L., Bertolani R. Maturative pattern of ovary and testis in eutardigrades of freshwater and terrestrial habitats // *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*. – 1994. – Vol.26, no. 2. – P. 107–118.
- Rebecchi L., Guidetti R., Borsari S. et al. Dynamics of long-term anhydrobiotic survival of lichen-dwelling tardigrades // *Hydrobiologia*. – 2006. – Vol.558. – P. 23–30.
- Rebecchi L., Cesari M., Altiero T. et al. Survival and DNA degradation in anhydrobiotic tardigrades // *Journal of Experimental Biology*. – 2009. – Vol.212. – P. 4033–4039.
- Ricci C., Melone G. Key to the identification of the genera of bdelloid rotifers // *Hydrobiologia*. – 2000. – Vol.418. – P. 73–80.
- Robeson M.S., Costello E.K., Freeman K.R. et al. Environmental DNA sequencing primers for eutardigrades and bdelloid rotifers // *BioMed Central Ecology*. – 2009. – Vol.9 (Issue 1). – P. 1–10.
- Schill R.O., Foerster F., Dandekar T., Wolf M. Using compensatory base change analysis of internal transcribed spacer 2 secondary structures to identify three new species in *Paramacrobiotus* (Tardigrada) // *Organisms Diversity and Evolution*. – 2010. – Vol.10. – P. 287–296.
- Schuster R., Greven H. A long-term study of population dynamics of tardigrades in the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst // *Journal of Limnology*. – 2007. – Vol.66 (1). – P. 141–151.
- Stec D., Gasiorek P., Morek W. et al. Estimating optimal sample size for tardigrade morphometry // *Zoological Journal of the Linnean Society*. – 2016. – Vol.178. – P. 776–784.
- Tsujimoto M., Imura S., Kanda H. Recovery and reproduction of an Antarctic tardigrade retrieved from a moss sample frozen for over 30 years // *Cryobiology*. – 2016. – Vol.72. – P. 78–81.
- Tumanov D.V. Five new species of the genus *Milnesium* (Tardigrada, Eutardigrada, Milnesiidae) // *Zootaxa*. – 2006. – Vol.1122. – P. 1–23.

Представлено: М.О.Кравченко / Presented by: M.O.Kravchenko

Рецензент: С.Ю.Утевський / Reviewer: S.Yu.Utevsky

Подано до редакції / Received: 09.10.2017