

УДК [595.371.13:57.06]:575.1/.2

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
МАРКЕРОВ ДВУХ ГЕНОВ (*Co-1* И *H3*)
LITOROGAMMARUS KARADAGIENSIS (GRINTSOV, 2009)
(AMPHIRODA, GAMMARIDAE)
И СИСТЕМАТИКА РОДА *LITOROGAMMARUS***

© 2025 г. А. О. Золотова¹, В. А. Гринцов², В. И. Рябушко², Ю. Ф. Картавец¹

¹Национальный научный центр морской биологии имени А. В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток, Российская Федерация

²ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: anna.o.zolotova@gmail.com

Поступила в редакцию 19.03.2025; после доработки 20.06.2025;
принята к публикации 12.08.2025.

Исследована внутри- и межвидовая изменчивость гена субъединицы I цитохромоксидазы с митохондриальной ДНК (*Co-1*) и гена гистона *H3* ядерной ДНК представителей рода *Litorogammarus*. Показано, что молекулярный маркер гена гистона *H3* не подходит для видовой идентификации *Litorogammarus* ввиду своей недостаточной изменчивости. Таксономия изученных видов рода уточнена на основании анализа молекулярного маркера гена *Co-1*. Результаты комплексного анализа генетических расстояний (*p*-расстояний), выполненного с помощью ABGD и ASAP, подтверждают значимость участка гена *Co-1* как маркера для идентификации видов рода *Litorogammarus*. На основе информации для четырёх филогенетических реконструкций и анализа топологии соответствующих генных деревьев для *Co-1* выяснена генетическая близость видов *L. karadagensis* и *L. glareophilus*. Для этих двух видов выявлены общие морфологические признаки — перистые щетинки на мандибулах, максиллах первой пары, максиллипедах и члениках гнатопод первой и второй пар. Использование молекулярных и морфологических данных в интегративном подходе представляется перспективным для идентификации видов и для решения таксономических вопросов в пределах анализируемой группы амфипод.

Ключевые слова: мтДНК, яДНК, *Co-1*, гистон *H3*, *p*-расстояния, *Litorogammarus karadagensis*, *Litorogammarus*, Gammaridae, Amphipoda

Litorogammarus karadagensis (Grintsov, 2009) обитает в зоне заплеска галечно-песчаных пляжей. Впервые этот вид был описан на пляжах в районах Карадага (Восточный Крым), Батилимана и бухты Ласпи (Южный берег Крыма, Чёрное море) [Grintsov, 2009]. *L. karadagensis* относится к гаммаридной жизненной форме и к экологической форме кривофилов (от греческого *kyruo* — «прятаться», *phileo* — «любить») [Гринцов, 2023]. Животные образуют плотные скопления, достигающие примерно тысячи особей на 1 м² на некоторых участках пляжа, где размер элементов грунта составляет не менее 5–6 мм. Особи этого вида встречаются во все сезоны года вместе с представителями родов *Chaetogammarus* Martynov, 1924

и *Pectenogammarus* Reid, 1940. В статье В. А. Гринцова [Grintsov, 2009] представители вышеуказанных родов отмечены как *Echinogammarus ischnus behningi* (Stebbing, 1899), *Echinogammarus foxi* (Schellenberg, 1928) и *Echinogammarus olivii* (H. Milne Edwards, 1830). В настоящее время *E. ischnus behningi* отнесён к роду *Chaetogammarus*, а *E. foxi* и *E. olivii* — к *Pectenogammarus* (<https://www.marinespecies.org/>). *Litorogammarus karadagiensis* является близким родственником нескольких видов — *Litorogammarus mazestiensis* (Marin & Palatov, 2021), *Litorogammarus dursi* Marin, Palatov & Copilaş-Ciocianu, 2023, *Litorogammarus samuricus* Palatov, Copilaş-Ciocianu & Marin, 2025 и *Litorogammarus glareophilus* Marin, Palatov & Copilaş-Ciocianu, 2025 — по данным молекулярно-генетических анализов [Copilaş-Ciocianu et al., 2025; Marin & Palatov, 2021; Marin et al., 2023]. Ареал *L. karadagiensis* охватывает весь Понто-Каспийский регион с характерной адаптивной радиацией гаммарид этой группы [Гринцов, 2023]. Эволюционная радиация гаммарид характеризуется примечательным разнообразием с точки зрения морфологии и экологии, наравне с уникальными радиациями амфипод озера Байкал [Copilaş-Ciocianu, Sidorov, 2022].

В настоящее время *L. karadagiensis* (вид, описанный ранее как *Echinogammarus karadagiensis* [Grintsov, 2009]), относится к роду *Litorogammarus* [Marin et al., 2023], семейству Gammaridae Latreille, 1802, суперсемейству Gammaroidea Latreille, 1802. Молекулярно-генетические маркеры позволили по-новому взглянуть на систематическое положение семейства Gammaridae [Copilaş-Ciocianu, Sidorov, 2022]. Филогенетический анализ четырёх молекулярных маркеров (генов *Co-I*, 28S рРНК и 18S рРНК, а также гистона *H3*) выявил новую позицию монофилетического суперсемейства Gammaroidea *Echinogammarus* s. l., включающего в себя понто-каспийских гаммарид [Copilaş-Ciocianu et al., 2020], в отличие от ранее представленного филогенетического анализа на основе морфологии [Lowry, Myers, 2013]. Именно на базе молекулярно-генетических маркеров было выдвинуто достаточно доводов в пользу выделения рода *Litorogammarus* [Marin et al., 2023].

Цель работы — на основании данных об изменчивости нуклеотидных последовательностей маркеров гена субъединицы I цитохромоксидазы с митохондриальной ДНК (мтДНК) (*Co-I*) и гена гистона *H3* ядерной ДНК (ядДНК) проверить гипотезу о видовой принадлежности выборки экземпляров гаммарид к ранее описанному виду *Litorogammarus karadagiensis*. Маркеры для гистона *H3*, информативного для видов *L. mazestiensis* и *L. karadagiensis* [Copilaş-Ciocianu et al., 2023], и для *Co-I*, диагностически значимого для идентификации амфипод [Copilaş-Ciocianu et al., 2022], были выбраны для достижения цели настоящего исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучена выборка из шести экземпляров *L. karadagiensis* [Grintsov, 2009], собранных в Батилимане (Южный берег Крыма, 44°25'12" с. ш., 33°41'48" в. д.) 05 июня 2022 г. Материал отбирали вручную в зоне заплеска галечно-песчаного пляжа. Для сравнительного анализа дополнительно использовали последовательности из GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Для всех проб при помощи набора «ДНК-Экстран» («ДНК-Экстран-2», «Синтол», Москва, РФ) согласно протоколу производителя выделили ДНК, которую хранили при –20 °С. Амплификацию для маркера мтДНК *Co-I* и маркера яДНК гистона *H3* проводили с использованием универсальных праймеров (табл. 1) по протоколу: предварительная денатурация при +94 °С (5 мин); 35 циклов, включающих денатурацию при +94 °С (30 с), отжиг праймеров при +45 °С (30 с) и элонгацию при +72 °С (60 с); финальная элонгация при +72 °С (10 мин). Секвенирование проводили с набором BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя. Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Таблица 1. Праймеры, используемые для амплификации и секвенирования изученных маркеров**Table 1.** Primers used for amplification and sequencing of the genetic markers studied

Название праймера	Фрагмент ДНК	Последовательность	Авторы праймера
LCO1490-JJ	<i>Co-1</i>	CHACWAAYCATAAAGATATYGG	Astrin, Stüben, 2008
HCO2198-JJ	<i>Co-1</i>	AWACTTCVGGRTGVCCAAARAATCA	Astrin, Stüben, 2008
H3F	Гистон <i>H3</i>	ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC	Colgan et al., 2000
H3R	Гистон <i>H3</i>	ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC	Colgan et al., 2000

Полученные последовательности были помещены в базу данных BOLD Systems (<https://boldsystems.org/>), а затем — в GenBank NCBI (табл. 2). В анализ включены все известные последовательности представителей рода *Litorogammarus* [Copilaş-Ciocianu et al., 2025] из GenBank NCBI; в качестве внешней группы выбран вид *Chaetogammarus ischnus* [Marin et al., 2023]. После выравнивания длина последовательностей составила 638 пар оснований (п. о.) для *Co-1* и 354 п. о. для гистона *H3*.

Таблица 2. Список образцов и номера последовательностей ДНК *Litorogammarus karadagensis*, депонированных в базы данных BOLD Systems и GenBank NCBI**Table 2.** List of *Litorogammarus karadagensis* samples and accession numbers of DNA sequences deposited in BOLD Systems and GenBank NCBI databases

<i>Litorogammarus karadagensis</i>	Номер BIN в базе BOLD Systems	Номер последовательности гена <i>Co-1</i> в GenBank NCBI	Номер последовательности гена гистона <i>H3</i> в GenBank NCBI
01	BOLD:AGE7470	PV053540	PV053546
02	BOLD:AGE7470	PV053541	PV053547
03	BOLD:AGE7470	PV053542	PV053548
04	BOLD:AGE7470	PV053543	PV053549
05	BOLD:AGE7470	PV053544	PV053550
06	BOLD:AGE7470	PV053545	PV053551

Примечание: BIN — аббревиатура для идентификатора Barcoding Index Number, номера ДНК-штрихкода в базе данных BOLD Systems.

Note: BIN stands for Barcoding Index Number, a unique identifier of a DNA barcode in BOLD Systems.

Анализ последовательностей проводили для каждого маркера гена отдельно. Для реконструкции филогенетических деревьев использовали методы ближайшего соседства (neighbor joining, NJ), максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) и максимальной парсимонии (maximum parsimony, MP), а также байесовский анализ (Bayesian analysis, BA), реализованные в программах MEGA11 [Tamura et al., 2021] и MrBayes 3.2 [Ronquist, Huelsenbeck, 2003]. Построение филогенетических (генных) деревьев проводили для каждого гена по отдельности. При реконструкции деревьев были рассчитаны наиболее подходящие эволюционные модели (jModelTest) [Posada, 2008]. С учётом информационного критерия Акаике лучшими моделями эволюции оказались модели Тамуры — Нея [Tamura, Nei, 1993] TrN+G для *Co-1* и TrN для гистона *H3*. При BA-реконструкции как состоятельные принимали значения стандартного отклонения в разрыве частот (standard deviation of split frequencies) меньше 0,01 [Ronquist, Huelsenbeck, 2003]. Число модельных повторов (генераций) составляло 2 000 000, первые 25 % генераций исключали из анализа как burn in, выборки выполняли для каждой 100-й генерации.

Для идентификации видов по молекулярным последовательностям использовали метод автоматического обнаружения разрывов ДНК-штрихкодов (баркодинг-гэпов, barcoding gaps) в программных пакетах ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery, <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>) [Puillandre et al., 2012] и ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning, <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>) [Puillandre et al., 2021].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ генетических расстояний (p -расстояний) ([Nei, Kumar, 2000], с. 33) подтвердил наличие в исследуемой выборке образцов, которые представляют пять видов: *L. dursi*, *L. glareophilus*, *L. mazestiensis*, *L. samuricus* и *L. karadagiensis*. Межвидовые p -расстояния составили 13–19,5 % (*Co-I*) (исключение — *L. mazestiensis* и *L. samuricus*, $p = 4,3$ %). Различия по p -расстояниям между нашими образцами и *L. karadagiensis* из GenBank NCBI — 1,5 % (*Co-I*) (табл. 3), что соответствует внутривидовым p -расстояниям. Различий по гену гистона *H3* не выявлено.

Таблица 3. Меж- и внутривидовые величины p -расстояний для исследованных маркеров гена *Co-I*

Table 3. Inter- and intraspecies p -distances for *COI* gene markers studied

	<i>LD</i>	<i>LG</i>	<i>LK</i>	<i>LK</i> (наши особи)	<i>LM</i>	<i>LS</i>	<i>CI</i>
<i>LD</i>	0,0063	0,0153	0,0153	0,0153	0,0148	0,0147	0,0160
<i>LG</i>	0,1951	0,0026	0,0135	0,0134	0,0147	0,0146	0,0165
<i>LK</i>	0,1803	0,1348	0,0000	0,0046	0,0143	0,0144	0,0159
<i>LK</i> (наши особи)	0,1787	0,1301	0,0141	0,0000	0,0144	0,0144	0,0159
<i>LM</i>	0,1839	0,1708	0,1765	0,1718	0,0147	0,0070	0,0158
<i>LS</i>	0,1740	0,1661	0,1689	0,1665	0,0428	0,0104	0,0162
<i>CI</i>	0,2241	0,2124	0,2038	0,2053	0,2044	0,2038	n/c

Примечание: ниже диагонали, выделенной полужирным шрифтом, — значения межвидовых p -расстояний для *Co-I*; по диагонали — значения внутривидовых p -расстояний; выше диагонали — значения стандартных ошибок для *Co-I*. *LD* — *Litorogammarus dursi*; *LG* — *Litorogammarus glareophilus*; *LK* — *Litorogammarus karadagiensis*; *LM* — *Litorogammarus mazestiensis*; *LS* — *Litorogammarus samuricus*; *CI* — *Chaetogammarus ischnus*. N/c — не вычислимо.

Note: below the bold-highlighted diagonal, there are the values of interspecific p -distances for *COI*; along the diagonal, there are the values of intraspecific p -distances; above the diagonal, there are the values of standard errors for *COI*. *LD*, *Litorogammarus dursi*; *LG*, *Litorogammarus glareophilus*; *LK*, *Litorogammarus karadagiensis*; *LM*, *Litorogammarus mazestiensis*; *LS*, *Litorogammarus samuricus*; *CI*, *Chaetogammarus ischnus*. N/c, not computable.

По последовательностям *Co-I* оба программных пакета, ABGD и ASAP, выявили четыре видовые группировки для всех использованных вариантов анализа: 1) *L. dursi*; 2) *L. glareophilus*; 3) *L. karadagiensis*; 4) *L. mazestiensis* + *L. samuricus*. Последовательности гена гистона *H3* двух доступных для анализа видов, *L. karadagiensis* и *L. mazestiensis*, были объединены в одну видовую группировку.

Филогенетические реконструкции (BA, ML, NJ и MP) продемонстрировали одинаковые топологии для гена *Co-I*. На полученных дендрограммах исследуемые особи сформировали пять ветвей с высокими поддержками узлов генных деревьев. Для четырёх видов поддержки составили 100 %. Исключением была ветвь *L. samuricus* (BA = 63 %; ML = 66 %; NJ = 97 %; MP = 70 %). Сестринские ветви сформировали *L. mazestiensis* + *L. samuricus* и *L. glareophilus* + *L. karadagiensis* с внешней ветвью *L. dursi* (рис. 1).

Ни одним филогенетическим методом не удалось разделить виды *L. karadagiensis* и *L. mazestiensis*, используя последовательности гена гистона *H3*. На дендрограммах отмечено хаотичное распределение исследованных особей; клад они не образовывали.

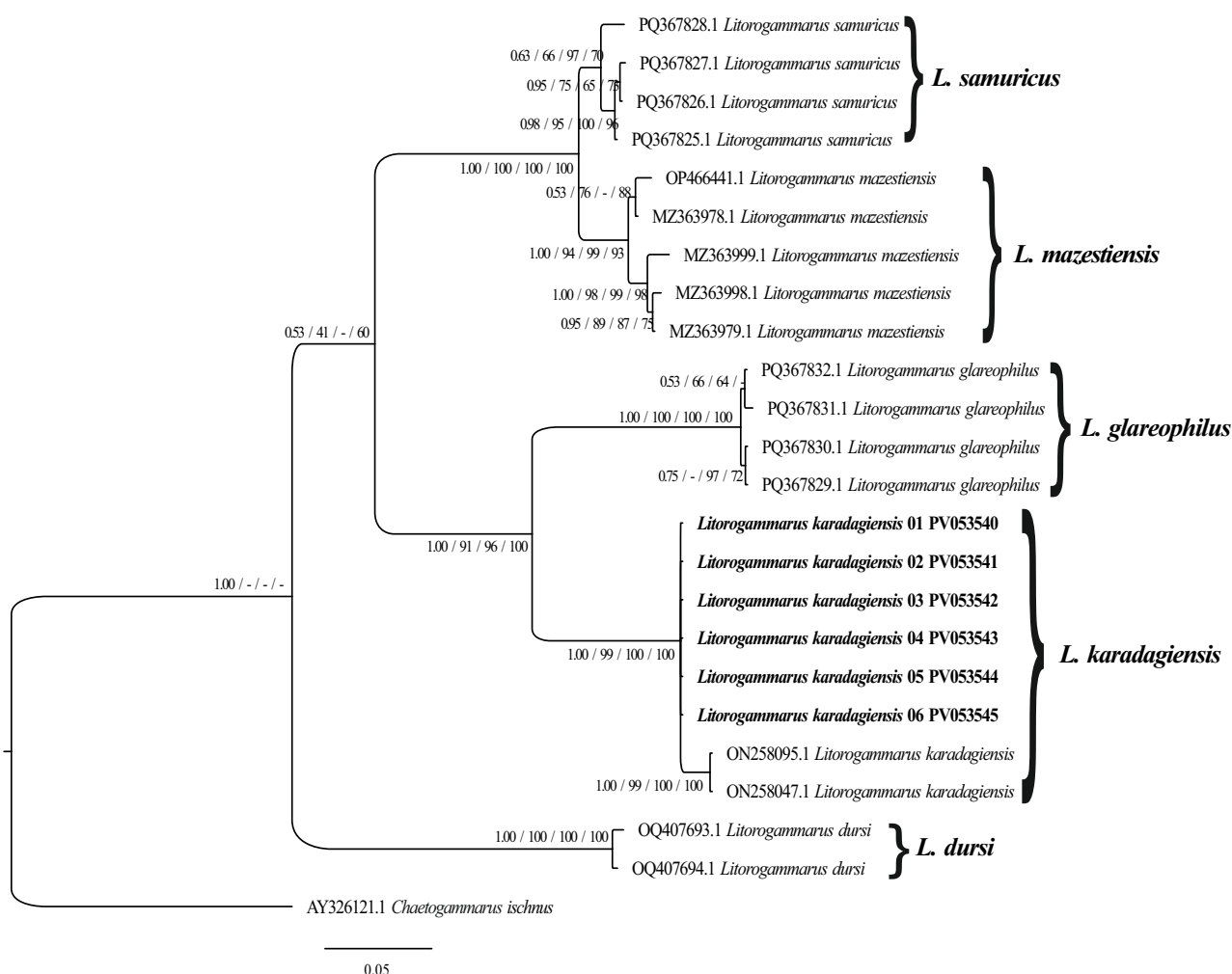


Рис. 1. Филогенетические взаимосвязи представителей рода *Litorogammarus*, реконструированные по последовательностям гена *Co-1*. Вероятностные поддержки (байесовский анализ, BA) и бутстреп-поддержки (метод максимального правдоподобия, ML; метод ближайшего соседства, NJ; метод максимальной парсимонии, MP) узлов генного дерева указаны в следующей последовательности: BA / ML / NJ / MP. Жирным шрифтом выделены шесть наших последовательностей

Fig. 1. Phylogenetic relationships among representatives of the genus *Litorogammarus* reconstructed based on *COI* gene sequences. Nodal support values (BA, Bayesian posterior probabilities; ML, maximum likelihood bootstrap; NJ, neighbor-joining bootstrap; MP, maximum parsimony bootstrap) are indicated in the following order: BA / ML / NJ / MP. Our six sequences are highlighted in bold

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам анализа филограмм, *p*-расстояний, анализов посредством программных пакетов ABGD и ASAP не зафиксировано различий между последовательностями гена гистона *H3* изученной выборки. Следовательно, этот участок яДНК не обладает достаточной разрешающей способностью для видовой идентификации представителей рода *Litorogammarus*.

Результаты филогенетического анализа на основании нуклеотидных последовательностей гена *Co-1* мтДНК подтвердили дифференциацию видов рода *Litorogammarus* на несколько клад, выявленных ранее [Copilaș-Ciocianu et al., 2025]. Кроме того, на генных деревьях выделяются отдельные кластеры представителей *L. mazestensis* и *L. samuricus*, которые имеют поддержанную топологическую дифференциацию. Топологии филогенетических деревьев указывают на эволюционную молодость этих видов, поскольку их ветви разошлись позже, чем ветви *L. glareophilus*

и *L. karadagensis*; возможно, *L. mazestensis* и *L. samuricus* являются молодыми видами. Однако, несмотря на высокие значения поддержек топологии деревьев как в этой работе (см. рис. 1), так и в публикации [Copilaş-Ciocianu et al., 2025], данные анализа *p*-расстояний, а также ABGD- и ASAP-анализов ставят под сомнение выделение *L. samuricus* в качестве самостоятельного вида. Это заключение следует из малых значений межвидовой изменчивости между *L. mazestensis* и *L. samuricus* — 4,3 %; межвидовые значения для других видов рода *Litorogammarus* на 10 % больше. Возможно, более уместно выделить *L. samuricus* в качестве подвида *L. mazestensis*. Для этого необходим тщательный морфологический анализ достаточно большой выборки (с учётом требований статистики) с указанием вариабельности признаков для уточнения таксономического статуса, однако к настоящему времени имеется только дифференциальный диагноз [Copilaş-Ciocianu et al., 2025] между *L. samuricus* и *L. mazestensis*. Все отличия касаются вооружения придатков или тела и некоторых пропорций. Исследования на близком роде *Pectenogammarus* Reid, 1940 [Grintsov, 2009] показали, что вооружение придатков и тела (шипы, щетинки и зубцы) подвержено индивидуальной изменчивости. Это может касаться и пропорций тела, которые, как известно, также подвержены изменениям [Гурьянова, 1951].

Особи *L. karadagensis*, собранные нами из места описания этого вида, образуют самые тесные ветви на филограммах (рис. 1); они имеют минимальные *p*-расстояния (табл. 3), а также одну группу по кластеризации посредством программных пакетов ABGD и ASAP. Последовательности этих особей близки к последовательностям *Co-1* *L. karadagensis* из GenBank NCBI ON258095 и ON258047. Всё это доказывает их принадлежность к одному таксону видового ранга, что подтверждается сравнительными рядами для иерархии различных таксонов (см. ниже заключительный абзац). Полученные нами результаты подтверждают, что *L. karadagensis* является сестринским видом *L. glareophilus*.

Морфология двух видов *Litorogammarus* — *L. karadagensis* и *L. glareophilus* — весьма сходна. Полное описание морфологии *L. karadagensis* дано в публикациях [Гринцов, 2022; Grintsov, 2009], а *L. glareophilus* — в [Copilaş-Ciocianu et al., 2025]. В отличие от других представителей этого рода (*L. dursi*, *L. mazestensis* и *L. samuricus*), *L. karadagensis* и *L. glareophilus* имеют длинные перистые щетинки на следующих элементах ротовых органов и конечностях: на мандибулах, максиллах первой пары, максиллипедах и члениках гнатопод первой и второй пар. Молекулярно-генетический анализ подтвердил морфологическое сходство *L. karadagensis* и *L. glareophilus* за счёт объединения их в сестринскую группу (рис. 1).

Отличия между вышеуказанными видами сводятся к нескольким элементам (по данным [Copilaş-Ciocianu et al., 2025]). У *L. karadagensis* на первой эпимеральной пластинке имеется маленький шипик в субмаргинальной части, у *L. glareophilus* шипика нет. На второй эпимеральной пластинке для *L. karadagensis* указан один шип в субмаргинальной части, для *L. glareophilus* — два. Однако, как показывают исследования [Гринцов, 2024], вооружение эпимеральных пластинок шипами и щетинками подвержено значительной индивидуальной изменчивости; использовать эти элементы как отличительные для двух видов неправомерно. Как указано в работе [Copilaş-Ciocianu et al., 2025], *L. karadagensis* имеет почти округлый базиподит на переопод пятой пары, тогда как у *L. glareophilus* базиподит более узкий и вытянутый. Это различие подтверждается при анализе *L. karadagensis*. Упоминается также различие вооружения уросомита 2 [Copilaş-Ciocianu et al., 2025]. Указано, что у вида *L. karadagensis* два маргинальных шипа и один латеральный, а у *L. glareophilus* два маргинальных шипа и два латеральных. Однако исследования вооружения двух представителей рода *Pectenogammarus* [Гринцов, 2024] показали, что вооружение всех уросомальных сегментов тоже подвержено индивидуальной изменчивости и не может быть надёжным маркером вида. Таким образом, твёрдо диагностическим остаётся один признак — форма базиподита пятой пары переопод.

В сводке по генетическим расстояниям для более чем 20 000 видов позвоночных и беспозвоночных *p*-расстояния для генов *Co-1* и *Cyt-b* мтДНК были определены для пяти иерархических групп: популяций одного вида (1); таксонов различного ранга, включая подвиды и полувиды (2); видов одного рода (3); видов различных родов одного семейства (4); видов различных семейств одного отряда (5). Средние невзвешенные значения *p*-расстояний для пяти представленных групп равны:

- *Cyt-b* для (1) — $1,46 \pm 0,34$, (2) — $5,35 \pm 0,95$, (3) — $10,46 \pm 0,96$, (4) — $17,99 \pm 1,33$, (5) — $26,36 \pm 3,88$;
- *Co-1* для (1) — $0,72 \pm 0,16$, (2) — $3,78 \pm 1,18$, (3) — $10,87 \pm 0,66$, (4) — $15,00 \pm 0,90$, (5) — $19,97 \pm 0,80$.

Обратим внимание, что подвиды и полувиды имеют величины $5,35 \pm 0,95$ (*Cyt-b*) и $3,78 \pm 1,18$ (*Co-1*), а виды — $10,46 \pm 0,96$ (*Cyt-b*) и $10,87 \pm 0,66$ (*Co-1*) [Kartavtsev, 2009a]; это соответствует нашим выводам относительно таксономического статуса *L. samuricus*. Результаты проведённого анализа нуклеотидной дивергенции хорошо согласуются с другими данными о генетической дивергенции в иерархии таксонов, включая небелковые маркеры генов и полные митохондриальные геномы [Kartavtsev, 2021; Kartavtsev, Masalkova, 2024; Redin, Kartavtsev, 2022], подтверждая приведённые в этой статье таксономические выводы. Кроме того, эти данные подтверждают обобщение о том, что в животном мире на молекулярном уровне преобладает филетическая эволюция, а видообразование идёт в основном на основе географической модели [Kartavtsev, 2009a, b, 2011a, b, 2013, 2021].

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦМБ ДВО РАН «Биоразнообразие Мирового океана: таксономия и эволюция, репродуктивная биология, биогеография и биоинвазии» (№ 24021900011-9) и ФИЦ ИнБЮМ «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (№ 124022400152-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гринцов В. А. Амфиподы Чёрного моря : иллюстрированный атлас-определитель / ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН». Севастополь : ФИЦ ИнБЮМ, 2022. 476 с. [Grintsov V. A. *Amphipods of the Black Sea : an illustrated guide atlas* / A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS. Sevastopol : IBSS, 2022, 476 p. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/12021>
2. Гринцов В. А. Экологические группы, экоморфы и жизненные формы амфипод (Crustacea, Amphipoda) Чёрного и Азовского морей // *Экосистемы*. 2023. № 33. С. 38–63. [Grintsov V. A. Ecological groups, ecomorphs and life forms of amphipods (Crustacea, Amphipoda) of the Black Sea and the Sea of Azov. *Ekosistemy*, 2023, no. 33, pp. 38–63. (in Russ.)]. <https://elibrary.ru/lwrmaa>
3. Гринцов В. А. Уточнение морфологии и экологии двух видов рода *Pectenogammarus* Reid, 1940 (Gammaridae, Amphipoda) из Чёрного и Азовского морей (Крым) // *Экосистемы*. 2024. № 38. С. 124–139. [Grintsov V. A. Clarification of morphology and ecology of two species of the genus *Pectenogammarus* Reid, 1940 (Gammaridae, Amphipoda) from the Black and Azov seas (Crimea). *Ekosistemy*, 2024, no. 38, pp. 124–139. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.29039/2413-1733-2024-38-124-139>
4. Гурьянова Е. Ф. Боклопавы морей СССР и сопредельных вод (Amphipoda – Gammaridea). Москва ; Ленинград : Изд-во АН СССР, 1951. 1029 с. (Определители по фауне СССР, издаваемые Зоологическим институтом Академии наук ; вып. 41). [Guryanova E. F. *Bokoplavy morei SSSR i sopredel'nykh vod (Amphipoda – Gammaridea)*. Moscow ; Leningrad: Izd-vo AN SSSR, 1951, 1029 p. (Opredeliteli po faune SSSR, izdavaemye Zoologicheskim institutom Akademii nauk ; iss. 41). (in Russ.)]
5. Astrin J. J., Stüben P. E. Phylogeny in cryptic weevils: Molecules, morphology and new genera of western Palaearctic Cryptorhynchinae

- (Coleoptera: Curculionidae). *Invertebrate Systematics*, 2008, vol. 22, no. 5, pp. 503–522. <https://doi.org/10.1071/is07057>
6. Colgan D. J., Ponder W. F., Eggler P. E. Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationships assessed using partial 28S rDNA and histone *H3* sequences. *Zoologica Scripta*, 2000, vol. 29, iss. 1, pp. 29–63. <https://doi.org/10.1046/j.1463-6409.2000.00021.x>
 7. Copilaș-Ciocianu D., Borko Š., Fišer C. The late blooming amphipods: Global change promoted post-Jurassic ecological radiation despite Palaeozoic origin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2020, vol. 143, art. no. 106664 (12 p.). <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106664>
 8. Copilaș-Ciocianu D., Marin I., Palatov D. Evolution and biogeography of *Litorogammarus* Marin, Palatov & Copilaș-Ciocianu, 2023 (Amphipoda: Gammaridae) with description of two new Caspian endemic species. *Systematics and Biodiversity*, 2025, vol. 23, iss. 1, art. no. 2454025 (27 p.). <https://doi.org/10.1080/14772000.2025.2454025>
 9. Copilaș-Ciocianu D., Palatov D., Rewicz T., Sands A. F., Arbačiauskas K., van Haaren T., Hebert P. D. N., Grabowski M., Marin I. A widespread Ponto-Caspian invader with a mistaken identity: Integrative taxonomy elucidates the confusing taxonomy of *Trichogammarus trichiatus* (= *Echinogammarus*) (Crustacea: Amphipoda). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2023, vol. 198, no. 3, pp. 821–846. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad010>
 10. Copilaș-Ciocianu D., Rewicz T., Sands A. F., Palatov D., Marin I., Arbačiauskas K., Hebert P. D. N., Grabowski M., Audzijonyte A. A DNA barcode reference library for endemic Ponto-Caspian amphipods. *Scientific Reports*, 2022, vol. 12, art. no. 11332 (14 p.). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15442-w>
 11. Copilaș-Ciocianu D., Sidorov D. Taxonomic, ecological and morphological diversity of Ponto-Caspian gammaroidean amphipods: A review. *Organisms Diversity & Evolution*, 2022, vol. 22, iss. 2, pp. 285–315. <https://doi.org/10.1007/s13127-021-00536-6>
 12. Grintsov V. A new amphipod species *Echinogammarus karadagiensis* sp. n. (Amphipoda, Gammaridae) from Crimean coasts (Black Sea, Ukraine). *Vestnik zoologii*, 2009, vol. 43, no. 2, pp. 23–26. <https://elibrary.ru/xkirkl>
 13. Kartavtsev Y. P. Sequence diversity at *Cyt-b* and *Co-I* mtDNA genes in animal taxa proved Neo-Darwinism. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology*, 2013, vol. 1, iss. 4, art. no. 1000120 (5 p.). <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000120>
 14. Kartavtsev Y. P., Masalkova N. A. Structure, evolution, and mitochondrial genome analysis of mussel species (Bivalvia, Mytilidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, vol. 25, iss. 13, art. no. 6902 (31 p.). <https://doi.org/10.3390/ijms25136902>
 15. Kartavtsev Y. Ph. Analysis of sequence diversity at mitochondrial genes on different taxonomic levels. Applicability of DNA based distance data in genetics of speciation and phylogenetics. In: *Genetic Diversity* / C. L. Mahoney, D. A. Springer (Eds). New York : Nova Science Publishers, 2009a, chap. 1, pp. 1–50.
 16. Kartavtsev Y. Ph. Divergence at *Cyt-b* and *Co-I* mtDNA genes on different taxonomic levels and genetics of speciation in animals. *Mitochondrial DNA*, 2011a, vol. 22, iss. 3, pp. 55–65. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588215>
 17. Kartavtsev Y. Ph. *Molecular Evolution and Population Genetics*. Vladivostok : Far Eastern State University, 2009b, 280 p. (in Russ.; content, table and figure captions are in Eng.)
 18. Kartavtsev Y. Ph. Sequence divergence at mitochondrial genes in animals: Applicability of DNA data in genetics of speciation and molecular phylogenetics. *Marine Genomics*, 2011b, vol. 4, iss. 2, pp. 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2011.02.002>
 19. Kartavtsev Yu. Ph. Some examples of the use of molecular markers for needs of basic biology and modern society. *Animals*, 2021, vol. 11, iss. 5, art. no. 1473 (24 p.). <https://doi.org/10.3390/ani11051473>
 20. Lowry J. K., Myers A. A. A phylogeny and classification of the Senticaudata subord. nov. (Crustacea: Amphipoda). *Zootaxa*, 2013, vol. 3610, no. 1, pp. 1–80. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3610.1.1>
 21. Marin I., Palatov D. New and non-alien: *Echinogammarus mazestiensis* sp. n. from the southwestern Caucasus (Amphipoda: Gammaridae). *Zoology in the Middle East*, 2021, vol. 67, iss. 4, pp. 309–320. <https://doi.org/10.1080/09397140.2021.1949139>

22. Marin I., Palatov D., Copilaş-Ciocianu D. The remarkable Ponto-Caspian amphipod diversity of the lower Durso River (SW Caucasus) with the description of *Litorogammarus dursi* gen. et sp. nov. *Zootaxa*, 2023, vol. 5297, no. 4, pp. 483–517. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5297.4.2>
23. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York : Oxford University Press, 2000, 333 p.
24. Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, vol. 25, iss. 7, pp. 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
25. Puillandre N., Brouillet S., Achaz G. ASAP: Assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 2021, vol. 21, iss. 2, pp. 609–620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
26. Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 2012, vol. 21, iss. 8, pp. 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
27. Redin A. D., Kartavtsev Y. P. The mitogenome structure of righteye flounders (Pleuronectidae): Molecular phylogeny and systematics of the family in East Asia. *Diversity*, 2022, vol. 14, iss. 10, art. no. 805 (27 p.). <https://doi.org/10.3390/d14100805>
28. Ronquist F., Huelsenbeck J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, vol. 19, iss. 12, pp. 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
29. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, vol. 10, iss. 3, pp. 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
30. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, vol. 38, iss. 7, pp. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

**VARIABILITY OF NUCLEOTIDE SEQUENCES
IN TWO GENE MARKERS (*COI* AND *H3*)
OF *LITOROGAMMARUS KARADAGIENSIS* (GRINTSOV, 2009)
(AMPHIPODA, GAMMARIDAE)
AND THE SYSTEMATICS OF THE GENUS *LITOROGAMMARUS***

A. Zolotova¹, V. Grintsov², V. Ryabushko², and Yu. Kartavtsev¹

¹A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, Russian Federation

²A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: anna.o.zolotova@gmail.com

We investigated intra- and interspecific variability of mitochondrial DNA cytochrome *c* oxidase subunit I gene (*COI*) and nuclear DNA histone *H3* gene in *Litorogammarus* representatives. Our results indicate that histone *H3* molecular marker is not suitable for species identification in this genus due to its insufficient sequence variability. The taxonomy of the studied species was refined based on the analysis of *COI* gene marker. Comprehensive analysis of genetic distances (*p*-distances) performed involving ABGD and ASAP algorithms suggested that *COI* gene fragment is a diagnostic marker for species identification in *Litorogammarus*. Phylogenetic reconstruction based on four methods and analysis of the resulting gene trees for *COI* revealed close genetic relationship between *L. karadagiensis* and *L. glareophilus*. For these two species, we found several common morphological features: the presence of plumose setae on the mandibles, first maxillae, maxillipeds, and on the articles of the first and second gnathopods. The combined use of molecular and morphological data proved to be highly valuable for species identification and for resolving taxonomic issues within this group of amphipods.

Keywords: mtDNA, nDNA, *COI*, histone *H3*, *p*-distances, *Litorogammarus karadagiensis*, *Litorogammarus*, Gammaridae, Amphipoda