

ОБОЛОЧНИКИ – НАШИ БЛИЖАЙШИЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫЕ РОДСТВЕННИКИ

В.В. Исаева^{1, 2}, А.Г. Голубев³

¹ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва (Россия);

² Институт биологии моря, Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток (Россия);

³ Научно-исследовательский институт онкологии им. проф. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург (Россия)

Эл. почта: vv_isaeva@mail.ru; lxglbv@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 14.08.2017; принята к печати 26.09.2017

Представители подтипа Tunicata (Оболочники), из которых наиболее известны асцидии, по морфологии, жизненным циклам и способам питания и размножения резко отличаются от всех других хордовых и более всего от позвоночных (Vertebrata). Однако данные сравнительной геномики и эволюционной биологии развития свидетельствуют, что наиболее близки к позвоночным не головохордовые (Cephalochordata), обычно именуемые ланцетниками, а именно оболочники. По этой причине молекулярно-биологические исследования оболочников важны для исследований по широкому кругу биологических вопросов. Ключевым событием, определившим ответвление оболочников от остальных хордовых, было приобретение гена синтазы целлюлозы путем горизонтального переноса от актинобактерий. Возникшая на этой основе способность образовывать оболочку, выполняющую защитную и опорную функции, снизила давление естественного отбора на повышение подвижности и сложности поведения для самосохранения и питания. Утрата генов, обеспечивающих ставшие ненужными функции, и соответствующее упрощение генотипа и фенотипа создали условия для быстрой, сравнительно с головохордовыми и позвоночными, скорости эволюции оболочников. Альтернативные эволюционные траектории Tunicata и Vertebrata оказались сопряженными с существенными различиями по клеточным ресурсам и длительности развития. Высокая генетическая пластичность оболочников способствует их адаптации к происходящим в настоящее время климатическим изменениям и, соответственно, их инвазивности, что делает ряд видов опасными для экологического баланса в морских экосистемах.

Ключевые слова: оболочники, хордовые, филогенез, эмбриогенез, жизненный цикл, эволюционная геномика.

TUNICATES: OUR CLOSEST INVERTEBRATE RELATIVES

V.V. Isaeva^{1, 2}, A.G. Golubev²

A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow, Russia;

Institute of Marine Biology, Vladivostok, Russia

N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Saint Petersburg, Russia

E-mail: vv_isaeva@mail.ru; lxglbv@rambler.ru

The species referred to the subphylum Tunicata, among which ascidia are best known, drastically differ by their morphology, life cycles and nutritional and reproductive strategies from all other chordates, most notably vertebrates. However, data related to comparative genomics and evolutionary biology of development suggest that not Cephalochordates, which are commonly known as lancelets, but Tunicates are closest relatives of vertebrate animals. That is why molecular-biological studies of tunicates are important for gaining insights into a very wide range of biological problems. The key event that determined branching of the tunicate lineage from other chordates was the acquisition of the cellulose synthase gene by horizontal transfer from an actinobacterium. The resulting ability to form an envelope (tunic), which can perform protective and supportive functions, reduced selection pressure towards increasing motility and more complex behaviors employed in self-protection and nutrition. The loss of genes responsible for functions that became unneeded and the corresponding simplification of the genotype and phenotype provided conditions for accelerated evolution, compared with that of Cephalochordates and Vertebrates. The alternative evolutionary trajectories of Tunicates and Vertebrates were associated with significant differences in cell resources and duration of embryogenesis. The high genetic plasticity of Tunicates facilitates their rapid genetic adaptation to current climatic changes making a number of tunicate species highly invasive and dangerous for ecological balances in marine ecosystems.

Keywords: Tunicates, Chordates, phylogenesis, embryogenesis, life cycle, evolutionary genomics.

Введение

В эволюции жизни на Земле можно выделить этапы, вызывающие особый интерес в связи с их значением для происхождения типа хордовых, класса млекопитающих и вида *Homo sapiens*. К числу таких этапов относятся выделение самого вида *sapiens* из рода

Homo (250–400 тыс. лет назад), выделение *Homo* из семейства приматов (2,3 млн лет назад), приматов из класса млекопитающих (50–80 млн лет назад), млекопитающих из подтипа позвоночных (около 200 млн лет назад) и позвоночных из типа хордовых (около 550 млн лет назад). Именно у хордовых впервые по-

явились предпосылки формирования головы с черепом, содержащим мозг.

В современный тип хордовых входит подтип позвоночных, или «черепных» (Vertebrata, или Craniata), насчитывающий более 60000 видов, из которых более половины приходится на рыб, и еще два подтипа: головохордовые (Cephalochordata), которых обычно называют ланцетниками, – около 30 видов, и оболочники (Tunicata, или Urochordata), насчитывающие более 2500 видов. Представители всех трех подтипов демонстрируют, по меньшей мере на некоторых этапах развития, наличие дорсальной нервной трубки, нотохорда, фарингеальных жаберных щелей, сегментированной мускулатуры тела и хвоста [41, 72, 86].

Позвоночные не нуждаются в особом представлении.

Хрестоматийный пример головохордовых – ланцетник (рис. 1) – впервые был описан Палласом в 1774 г. как моллюск, *Limax lanceolatus* [61], затем спустя 62 года признан близким к бесчелюстным позвоночным и переименован в *Amphioxus lanceolatus* [93]; позже было восстановлено более раннее название рода – *Branchiostoma* [40]. По данным реестра видов морских животных (<http://www.marinespecies.org>), ныне существующие головохордовые включают 25 видов этого рода, в том числе «классический» ланцетник *B. lanceolatum*, шесть видов рода *Epigonichthys* и два вида *Asymmetron*.

Тело этих мелких (до 6-8 см длиной) животных имеет удлинённую сплюснутую с боков форму. По оси тела проходит упругая хорда, состоящая из сильно вакуолизованных клеток, а по бокам от нее располагаются мышцы, благодаря сокращениям которых тело изгибается из стороны в сторону; так ланцетник плавает. Над хордой проходит нервная трубка, а под ней – кишечник. В стенках передней части кишки (глотки) имеются жаберные щели, ведущие в околожаберную (перибранхиальную) полость, открывающуюся наружу небольшим отверстием. На переднем конце тела находится ротовое отверстие, недалеко от заднего конца – анальное и за ним – еще одна существенная часть типичного плана строения хордовых – хвост.

Оболочники (Tunicata) в сравнении с головохордовыми гораздо более многочисленны, разнообразны и распространены. Свое название подтип Tunicata получил еще в начале XIX в. от Ж.-Б. Ламарка [52] по общему признаку: кожный эпителий взрослых животных выделяет на своей поверхности студенистый или более плотный слой – так называемую тунику. В состав туники, как было показано К.Э. Шмидтом (1854) и М. Бертло (1859), входит материал, позже идентифицированный как целлюлоза (см. [38, 50]). Способность синтезировать ее разительно отличает оболочников от всех других представителей животного мира. Туника выполняет защитную и опорную функции,

а также принимает участие в формировании фильтрационного аппарата. Большинство оболочников питаются, пропуская воду через орган, где задерживаются мелкие частицы, в том числе планктон. Такой способ питания может быть вполне эффективным, когда не организм движется в среде, а среда прокачивается через организм [41].

План строения тела оболочников (рис. 1) характеризуется U-образным кишечником с входным и выводным сифонами, перфорированной бранхиальной полостью и содержащей целлюлозу туникой. Среди оболочников имеются как свободноплавающие, так и ведущие прикрепленный образ жизни, одиночные и колониальные формы, причем последние совершенно несвойственны другим хордовым [41, 86].

Ископаемые остатки свидетельствуют, что оболочники, головохордовые и бесчелюстные позвоночные

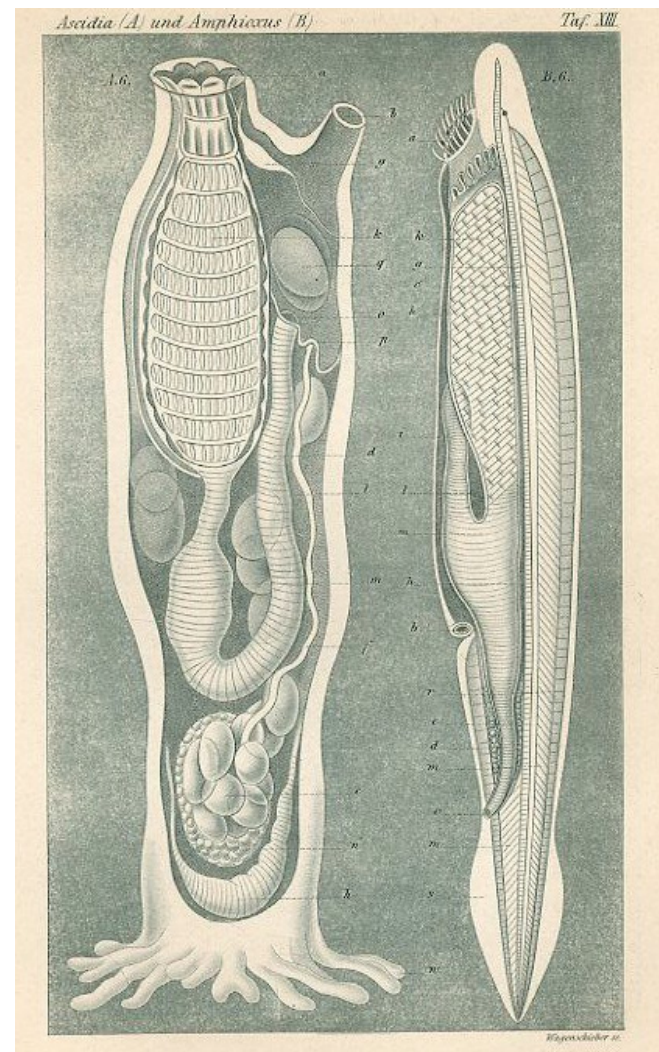


Рис. 1. Рисунок Эрнста Геккеля, изображающий в разрезе справа ланцетника (вид сбоку) и, слева, асцидию

возникли уже в раннем кембрии (см. [37]). Древнейшие палеонтологические следы туникат датируются временем 550 млн лет назад [7]. Оставившие их организмы отнесены к классу асцидий (Asciacea).

Обсуждение происхождения и ранней эволюции хордовых началось еще в середине XIX в. Разные авторы выводили хордовых от немертин, головоногих моллюсков, кольчатых червей, членистоногих, полухордовых... Самых известных представителей оболочников – асцидий – долгое время причисляли к моллюскам, и только после эмбриологических исследований А.О. Ковалевского [51], описавшего дорсальную нервную трубку, нотохорд и латеральные мышечные клетки у личинки асцидий, прояснилась принадлежность асцидий к типу хордовых. А. Вилли в 1984 г. [95] впервые сформулировал мысль о том, что самыми примитивными из ныне живущих хордовых являются ланцетники, а оболочники произошли от свободноплавающих хордовых, но деградировали из-за сидячего образа жизни.

Общепринятой гипотезы об эволюционном возникновении хордовых нет: предполагалось педоморфное, неотеническое происхождение хордовых от личинки предковых форм, имевших, подобно асцидиям, взрослую сидячую форму, а также существование пелагического либо червеобразного общего предка хордовых, сходного с кишечнордых полухордовыми (см. [4, 12, 41, 86]). Реконструкция общего предка затрудняется потерей слишком многих генов и морфологических структур у оболочников, скорость эволюции которых выше, чем у позвоночных и ланцетников [41]. Ланцетник же рассматривается в качестве «живого ископаемого», близкого по морфофункциональной организации к последнему общему предку хордовых [41, 86].

Возможные варианты филогенетических отношений между тремя подтипами хордовых показаны на рис. 2. Значимость различий между ними привела к предложению повысить ранг ныне признанных подтипов, составляющих тип хордовых, до уровня трех-

вых типов: Cephalochordata, Urochordata и Vertebrata, а Chordata рассматривать как супертип [72]. По практически полностью сложившемуся консенсусу правильным является вариант А (см. ниже).

Многие противоречия в вопросе о филогенезе оболочников объясняются тем, что разные авторы базируются в своих суждениях на различных наборах немногих признаков. А между тем, как было отмечено В.Н. Беклемишевым [2, с. 11], «организм есть нечто непрерывно меняющееся, он есть морфопроект, и все стадии, и весь ход его жизненного цикла представляют объект морфологии». В жизненном цикле все звенья взаимосвязаны, так что изменения, коснувшиеся одного звена, прямо или косвенно отражаются и на остальных. Поэтому в суждениях об эволюции животных нужно учитывать и сравнивать все стадии жизненного цикла, а не отдельные произвольно выбранные признаки.

Постоянным на всех стадиях жизненного цикла многоклеточных животных, за редкими исключениями¹, остается генотип. Однако надежность выводов о филогенетических отношениях на основе данных молекулярной генетики, равно как и любых других, в том числе морфологических и эмбриологических, зависит как от числа учтенных признаков, так и от числа видов, представляющих каждый из таксонов, взятых для изучения. Поэтому первые попытки молекулярно-филогенетического анализа при включении в него оболочников в 1990-х – начале 2000-х гг. были выполнены на вынужденно ограниченных массивах данных, и неизбежно неоднозначные выводы толковались в пользу традиционных представлений, по которым оболочники отделились от общих предков хордовых раньше, чем произошло отделение предков ланцетника от предков позвоночных (см. [34, 63]).

Убедительные основания для пересмотра этих взглядов были представлены в 2006 г. в получившей

¹ У некоторых представителей Ecdysozoa – отдельных Nematoda и немногих Arthropoda – наблюдается диминуция хроматина и элиминация хромосом в раннем эмбриогенезе.

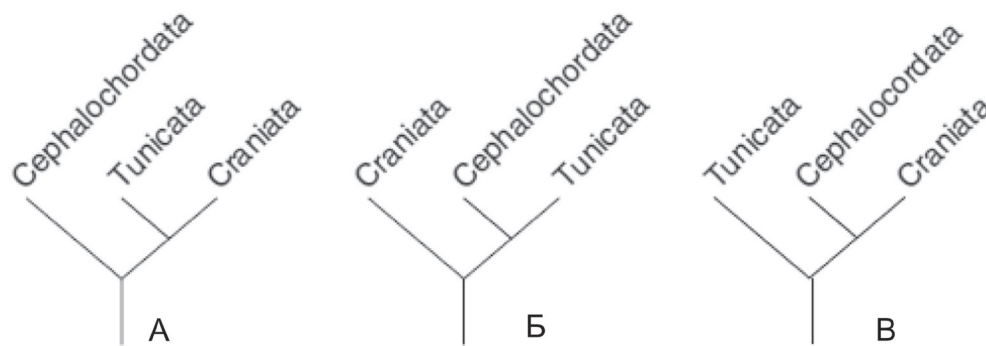


Рис. 2. Варианты филогенетических отношений между основными таксонами хордовых



огромный резонанс работе, где анализировались последовательности 146 генов, общих для 34 видов различных таксономических групп, в том числе четырех представителей туникат [22]. Был сделан вывод, что головохордовые отделились от общей эволюционной линии хордовых раньше, чем оболочники, и поэтому более близкими родственниками позвоночных являются не ланцетники, как можно ожидать на основании сходства их строения с низшими позвоночными, а асцидии и другие оболочники (рис. 2А), несмотря на явные отличия взрослой формы от любого из позвоночных.

По причине филогенетической близости туникат к позвоночным результаты исследования молекулярно-биологических основ эмбриогенеза туникат приобрели в настоящее время особое значение для всей эволюционной биологии развития (evo-devo). Тем не менее, исследования на туникатах не привлекают столь широкого внимания, какого заслуживают. Основная цель данного обзора состоит в том, чтобы вывести оболочников и посвященную им литературу на всеобщее обозрение. В первой части обзора будут описаны классические представления о морфофункциональных особенностях туникат. Во второй части будет представлена литература по молекулярно-филогенетическим исследованиям туникат. В третьей части будут отмечены некоторые связи между этими двумя аспектами их изучения.

1. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТУНИКАТ В РАЗВИТИИ И ЭВОЛЮЦИИ

1.1. Вопросы классификации

Подтип оболочников (Tunicata, или Urochordata) традиционно делится на три класса: Ascidiacea, объеди-

няющий одиночных и колониальных седентарных животных трех отрядов (Stolidobranchia, Aplousobranchia, Phlebobranchia); Appendicularia (или Larvacea), пелагическая взрослая стадия которых сходна с личинкой (larva) других представителей оболочников, например, асцидий; Thaliacea, включающий три отряда пелагических взрослых форм со сложным жизненным циклом (сальпы Salpida, огнетелки Pyrosomida, бочончики Doliolida) (рис. 3). Известно более 2000 видов асцидий, около 72 видов Thaliacea и около 20 видов аппендикулярий [41, 86].

Аппендикулярии, будучи во взрослом состоянии сходными по строению с личинками, а не взрослыми формами других оболочников, отличаются от всех еще и тем, что туника у них отделяется от поверхности тела, расширяется в объеме и образует «домик», намного превышающий в размерах находящийся в нем организм длиной не более 2 мм. Домик может иметь весьма сложную структуру, обеспечивающую фильтрацию жидкости, которая прокачивается через домик в результате биения хвоста его обитателя. Когда фильтр оказывается забитым, аппендикулярия выплывает из него, имея уже прилегающий к ней новый «домик», который остается только «надуть». Старые домики оседают вместе со значительными количествами содержащейся в них целлюлозы, что может вносить существенный вклад в биогеохимические углеродные циклы [96].

При учете дополнительных особенностей строения, развития и молекулярно-филогенетических обстоятельств, которые отчасти рассмотрены ниже, над классификацией оболочников повисает столько вопросов, что консенсус здесь еще отнюдь не достигнут. В частности, некоторые молекулярно-филогенетические данные по оболочникам свидетельствуют о монофилии Appendicularia и Thaliacea, но не Ascidiacea,

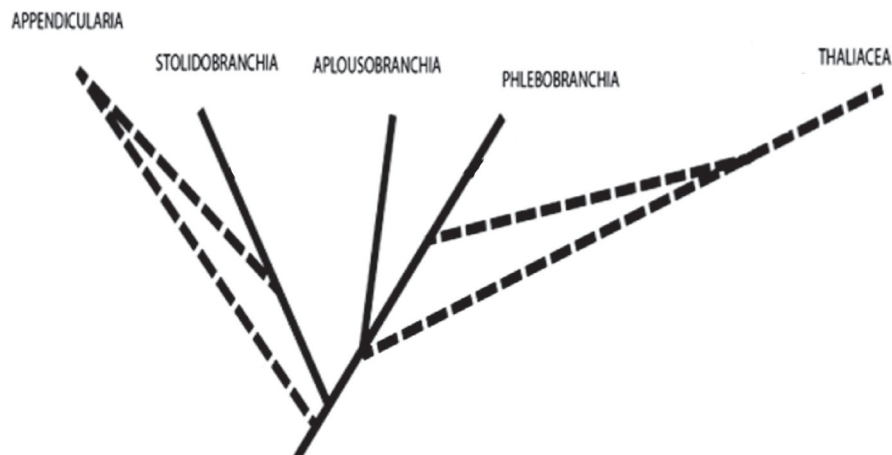


Рис. 3. Филогенетические отношения между оболочниками (по [86]). Пунктиром показаны случаи недостаточных данных для выбора одного из нескольких вариантов

разные отряды которых имеют, по-видимому, парафилетическое происхождение (см. [41, 86]).

1.2. Эмбриогенез оболочников в сравнении с другими хордовыми

В 1905 г. Конклин [16] обнаружил детерминированное, названное им «мозаичным» дробление эмбрионов асцидии *Styela* и проследил судьбу отдельных клеточных линий зародыша. Столь кропотливое исследование клеточной судьбы в эмбриогенезе стало возможным потому, что зародыши асцидий (и других оболочников) состоят из малого числа клеток сравнительно с позвоночными. С тех пор эмбриологи обычно различают детерминированный (мозаичный) и регулятивный типы развития; это разделение связано со сроками становления проморфологии зародышей, ее градиентным или мозаичным характером и возможностью регуляции при удалении части. У животных с мозаичным, детерминированным типом развития (преформацией) спецификация клеток и зачатков происходит в период дробления, тогда как у животных с регулятивным развитием (эпигенезом) спецификация зачатков осуществляется позднее, в полях генных регуляторных сетей и клеточных взаимодействий.

Если дробление туникат характеризуется детерминированностью судьбы бластомеров, то для ланцетника и позвоночных, как и для большинства Deuterostomia, типично регулятивное развитие, проходящее через стадию эквипотентных бластомеров, судьба которых весьма пластична, а не predetermined столь жестко, как у малоклеточных зародышей с мозаичным развитием.

Клеточные ресурсы роста и развития туникат, ланцетника и позвоночных весьма существенно различаются уже в конце дробления зиготы, к началу гастрюляции [10, 67] (табл. 1).

Табл. 1

Число клеток к началу гастрюляции у представителей хордовых (по [67])

Животные	Число делений	Число клеток
<i>Oikopleura</i> (аппендикулярии)	5–6	38
<i>Styela</i> (асцидии)	6–7	76
<i>Amphioxus</i> (ланцетник)	9–10	780
<i>Petromyzon</i> (минога)	11	2200
<i>Triturus</i> (тритон)	14	1600

Сравнение числа делений дробления и числа клеток зародыша к началу гастрюляции в пределах Chordata показывает, что гастрюляция аппендикулярии *Oikopleura* и асцидии *Styela* начинается раньше, чем у ланцетника *Amphioxus* (*Branchiostoma*). У мино-

ги *Petromyzon* и амфибии *Triturus* число клеток зародыша к началу гастрюляции многократно возрастает по сравнению с представителями оболочников. Таким образом, среди хордовых начало гастрюляции замедлено (отложено) у представителей позвоночных, что трактуется как проявление неотения [67]. У зародышей позвоночных по сравнению с беспозвоночными представителями Chordata наблюдается увеличение числа делений дробления и существенное возрастание числа эмбриональных клеток к стадии гастрюляции. Данные о числе клеток к началу гастрюляции, полученные другими исследователями, несколько отличаются, не изменяя общую картину [31]: у *Oikopleura dioica* гастрюляция начинается еще на 32-клеточной стадии, тогда как для асцидий указано начало гастрюляции, приходящееся на стадию 110 клеток.

Гастрюляция сопровождается дифференцировкой клеток развивающегося организма животного, в итоге у аппендикулярии *Oikopleura* дифференцирующиеся части тела, например, нотохорд и мускулатура, формируются меньшим числом клеток по сравнению с асцидией, ланцетником и позвоночными. У аппендикулярии и асцидии дифференцировка ускорена, а у ланцетника и представителей позвоночных – замедлена. У аппендикулярий в наибольшей мере выражена преждевременная дифференцировка структур взрослого организма на эмбриональной или личиночной стадии (адультация); у асцидий наблюдаются различные, но меньшие степени адультации [86].

Гастрюляция у ланцетника начинается тремя делениями дробления позже, что дает значительный прирост числа клеток до начала их дифференциации. Замедление же развития на ранней стадии (неотения) с увеличением числа клеток и тем самым потенциала усложнения тканей и увеличения размера тела наиболее выражено у позвоночных [10, 67].

И неотения, и адультация – проявления гетерохронии (см. также ниже раздел 3). Предполагается, что такого рода гетерохронии обусловили расхождение линий, ведущих к туникатам и позвоночным, как альтернативных эволюционных траекторий [67, 86]. В таком случае оболочники могут рассматриваться как возникшие путем ускорения дифференцировки клеток; такое ускорение в высшей степени выражено у аппендикулярий, проявляясь в редукции и размера тела, и длительности жизни организма. Развитие *Oikopleura dioica* от зиготы до взрослого организма длится всего 24 часа, весь жизненный цикл, в зависимости от температуры, занимает не более 10 дней, завершаясь при температуре 20 °C за 5 дней [41, 86]. Позвоночных же характеризует замедление развития (неотения) с возрастанием числа клеток, размера тела и длительности жизни.

После завершения гастрюляции осуществляется специфичный для хордовых животных морфогене-

тический процесс нейруляции – формирования дорсальной нервной трубки эпителием нервной пластинки. Центральная нервная система туникат, как и у позвоночных, формируется за счет свертывания нервной пластинки вдоль оси тела в нервную трубку, хотя число нервных клеток очень мало по сравнению с позвоночными. В пределах подтипа оболочников редукция числа клеток нервной пластинки ясно выражена у *Oikopleura* сравнительно с асцидиями *Ciona* и *Halocynthia* (см. [86]).

У позвоночных важный дополнительный онтогенетический и эволюционный резерв морфогенеза представлен плюрипотентными стволовыми клетками нервного гребня, формирующегося на дорсальной поверхности зародыша после смыкания краев нервной трубки. Многочисленные мигрирующие клетки нервного гребня осуществляют «второй раунд развития» зародышей позвоночных, давая начало примерно 20 различным клеточным типам, участвующим в образовании многих тканей, включая фациокраниальный морфогенез «новой головы» совместно с клетками эктодермальных плакод [36, 37, 47]. Б. Холл постулировал [36], что клеточный материал нервного гребня представляет собой четвертый зародышевый листок, и обладающие им позвоночные – четырехслойные животные.

Показано, что у оболочников, но не у головохордовых, в клеточных популяциях нервного гребня, возникающего на стыке краев нервной пластинки при ее сворачивании в нервную трубку, в эмбриогенезе появляются клетки, способные при экспериментальном воздействии мигрировать подобно клеткам нервного гребня позвоночных [8, 62]. Но сравнительный анализ геной экспрессии в клетках нервного гребня позвоночных и в сходных с ними клетках асцидий не привел к однозначному заключению о гомологии тех и других клеток. Вероятно, мигрирующие мезенхимные клетки асцидий все же не тождественны клеткам нервного гребня – эволюционного новшества, характерного лишь для позвоночных. Туникаты так и не приобрели голову, характерную для позвоночных, Craniata. Взрослые асцидии лишены спинной нервной трубки, их нервная система редуцируется до дорсального (церебрального) ганглия [37, 41, 86].

Личиночное развитие асцидий заканчивается метаморфозом, вовлекающим радикальную морфологическую и функциональную перестройку с переходом к сидячему образу жизни, но у аппендикулярий метаморфоз отсутствует. Аппендикулярии – наиболее упрощенные оболочники, в большинстве очень небольшие (около 2 мм длиной) и сходные с личинкой асцидий – отсюда и их альтернативное название Lagvasea [41]. У пиросом и салп наблюдается прямое развитие, ларвальная (личиночная) стадия утрачена [41, 86].

1.3. Бластогенез представителей оболочников

Разнообразные формы бесполого, агамного размножения (бластогенеза) путем различных форм почкования наблюдаются у асцидий и других представителей оболочников – за исключением аппендикулярий, размножающихся только половым путем [4, 5, 41, 86, 87]. В жизненном цикле колониальных асцидий и других представителей оболочников поколение развившегося из зиготы оозоида чередуется с множеством поколений бластозоидов, возникающих бесполом путем [4, 86].

При агамной репродукции происходит естественное клонирование материнского организма с возникновением множества генетически идентичных индивидов или бластозоидов, модулярных единиц колонии.

У колониальных асцидий *Botryllus schlosseri*, *B. tuberatus* и *Botrylloides sp.* осевшая на субстрат личинка-«головастик» вскоре начинает паллеальное почкование [3, 4, 10], давая начало придонной колонии, бластозоиды которой продолжают агамную репродукцию (см. [1]) (рис. 4).

Показано, что паллеальное почкование *B. tuberatus* и других ботриллид осуществляется за счет гемобластов – плюрипотентных стволовых клеток (см. [1, 86]).

У салп, бочоночников и пиросом (Thaliacea) наблюдается сложное чередование полового и бесполого размножения; путем столонического почкования возникает пелагическая колония в виде длинной цепочки бластозоидов. Колонии пиросом, включающие тысячи зооидов, могут достигать 20-метровой длины [41, 86].

Зооиды большинства колониальных оболочников меньше по размеру, чем особи родственных солитарных (одиночных) видов; отмечена взаимосвязь между

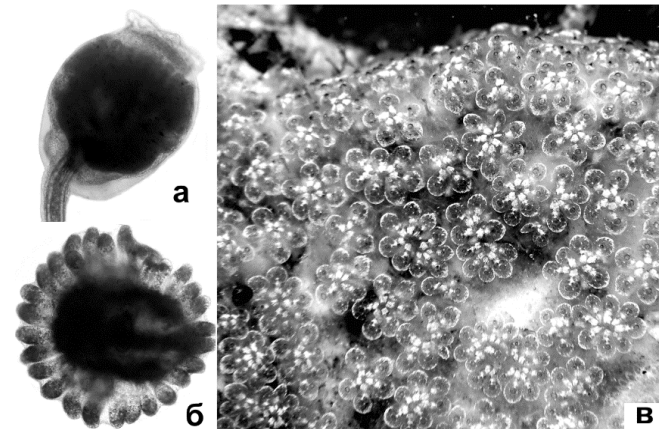


Рис. 4. Прижизненная морфология передней части плавающей личинки асцидии *Botrylloides sp.* (а), осевшей личинки того же вида (б) и колонии *Botryllus tuberatus* (в). Фотографии сделаны А.В. Ахмадиевой

адультацией и колониальностью. Показано также, что переход к колониальности происходил неоднократно и независимо в эволюции разных групп туникат и даже разных семейств асцидий. Анцестральное состояние асцидий, по-видимому, представлено солитарными представителями [41, 86].

2. ЭВОЛЮЦИОННАЯ ГЕНОМИКА ОБОЛОЧНИКОВ В СРАВНЕНИИ С ДРУГИМИ ХОРДОВЫМИ

2.1. Горизонтальный перенос генов

Ключевую роль в отделении оболочников от линии развития хордовых, ведущей к позвоночным, сыграло появление генов, кодирующих синтазу целлюлозы, основного компонента оболочек. Их появление у оболочников представляет особый интерес, поскольку является единственным известным случаем возникновения крупного таксона, имеющего ранг подтипа (или даже типа по мнению некоторых авторов [72]), в результате горизонтального переноса генов не симбиотическим путем.

Такой способ приобретения новых функций распространен у прокариот, причем настолько широко, что на этом основании ставится под сомнение применимость понятия о филогенетическом древе к некоторым их группам. Вместо этого вводится понятие филогенетической сети и сетевой эволюции [79, 82, 88].

Симбиотический способ горизонтального переноса реализован в происхождении эукариот, которое стало результатом симбиоза архей либо с цианобактериями, либо с другими бактериями, причем симбионты превратились либо в пластиды, либо в митохондрии, соответственно, что сопровождалось перераспределением части генетического материала между ядерным геномом хозяев и геномом симбионтов. Эти и другие возможные механизмы естественного горизонтального приобретения и закрепления генов у растений и животных обсуждены, например, в обзоре [79].

Инородные гены, не принадлежащие Metazoa, обнаружены при исследовании геномов 26 видов животных, в том числе родов *Caenorhabditis*, *Drosophila* и 14 видов позвоночных, включая 10 видов приматов [17, 43, 77]. Такие инородные гены способны к экспрессии и участию в метаболизме организмов-реципиентов, а также к дупликации и диверсификации в их геноме. Гены бактериального происхождения могут приобретать интроны. У человека найдено проявление активности инородных генов, могущих участвовать в метаболизме аминокислот, липидов, модификации макромолекул, антиоксидантной активности и иммунном ответе [17], но адекватность использованных при этом критериев оспаривается [70].

Самый яркий и прямолинейный пример горизонтального переноса генов как фактора эволюции многоклеточных стал известным в результате секвени-

рования генома асцидии *C. intestinalis* в 2002 г. [20]. Тогда и был идентифицирован локус, соответствующий гену синтазы целлюлозы и не имеющий гомологов среди миллионов записей в базах данных генов самых разнообразных животных. Когда ген синтазы целлюлозы из *C. intestinalis* был позже включен в филогенетический анализ большого числа генов из растений и прокариот, его ближайшие родственники были определены у актинобактерий. Предполагается, что около 530 млн лет назад этот ген был перенесен к предкам туникат горизонтально, вероятнее всего, вирусным вектором [59].

Последствием этого события стало то, что после приобретения способности строить из целлюлозы тунику, защищающую животное и создающую дополнительные возможности для совершенствования фильтрационного способа питания, развитие активных способов самосохранения и питания уже не создавало достаточных селективных преимуществ, чтобы способствовать развитию нервной системы, внутреннего скелета и других признаков, которые обеспечили эволюцию позвоночных. Отпала необходимость даже в тех функциях, которые уже имелись у подобных ланцетнику предков. Делеции соответствующих генов не приводили к негативным последствиям и сохранялись в потомстве. Фактически, потеря лишних функций и необходимости в их обеспечении дополнительными ресурсами может даже создавать некоторые селективные преимущества, в частности, способствовать ускорению созревания организмов. Кроме того, потеря одних генов могла приводить к упрощению контекста для действия других генов, который ограничивает возможности их мутационных изменений. Такая возросшая толерантность к мутациям сопровождалась ускорением мутационного процесса, в результате чего туникаты демонстрируют уникально высокую среди всех хордовых скорость эволюции, оцениваемую по среднему числу нуклеотидных замен в единицу времени [9].

Интересно, что у аппендикулярии *O. dioica* найдены два гена *CelS*, а не единственный, как у асцидий [68]. Один из двух генов активен на личиночной стадии и участвует в образовании целлюлозных тяжей вдоль хорды. Другой обеспечивает строительство «домика» у взрослых животных. Интерес представляет вопрос, когда произошла дупликация гена, фактически определяющего особое положение туникат среди животных: случилось ли это у общих предков асцидий и аппендикулярий с последующей потерей одной копии у асцидий, или же дупликация произошла у аппендикулярий после их отделения от общих предков с асцидиями или от самих асцидий? Второй вариант предпочтительней, если исходить из принципа максимальной экономии филогенетических событий. Но ответ зависит от того, каковы филогенетические от-

ношения между этими таксонами с учетом других молекулярных признаков, и единое мнение по этому вопросу до сих пор отсутствует.

Кроме того, получение принципиального ответа на вопрос, откуда вообще взялась у туника уникальная способность генерировать тунику, поднимает множество вопросов о деталях. Как случилось, что ген встроился в новый геном работоспособным образом, то есть оказался под промотором, способным связывать доступные транскрипционные факторы, более того, именно те, которые определяют экспрессию гена в нужном месте в нужное время? Одним из вариантов ответа может быть участие лентивирусов (к этому типу вирусов принадлежит ВИЧ) в качестве векторов, поскольку лентивирусы способны «устанавливать» переносимый ген под промоторы других имеющихся в клетке генов.

Свою роль в обстоятельствах горизонтального переноса гена *CelS* от бактерий к предкам туника могли сыграть особенности структуры и нуклеотидного состава ДНК источника [71]. У актинобактерий ДНК обогащена GC-парами, а у эукариот вообще и туника в частности – AC-парами. Относительно высоким является содержание GC-пар у хордовых в сайтах связывания транскрипционного фактора AP-2, который у туника обеспечивает приуроченность активности гена *CelS* к эпидермису. Таким образом, фрагмент ДНК, внедрившийся в геном туника из актинобактерий, мог уже содержать участки, имеющие повышенное сродство к AP-2. Сам этот фрагмент исходно включал два близко расположенных (у актинобактерий) гена, кодирующих синтазу целлюлозы и целлюлазу. Продукт гена *CelS* туника содержит два домена, один из которых обладает активностью синтазы целлюлозы, а другой – целлюлазной активностью, тем самым обеспечивая весь цикл метаболизма целлюлозы в тунике.

Пути эволюции туника и позвоночных, сестринских таксонов хордовых, разошлись чуть ли не диаметрально. У позвоночных эволюция привела к самым разнообразным (человек), крупным (синий кит) и быстрым (сокол сапсан) из ныне живущих животных, чего не скажешь ни об одном представителе туника. Зато туники могли бы «похвалиться» рекордами на молекулярном уровне, в том числе высокой скоростью эволюционных изменений в геномах, самым малым геномом из числа найденных у хордовых, а также быстротой развития и смены поколений (см. [41, 72, 86]). Исследования по эволюции генома оболочников будут рассмотрены ниже.

2.2. ФИЛОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ

Филогенетическая близость оболочников, а не головохордовых, к позвоночным была подтверждена

сравнением полностью секвенированного генома ланцетника с секвенированными геномами других хордовых или достаточно полными наборами характеристических экспрессируемых последовательностей (expressed sequence tags, EST), что позволило выделить 1090 генов, общих для 12 исследованных видов – от кишечнополостных до позвоночных, включая человека [64]. Приняты во внимание также данные полного секвенирования геномов оболочников *Ciona intestinalis*, *Ciona savignyi* и *Oikopleura dioica* (см. ниже). Филогенетическая система хордовых, предполагающая более близкие сестринские отношения между оболочниками и позвоночными, чем между позвоночными и головохордовыми, поддерживается в подавляющем большинстве обобщающих публикаций [9, 23, 27, 28, 41, 55, 62, 64, 75], за немногими исключениями [83, 84].

Надежность построения филогенетического древа по любым признакам зависит как от числа принимаемых во внимание показателей, так и от числа учтенных видов в таксонах, отношения между которыми подлежат выяснению. Чем больше и того, и другого, тем лучше. Но увеличению числа молекулярно-биологических характеристик, таких как нуклеотидные последовательности генов или определенные сочетания и порядок расположения генов на протяженных участках ДНК, трудно совместить с увеличением численностей изучаемых выборок разных видов организмов, поскольку секвенирование все еще является дорогостоящей, длительной и не вполне общедоступной процедурой.

Крайний вариант первого подхода (максимизация числа признаков) представляют собой пока еще единичные работы, где проводится сопоставление полностью или в значительной степени секвенированных геномов (филогеномика) [11, 35].

Крайние варианты второго подхода представлены более многочисленными работами, где сопоставляются нуклеотидные последовательности какого-либо одного гена или аминокислотные последовательности одного белка, зато у большого числа таксонов более высокого уровня (низкого ранга), представленных в некоторых случаях даже несколькими организмами, в пределах каждого из сравниваемых таксонов более низкого уровня (высокого ранга). В качестве стандартов для такого анализа приняты ген 18S-субъединицы рибосом и митохондриальный геном, имеющиеся практически у всех эукариот. Оба признака исследованы при включении туника (см. [32, 35, 85, 92]).

Компромиссные варианты представлены работами, где можно усмотреть стремление к оптимизации соотношения между числом учтенных признаков (от десятков до нескольких сотен секвенированных генов) и числом изученных организмов и таксонов. Примерами такого подхода являются широко цитируемая ра-

бота [22], в которой на основании изучения примерно сотни генов туникаты были поставлены в позицию сестринского таксона относительно позвоночных, а также исследование по анализу 35 генов «домашнего хозяйства», общих для широкого диапазона вторичноротых, которая подтвердила монофилию туникат и позвоночных [91].

С учетом еще и внутривидового генетического полиморфизма неудивительны различия между филогенетическими древами, построенными по разным признакам и/или с использованием разных процедур построения. О высокой надежности выводов можно говорить, когда к одинаковым результатам приводит использование разных признаков и/или разных процедур. Подводные камни молекулярной филогении и пути преодоления трудностей описаны в ряде обзоров [11, 28, 29, 90] и подробно обсуждены в применении к конкретным случаям в цитированных здесь работах, поэтому далее комментарии на эту тему будут сведены к минимуму.

Полное секвенирование генома асцидий достигнуто для *Ciona intestinalis* в 2002 г. [20] и *Ciona savignyi* в 2007 г. [80], для сальпы *Salpa thompsoni* – совсем недавно [48], и в настоящее время продолжается выполнение проектов по расшифровке генов еще нескольких представителей Ascidiacea. Геном аппендикулярии *Oikopleura dioica* был секвенирован в 2010 г. [24], но к 2008 г., когда был получен набросок генома ланцетника *Branchiostoma floridae* [64], геном этой аппендикулярии был изучен достаточно полно [74], чтобы учесть его при составлении филогенетического древа вторичноротых на основании последовательностей 1090 генов, общих для изученных представителей разных таксонов. В результате была подтверждена сестринская позиция туникат относительно черепных, а также продемонстрирована особая позиция аппендикулярий среди других оболочников.

Первый из этих выводов в настоящее время принимается за основу большинством исследовательских групп, активно работающих в этой области, о чем свидетельствуют практически все ссылки, цитированные в этом разделе. Дополнительными признаками монофилии позвоночных и туникат на уровне конкретных генов являются свойственные только этим таксонам особенности доменной организации генов семейства кадхеринов и уникальные инсерции в кодирующих участках генов коллагена [23], а также наличие только у них одной из микро-РНК (см. ниже), обозначаемой как miR-196 [13]².

² Растущее признание монофилии оболочников и позвоночных отражено в тенденции использовать для всей этой клады общее обозначение, в качестве которого все чаще фигурирует термин Olfactores («обоняльщики») [23, 91], что вызывает не лишние оснований протесты. Дело в том, что термин этот был предложен еще в 1991 г. (Jefferies, 1991, цит. по [23]), когда гипотеза о монофилии туникат и

Сравнение геномов ланцетника, позвоночных и туникат показывает, что эволюция позвоночных от общего с туникатами предка сопровождалась ростом размеров генома и разнообразия генов, тогда как основной тенденцией молекулярной эволюции туникат было уменьшение размеров генома и снижение числа генов. В результате этого *O. dioica* является обладателем самого малого генома среди найденных у многоклеточных животных – около 70 млн пар оснований (18 тыс. структурных генов); для сравнения (в млн пар оснований, в скобках указаны оценки числа генов): асцидия *C. intestinalis* 170 (14000), ланцетник *B. floridae* 520 (35000), рыба-зебра *Danio rerio* 1500 (26000), курица *Gallus gallus* 1100 (17000), человек *Homo sapiens* 3200 (21500), дрозофила *D. melanogaster* 170 (14000), нематода *C. elegans* 100 (20000) [55].

Наиболее вероятной причиной роста размеров геномов позвоночных считается серия полногеномных удвоений с последующей диверсификацией функций между паралогичными генами. Второй причиной является рост количества некодирующей ДНК, в том числе cis-регуляторных элементов, связывающих транскрипционные факторы, и того, что ранее именовалось «бросовой ДНК» (junk DNA), которая, как оказалось, играет важнейшую роль в организации экспрессии структурных генов, особенно на ранних этапах эмбриогенеза. Число структурных и регуляторных генов при этом, напротив, может даже сокращаться (если сравнить ланцетника с рыбой-зеброй, а ту – с человеком), но это сокращение может быть отчасти связано с приобретением способности кодировать несколько белков одной нуклеотидной последовательностью благодаря альтернативному сплайсингу, то есть с повышением компактности и эффективности кодирования [55].

Тенденция к сокращению размера генома у туникат реализовалась через снижение уровня дубликации отдельных генов и общего числа разных генов и уменьшение размеров и числа интронов и размеров межгенных последовательностей ДНК. И ядерный, и митохондриальный геномы оболочников эволюционировали много быстрее, чем геномы головохордовых и позвоночных. Кроме количественных сдвигов, у туникат отмечена исключительно высокая скорость изменений в нуклеотидных последовательностях генов «домашнего хозяйства» (housekeeping), обычно

позвоночных была высказана на основании наличия структур, предположительно представляющих собой обонятельный аппарат, которые были найдены в ископаемых остатках, отнесенных к общим предкам туникат и позвоночных. Однако тогда это в комплексе с другими гипотезами того же автора, так и не подтвержденными, шло настолько вразрез с общепринятыми понятиями, что термин привиться не мог, а в настоящее время для объединения оболочников и позвоночных в одну кладу есть более основательные причины. Тем не менее, термин Olfactores выжил.

относимых к числу высоко консервативных: у асцидий, особенно Aplousobranchia, она в среднем в два раза выше, чем у позвоночных, а по отдельным генам и до восьми раз выше. Причины изменений в генах усматриваются скорее в повышении частоты мутаций, чем в усилении давления отбора и в ослаблении ограничений на возможные изменения в силу упрощения контекста для экспрессии генов [91].

Тенденция к общему сокращению генома, а также к изменениям в нуклеотидных последовательностях генов и в порядке расположения генов достигла наибольшей выраженности у аппендикулярий, если судить по *O. dioica*. Интересно, что у этих туникат среди утерянных значатся механизмы прямой репарации двухнитевых разрывов ДНК. Стоит также отметить редко встречающийся у эукариот, в отличие от прокариот, и совершенно не свойственный хордовым полицистронный способ управления генной экспрессией (несколько генов под одним управляющим элементом, подобно оперонам у бактерий). Эти и другие уникальные особенности организации генома *O. dioica* рассмотрены в обзоре [15].

Геном аппендикулярии *O. dioica*, который был выбран для секвенирования по причине самого малого размера (менее 70 Mb в 4 хромосомах) в сравнении с любыми другими животными, использованными в филогеномном анализе, ставит аппендикулярий в позицию сестринского таксона относительно всех остальных туникат (Delsuc et al., 2006, 2008; Tsagko-georga et al., 2010)³. Однако в силу ряда признаков, в том числе той же уникально малой величины генома, выбор *O. dioica* может быть не самым удачным для такого анализа. Надежность филогеномных выводов снижает также и исключительно высокая скорость генетических изменений, свойственная *O. dioica*, поскольку она увеличивает внутривидовую изменчивость и повышает кажущийся «таксономический вес» организма.

2.3. Анализ гена 18S-РНК

Результатам филогеномного анализа туникат противоречат некоторые исследования с использованием только одного гена, а именно 18S-РНК, но при более высокой представленности разных видов в анализируемых таксонах. В работе [92] аппендикулярии представлены четырьмя видами (три из рода *Oikopleura* и один из рода *Megalocercus*). Однако эти исследования дают основания к пересмотру других аспектов традиционной классификации туникат. В частности, получается, что асцидии представляют собой парафилиетический таксон в том смысле, что из трех обычно выделяемых групп Phlebobranchia, Aplousobranchia и

Stolidobranchia две первых объединяются в один монофилиетический таксон вместе с Thaliacea (свободноплавающими туникатами – огнетелками, боночниками и сальпами), а Stolidobranchia образуют отдельный монофилиетический таксон, более близкий к Appendicularia.

Ранее ответвление аппендикулярий от общей линии Ascidiacea и Thaliacea подтверждено в работе [32], где ген 18S-РНК использовался с целью проанализировать филогенетические отношения у 40 видов Thaliacea, а в качестве взятой для сравнения аппендикулярии фигурировала все та же *O. dioica*. При этом результаты, относящиеся к девяти проанализированным видам асцидий, соответствуют включению Aplousobranchia в пределы Phlebobranchia, а Thaliacea и Stolidobranchia образуют отдельные таксоны одинакового ранга.

2.4. Исследования митогенома

Попытки уточнить филогенетические отношения туникат с другими хордовыми и между собой предпринимались при использовании анализа изменений в митохондриальном геноме (см. [33, 66, 81]).

К настоящему времени имеются полные описания митогеномов около 2000 видов многоклеточных. Обычно митохондриальная ДНК животных содержит 13 генов, кодирующих белки дыхательной цепи, два гена митохондриальных рибосомальных РНК и 22 гена транспортных РНК, которые расположены на двух цепях кольцевой ДНК длиной 14–15 тыс. пар оснований в определенном, лишь при немногих нарушениях, порядке для каждого крупного таксона. Только у туникат из числа вторичноротых все митохондриальные гены расположены на одной цепи ДНК, тогда как у всех остальных – часть генов t-РНК кодируется комплементарной цепью. Высокая скорость изменений, присущая ядерному геному туникат, свойственна и их митохондриальному геному, где она проявляется в сильной изменчивости порядка расположения генов даже у близкородственных видов. Сестринские отношения между туникатами и черепными подтверждены исследованиями митогенома в работе [78], но этот вывод оспаривается в работе [84]. Аппендикулярии не были включены в анализ ни в одном из митогеномных исследований.

Анализ митогенома все шире применяется для отслеживания эволюционных изменений на уровне родов и видов. У оболочников отмечена очень высокая, в сравнении с другими таксонами, степень внутривидовой вариабельности митогеномов, достигающая в ряде случаев уровня межвидовых различий. Эти данные квалифицируются как свидетельство продолжающегося видообразования, в частности, выражающегося в виде наличия «скрытых» (cryptic) видов, неразличимых по морфологическим признакам [33].

³ Впервые такое предположение сделал Освальд Зелигер в 1885 г.: Seeliger, O. 1885. Die Entwicklungsgeschichte der sozialen Ascidien. Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft, 18: 45–120 (цит. по [21]).

Высокая генетическая изменчивость оболочников, проявляющаяся и на уровне митогеномов, повышает способность популяций этих организмов адаптироваться к разным условиям, что делает их высоко инвазивными. В условиях глобального потепления высокая способность популяций оболочников к адаптации превращает некоторые их виды в реальную угрозу для биоразнообразия и экологического равновесия в ряде морских биоценозов [60, 66, 81].

2.5. Микро-РНК

В последнее время в качестве молекулярно-генетического признака для филогенетического анализа стали использоваться микро-РНК (miR) [13, 48, 94]. Эти получившие известность относительно недавно (впервые описаны у нематоды *C. elegans* в 1993 г., а широкое признание биологической роли началось в 2000-х гг.) некодирующие транскрипты длиной 18–25 нуклеотидов являются важнейшими регуляторами генной экспрессии, выполняющими свои функции путем гибридизации с нетранслируемыми комплементарными участками мРНК на рибосомах, которое приводит к ингибированию трансляции, включая трансляцию мРНК *Нох*-генов (см. [56]). Одна miR может таким путем блокировать экспрессию сразу нескольких генов. С другой стороны, сами гены многих miR организованы в кластеры, находящиеся под общим транскрипционным контролем (см. [39]).

Показано, что микро-РНК выполняют важную функцию в регуляции самообновления и дифференцировки стволовых клеток. Специфическая микро-РНК, взаимодействующая с белком Piwi (piRNA, Piwi-interactingRNA), участвует в поддержании недифференцированного состояния и пролиферативной способности гаметогенных стволовых клеток. Взаимодействия piRNA с белками Piwi играют ключевую роль в поддержании стволовых гаметогенных стволовых клеток, супрессии транспозонов и мРНК, определении структуры хроматина (см. [76]).

Эволюция miR подробно рассмотрена в обзоре [13]. Ниже отмечены некоторые важные в данном контексте моменты.

Нуклеотидные последовательности miR весьма консервативны. В эволюции менялись не сами miR, а их репертуар. У последнего общего предка многоклеточных животных они, по-видимому, отсутствовали. Расширение репертуара miR всякий раз связано с принципиальным увеличением сложности организмов, а самые значительные события такого рода приходится на периоды ответвления вторичноротых, позвоночных, плацентарных и приматов. У человека число miR может достигать до 1000, причем сейчас идентифицированы примерно 750. В эволюции многоклеточных животных происходила также потеря части семейств микро-РНК, ясно проявившаяся у представителей

оболочников, претерпевших резкую реорганизацию системы miРНК [39].

Максимальное число miR, идентифицированных у ланцетников, составляет 152, у асцидий *C. intestinalis* – 331. При этом у асцидий отсутствуют некоторые miR, найденные у ланцетника, но число miR, общих с позвоночными, у асцидий больше, чем у ланцетников, и только у позвоночных и туникат найдена miR-196 (см. [6, 39]).

В общем, данные по miR соответствуют вышеописанным тенденциям молекулярной эволюции туникат, которые в этом смысле ближе к позвоночным, чем головохордовые, но характеризуются существенной редукцией генетического аппарата и его высокой изменчивостью вплоть до приобретения уникальных особенностей. Редукция и изменчивость могут быть наиболее выраженными у аппендикулярий, коль скоро у *O. dioica* число идентифицированных miR не превышает 50.

2.6. Эволюционные преобразования системы *Нох*-генов

У Metazoa многие транскрипционные факторы, принадлежащие к числу наиболее структурно и функционально консервативных семейств, кодируются содержащими гомеобокс генами, игравшими важнейшую роль в эволюции животных. Гомеобоксом называют 180-нуклеотидную последовательность, кодирующую состоящий из 60 аминокислотных остатков ДНК-связывающий домен (гомеодомен). В эволюции Metazoa число генов, содержащих гомеобокс, увеличивается от довольно простого набора до высоко диверсифицированного инструментария. Среди гомеобокс-содержащих генов ключевая роль в эволюционных преобразованиях билатеральных животных принадлежит системе *Нох*-генов, контролирующей пространственно-временной паттерн строения тела (см. [19, 30, 42, 44]).

В результате последовательных тандемных дупликаций из гипотетического ProtoНох-кластера еще до появления билатерального плана строения возникли кластеры *Нох*-, *ParaНох*- и *НК*-генов [42]. Гены *Нох*-кластеров демонстрируют упорядочение транскрипции вдоль переднезадней оси: *Нох*-гены, расположенные ближе к 3'-концу кластера, экспрессируются ближе к переднему концу зародыша и раньше, чем их 5'-ассоциированные соседи, проявляя пространственно-временную коллинеарность. Таким образом, генетические механизмы, детерминирующие переднезадний план строения тела и весь комплекс основных черт билатеральных животных связаны с порядком расположения функционирующих *Нох*-генов в их кластере [19, 26, 30, 42, 44, 64].

Макроэволюционные изменения плана строения Bilateria в значительной мере обусловлены контролем

со стороны генов Нох-кластера, а также сестринских ParaНох- и НК-кластеров. Система координированно действующих кластерных генов специфична для билатеральных животных; число *Hox*-, *ParaHox*-генов, коррелирует с возрастанием сложности плана строения и переднезадней диверсификацией билатеральных животных. В ходе эволюции билатеральных животных происходило существенное увеличение числа *Hox*-, *ParaHox*-генов путем генных дупликаций; при этом часть генов может быть утрачена; в итоге представители ветвей Lophotrochozoa, Ecdysozoa и Deuterostomia имеют различные наборы *Hox*-генов [30, 35].

Предполагается, что дупликации *ProtoHox*-гена привели к появлению ProtoНох-кластера у общего предка Eumetazoa, который дал начало паралогичным сестринским Нох- и ParaНох-кластерам, образование которых послужило генетической основой возникновения и дивергенции билатеральных трехслойных животных; а пространственно-временная колинеарность и упорядоченность активации генов Нох-кластера сделали возможным построение тела крупных, сложно организованных животных (см. [42]).

Организация Нох-кластера изучена у представителей всех трех подтипов хордовых, Cephalochordata, Urochordata и Vertebrata (рис. 5).

Нох-кластеры могут быть организованными, дезорганизованными, расщепленными и атомизированными [26].

Ланцетник *Branchiostoma* имеет один непрерывный организованный Нох-кластер, включающий гены от *Hox1* до *Hox14* и добавочный ген *Hox15*, отсутствующий у других вторичноротых (и не показанный на

рис. 5). В целом экспрессия *Hox*-генов ланцетника проявляет выраженную пространственно-временную колинеарность [19].

У изученных представителей оболочников найдены радикальные изменения Нох-системы с утратой в той или иной мере ее анцестральной организации и дезинтеграцией кластера *Hox*-генов [19]. Показано, что наиболее дезинтегрированным, дезорганизованным и атомизированным *Hox*-кластером обладает аппендикулярия *Oikopleura dioica*: у этого вида единый Нох-кластер отсутствует, и девять *Hox*-генов рассеяны по всему геному [74]. У *Oikopleura* утрачены четыре гена: *Hox2*, *Hox3*, *Hox5* и *Hox6*, и сохранившиеся *Hox*-гены диспергированы в геноме в большей мере, чем у любого другого исследованного до сих пор животного [19, 26, 44, 74] (рис. 5).

У асцидии *Ciona intestinalis* кластер расщеплен, неполон и частично дезорганизован, хотя генная экспрессия сохраняет остатки колинеарности [44]. У *C. intestinalis* 4 гена *Hox* утрачены, а кластер распался на три группы. У *O. dioica* утерян еще один *Hox*-ген, зато один из оставшихся дублирован, и все расположены отдельно каждый от других (см. [14]).

O. dioica и *C. intestinalis* обладают одним и тем же числом *Hox*-генов, но различным их набором. Асцидии потеряли гены *Hox7*, *Hox8*, *Hox9* и *Hox11* [30, 74]. Помимо обширной потери *Hox*-генов и расщепления Нох-кластера, у *C. intestinalis* нарушена последовательность расположения *Hox*-генов и колинеарность их экспрессии [19, 30]. Но, как заметил Ферье [30], строго говоря, нельзя судить о колинеарности в случаях потери целостности Нох-кластера и упорядоченного расположения *Hox*-генов вдоль хромосомы.

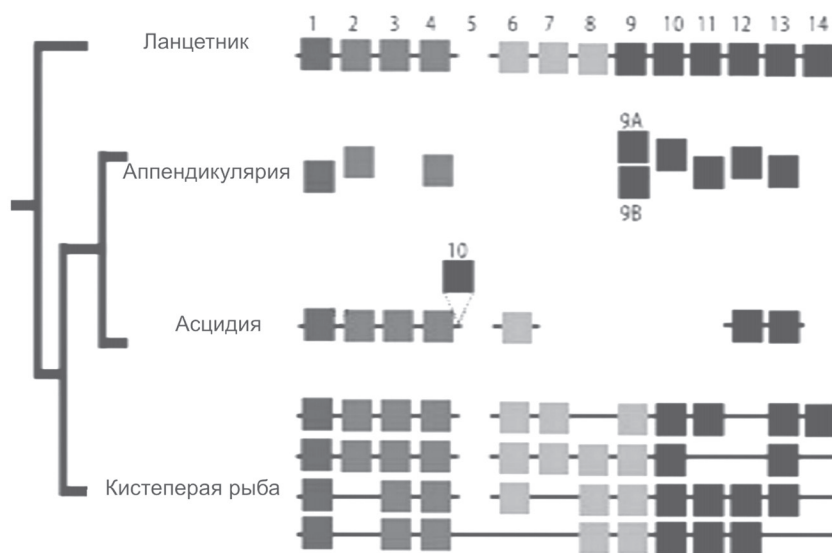


Рис. 5. Организация ортологичных генов Нох-кластеров у хордовых животных [86]

Таким образом, у изученных оболочников обнаружена потеря организованного Нох-кластера, утрата части *Hox*-генов, а также потеря *ParaHox*-генов; тотальная потеря кластеризации *Hox*-генов у *O. dioica* уникальна для Metazoa, а частичная потеря кластеризации уникальна для хордовых [19, 30, 44, 64]. Нарушенная организация Нох-кластера и потеря нескольких *Hox*-генов отражается в модифицированной морфологии взрослых оболочников [19].

В геномах всех представителей беспозвоночных животных, включая беспозвоночных представителей хордовых, содержится один Нох-кластер (если он не дезинтегрирован), тогда как в эволюционной линии позвоночных происходили полногеномные дубликации. В ходе эволюции позвоночных в результате последовательных раундов дубликации всего генома, двукратной у наземных позвоночных и трехкратной у костистых рыб, произошло увеличение числа Нох-кластеров до четырех у тетраподных позвоночных и большего числа этих кластеров у костистых рыб. В ходе диверсификации позвоночных многие *Hox*-гены были потеряны в разных линиях, в результате чего ни один кластер позвоночных не обладает паралогами всех групп этих генов, то есть каждый Нох-кластер неполон. Каждый из четырех Нох-кластеров млекопитающих, возникших путем дубликации из единого анцестрального Нох-кластера, содержит 8–10 генов из 13 групп паралогов, в целом 39 генов (см. [19, 42, 64]).

В эволюционной линии хордовых-позвоночных выявлена удивительная консервативность генома с наследованием большинства предковых генов, сохранением целостности Нох-кластеров и консерватизма их функций [19, 26, 64]. Предполагается, что предок хордовых и, весьма определенно, предок позвоночных имел 14 генов Нох-кластера (см. [30]).

Последовательность экспрессии Нох-генов во времени у хордовых регулируется ретиноидами. Повышение уровня ретиноевой кислоты сопровождается расширением области деконденсированного хроматина в месте расположения Нох-кластера и последовательным вовлечением все новых генов этого кластера в транскрипцию. Однако у туникат порядок экспрессии *Hox*-генов от ретиноидов не зависит, хотя сам этот механизм – от синтеза ретиноевой кислоты до рецепторов к ней и последующих эффекторных механизмов – сохранился. А у аппендикулярий даже это все утеряно [14, 53, 54, 57]. Но именно у аппендикулярий из всех туникат во взрослом состоянии сохраняется общий план строения хордовых. Таким образом, из исследований на туникатах можно сделать вывод, что этот план строения может определяться не только порядком расположения *Hox*-генов и зависимостью их экспрессии от ретиноидов, но и другими, в настоящее время неизвестными взаимодействиями, способными играть самостоятельную роль.

Туникаты могут быть весьма удобным объектом для исследований по этому вопросу, поскольку у них относительно простое строение и, вследствие общей редукции генетического аппарата, относительно мал репертуар транскрипционных факторов, участвующих в организации и регуляции генных взаимодействий (сетей), в том числе с участием *Hox*-генов. Например, у *Ciona* «всего лишь» около 700 транскрипционных факторов, а не 3000, как у млекопитающих, но и это число превосходит способность человеческого мозга учитывать все возможные взаимодействия. По этой причине все более широкое признание получает построение компьютерных моделей генных взаимодействий и создание баз данных, куда стекались бы получаемые разными авторами сведения, подлежащие учету. Туникаты оказываются среди организмов, которые ближе всего по своей реальной сложности к тому уровню, с которым уже способны оперировать такие модели. В качестве референтных организмов для их построения фигурируют *C. intestinalis* и *O. dioica*. Для *Ciona* уже построены на основе базы данных ANISEED модели генных сетей, включающие тысячи паттернов регуляторных взаимодействий [69, 89]. Для *O. dioica* создана база данных OICOBASE [18]. Одна из задач, решаемых с ее помощью, состоит в накоплении данных о транскриптах, выявляемых в разных клетках на разных стадиях развития, для последующего сопоставления с реконструкцией развития клеточных линий в эмбриогенезе при разрешении до уровня единичных клеток, как это уже сделано, например, в исследованиях развития хвоста личинки *Ciona* из хвостовой почки [58].

Таким образом, начало 2000-х гг. ознаменовалось заметным прогрессом в понимании связей между генотипом, фенотипом и филогенезом оболочников. Но филогенетические отношения, выводимые на этом основании, не всегда соответствуют тем, которые устоялись на основе прямого сопоставления рассмотренных выше морфофункциональных признаков. Помочь в разрешении таких противоречий может выяснение связей между генетическими и морфофункциональными признаками.

3. ГЕНОМНО-МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ: ВАРИАЦИИ НА ТЕМУ «EVO-DEVO»

Эволюционный успех позвоночных в существенной мере был обеспечен последовательными дубликациями комплекса *Hox*-генов и сопутствующими надстройками генных регуляторных сетей. Число *Hox*-генов коррелирует со сложностью плана строения животных. Морфологическая сложность организма зависит также от коллинеарности и топологической организации кластера и от вторичной потери части этих генов [19, 26, 30, 42, 64].

Сопоставление данных об организации Нох- и ParaНох-кластеров с проявлением временной коллинеарности привело к появлению гипотезы о корреляции целостности кластеров со скоростью эмбриогенеза (см. [19, 25]). У видов с дезинтегрированным, как у аппендикулярии *Oikopleura dioica*, или расщепленным, как у асцидии *Ciona* (а также у дрозофил и нематоды *C. elegans*), Нох-кластером наблюдается быстрое эмбриональное развитие. Предполагается, что быстрый эмбриогенез не дает возможности для постепенного развертывания временной последовательности экспрессии Нох-генов, тогда как пространственная коллинеарность еще сохраняется. Для временной координации экспрессии Нох-генов, возможной у животных с медленным эмбриогенезом и более долгим периодом последовательного развертывания экспрессии Нох-генов, вероятно, необходим целостный интегрированный кластер Нох-генов. Животным с расщепленным или дезинтегрированным кластером свойствен вторичный быстрый эмбриогенез с малым числом клеток и детерминированным, мозаичным развитием [44, 73].

Среди хордовых исключительное положение в этом смысле занимают оболочники, у изученных представителей которых, аппендикулярии *Oikopleura* и асцидии *Ciona*, обнаружена потеря целостности Нох-кластера и ряда Нох-генов, коррелирующая с существенным преобразованием анцестральной морфологии [19, 44].

Корреляция целостности Нох-кластеров и временной коллинеарности со скоростью и характером эмбриогенеза позволяет постулировать существование двух эволюционных стратегий у разных таксономических групп билатеральных животных при учете эволюционного вклада гетерохронии (неотении либо прогенеза).

Гетерохронии – это изменения последовательности процессов развития, их скорости и сроков проявления анцестральных признаков, которые приводят к изменениям морфологических признаков и плана строения тела при формировании таксонов разного ранга, включая позвоночных (см. [45, 46]).

Наиболее часто рассматриваемый тип гетерохронии – педоморфоз, представленный неотенией и прогенезом (неотения – замедление появления соматических признаков, прогенез – ускорение репродуктивного созревания). При неотении за счет относительного замедления скорости развития тела возникает крупный взрослый организм с анцестральными характеристиками ранних или личиночных стадий развития. В случае прогенеза ускорение развития и раннее половое созревание продуцирует взрослых меньшего размера. Упомянутая выше адультация может быть названа прогенезом. Возможно также «переразвитие» отдельных соматических признаков или их комплекса, именуемое пераморфозом.

Педоморфоз открывает широкие возможности для крупномасштабных эволюционных перестроек с возникновением новых таксонов животного мира путем скачкообразного изменения организации за счет исчезновения поздних стадий развития. Педоморфоз по типу неотении позволяет избежать специализации и может привести к глобальному изменению онтогенеза, способному открыть перед организмом новую адаптивную зону и возможность макроэволюционных преобразований. Неотения многократно выявлена в эволюционных исследованиях: неотенические признаки найдены у птиц, млекопитающих и человека, включая аллометрическое увеличение объема мозга и проявление ряда эмбриональных признаков во взрослом состоянии (см. [65]).

На систему геномных корреляций накладываются эпигеномные взаимодействия. Важную морфогенетическую роль выполняют клеточные ресурсы роста, межклеточные взаимодействия, движения клеток и клеточных пластов. Регулятивное развитие, типичное для хордовых и большинства *Deuterostomia*, коррелирует с «избыточностью» клеточного материала и возможностью селекции на клеточном уровне в пределах организма, что показано, например, для нейробластов и иммунокомпетентных клеток позвоночных (см. [6]). Сохранение недифференцированного состояния и митотической активности эмбриональных и стволовых клеток со сдвигом цитодифференциации на более поздние стадии онтогенеза – проявление локальной гетерохронии. Возникновение какой-либо новой популяции недифференцированных и пролиферирующих стволовых клеток, подобных в этом отношении эмбриональным клеткам, можно рассматривать как гетерохронию в виде локального эмбриоморфоза. У многоклеточных с большими размерами и обилием тканей значительно больше возможностей для «разнесения» экспрессии паралога генов во времени и пространстве, что очень важно в связи с умножением числа Нох-кластеров у позвоночных (см. [45, 46]).

В развитие идей Холла [36] кажется логичным в качестве четвертого зародышевого листка позвоночных (и хордовых) рассматривать всю нервную пластинку вместе с прилегающим клеточным материалом будущего нервного гребня. Именно нервную пластинку можно считать четвертым зародышевым листком позвоночных, выделяющимся из эктодермы подобно тому, как мезодерма отделяется от энтодермы, и именовать нейродермой [46]. Появление нервной пластинки как четвертого зародышевого листка (нейродермы) – ароморфная эволюционная инновация хордовых-позвоночных, обеспечившая возникновение огромного клеточного ресурса нейрогенеза и быструю эволюцию мозга.

Увеличение ресурсов стволовых клеток и длительности развития способствует расширению эволюци-

онного потенциала и ароморфным преобразованиям, что наиболее выражено у позвоночных, в эволюции которых велик вклад неотении в сочетании с пераморфозом. Примеры гетерохроний включают неотенические признаки млекопитающих и человека, в том числе аллометрическое увеличение объема мозга. У обезьян и человека плод рождается с большим мозгом и маленькой массой тела, затем масса тела растет намного быстрее, чем мозг. Появление огромного нейрогенного клеточного субстрата привело к образованию неокортекса млекопитающих, развитию памяти и мышления и появлению внегеномных систем передачи информации (см. [6]). Хордовые предки позвоночных избежали избыточной специализации и потерь генных регуляторных систем, расширив свой эволюционный потенциал [67].

Альтернативная эволюционная направленность проявилась у организмов, претерпевших в ходе эволюции радикальные перестройки Нох-кластеров и характеризующихся детерминированным развитием и малоклеточностью зародышей. Предполагается, что в эволюции оболочников среди Chordata, а также представителей Ecdysozoa, доминировал прогенез, коррелирующий с малыми размерами организма, коротким жизненным циклом, быстрым половым созреванием, высокой смертностью и высокой скоростью эволюции.

У позвоночных головной мозг эволюционировал в непосредственной связи с головой, способствующей переходу к активному добыванию пищи вместо фильтрации. Голова формируется клетками, которые мигрируют из нервного гребня и эпителиальных плакод на ранних стадиях эмбриогенеза. Образующие нервный гребень клетки обнаруживаются уже на краях нервной пластинки, которые при ее сворачивании в нервную трубку смыкаются и при этом слегка выступают наружу в виде гребня. Нервный гребень найден у позвоночных и у туникат, например, у асцидии *Ciona intestinalis*, но не у ланцетников. Но у туникат имеющиеся в нервном гребне клетки, похожие на способные к миграции меланоциты нервного гребня позвоночных, в процессе нормального развития не проявляют способность ни к миграции, ни к эпителиально-мезенхимальному превращению, благодаря которым у позвоночных генерируется все многообразие клеточных типов, формирующих голову. Вместе с тем, некоторые гены, необходимые для этого, у туникат есть и экспрессируются, в частности, в мезенхимных клетках мезодермального происхождения, в том числе тех, которые мигрируют в тунику. Однако в меланоцитах нервного гребня, имеющих эктодермальное происхождение, их экспрессия подавлена. У позвоночных это подавление снимается действием транскрипционного фактора Twist. У *Ciona* есть три транскрипционных фактора, родственных фактору Twist у млекопитающих, но ни один из них не экспрессируется в меланоцитах нервного гребня. При экспе-

риментальной индукции Twist меланоциты нервного гребня *Ciona* становятся способными к миграции и дифференцировке в клеточные типы, участвующие у позвоночных в формировании головы [8]. Таким образом возможно, что именно изменение паттерна экспрессии Twist у общих предков туникат и позвоночных создало ситуацию, благодаря которой формирование головы стало возможным, но впоследствии эта возможность у туникат была подавлена за ненадобностью. Более того, подавлять экспрессию Twist «по умолчанию» – вне ситуации, делающей ее временно необходимой в эмбриогенезе, – может быть даже нужно по причине того, что иначе она приводит к злокачественным опухолям. Действительно, эпителиально-мезенхимную трансформацию претерпевают клетки раковых опухолей на стадии метастазирования. Поэтому исследования на туникатах могут дать важную информацию о генных сетях, задействованных в этом процессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ТРАЕКТОРИИ

Интеграция данных палеонтологии, биологии развития и молекулярной генетики с эволюционной биологией создает новую основу для понимания эволюционных преобразований.

Особенности морфофункциональной организации и развития позвоночных, с одной стороны, и туникат, с другой стороны, дают ясно выраженные, почти предельные примеры альтернативных эволюционных тенденций с преобладанием соответственно неотении либо прогенеза.

Неотения коррелирует с увеличением размера тела, появлением новых клеточных ресурсов развития, удлинением периода роста и пластичностью, способствуя расширению эволюционных возможностей и ароморфным преобразованиям. Вклад неотении с увеличением ресурсов стволовых клеток как локального эмбриоморфоза наиболее выражен в эволюции хордовых, особенно позвоночных. Увеличение ресурсов стволовых клеток и длительности развития способствует расширению эволюционного потенциала и ароморфным преобразованиям, что наиболее выражено у высших представителей позвоночных, в эволюции которых велик вклад неотении в сочетании с пераморфозом. Такое сочетание коррелирует с отбором на увеличение размера тела и удлинение жизни.

Альтернативная эволюционная стратегия проявилась у организмов с детерминированным (мозаичным) развитием и малоклеточностью. Предполагается, что в эволюции оболочников доминировал прогенез (адультация), что коррелирует с быстрым половым созреванием, малыми размерами организма, коротким жизненным циклом, обеспечивая быстрый рост популяций и освоение новых экологических ниш. Однако такие эволюционные изменения оказываются лишь

идиоадаптациями [45, 46]. Они дают возможность быстрого роста популяции и освоения новых экологических ниш, но ведут к эволюционному регрессу.

Несмотря на упрощение генома, асцидии, как и все оболочники, в том числе аппендикулярии, представлены вполне успешными видами, населяющими в больших количествах практически все участки мирового океана [21, 41, 75, 86]. Аппендикулярии составляют значительную часть планктона и могут местами накапливать столь большую биомассу, что ее приходится учитывать в локальных биогеохимических циклах углерода [96]. Дело в том, что в домиках аппендикулярий, основу которых составляет целлюлоза, велико содержание углерода. Сбрасываемые при регулярном обновлении домики аппендикулярий оседают на дно, и вместе с ними фиксируется значительное количество углерода, пошедшего на их построение.

Неожиданным аспектом этого процесса стало то, что вместе с домиками и фильтрационными органами

аппендикулярий на дно в больших количествах могут уходить захваченные (сорбированные) ими мелкие фрагменты пластмасс, образующиеся в результате механического разрушения продуктов антропогенного загрязнения океана. С одной стороны, это способствует очищению воды, но в конечном счете может иметь пагубные последствия для донных экосистем [49].

Интересно, что перенос гена *CelS* к предкам туникат, тем более столь удачный, был случайным событием, совершенно необязательным. Не будь его, не было бы никаких туникат. И кто бы тогда занял их немаловажное ныне место в морских экосистемах, и как вообще пошла бы эволюция жизни на Земле?

Ответ на вопросы, имеющие фундаментальное значение для понимания происхождения и эволюции хордовых, в том числе человека, может дать продолжение исследований туникат по направлениям, которые обозначены уже выполненными работами, в том числе рассмотренными выше.

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Ахмадиева АВ, Шукалюк АИ, Александрова ЯН, Исаева ВВ. Стволовые клетки в бесполом размножении колониальной асцидии *Botryllus tuberatus* (Tunicata: Ascidiacea). *Биология моря*. 2007;33(3):217-2.
2. Беклемишев ВН. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. Т. 1. М.; 1964.
3. Иванова-Казас ОМ. Бесполое размножение животных. Л.: Изд-во ЛГУ; 1977.
4. Иванова-Казас ОМ. Очерки по филогении низших хордовых. Труды СПб о-ва естествоиспытателей. 1995;84(4).
5. Иванова-Казас ОМ. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Низшие хордовые. М.; 1978.
6. Озернюк НД, Исаева ВВ. Эволюция онтогенеза. Москва: Товарищество научных КМК; 2016.
7. Федонкин МА, Викерс-Рич П, Сволла БД, Траслер П, Холл М. Новые многоклеточные венда Белого моря, близкие к асцидиям. *Палеонтологический журнал*. 2012;46:3-14.

Общий список литературы/Reference List

1. Akhmediyeva AV, Shukaliuk AI, Aleksandrova YaN, Isaeva VV. [Stem cells in the vegetative reproduction of the colonial ascidia *Botryllus tuberatus* (Tunicata: Ascidiacea)]. *Biologiya Morya*. 2007;33(3):217-2. (In Russ.)

2. Beklemishev VN. *Osnovy Sravnitel'noy Anatomii Bespozvonochykh T1*. Moscow, 1964. (In Russ.)
3. Ivanova-Kazas OM. *Bespoloye Razmnosheniye Zhivotnykh*. Leningrad: Izdalel'stvo LGU; 1977. (In Russ.)
4. Ivanova-Kazas OM. *Ocherki Filogenii Khordovykh*. Trydy Sankt-Peterburgskogo Obschestva Yestestvoispytateley. 1995;84(4). (In Russ.)
5. Ivanova-Kazas OM. *Sravnitel'naya Embriologiya Bespozvonochnykh Zhivotnykh*. Nisschiye Khordovye. Moscow; 1978. (In Russ.)
6. Ozerniuk ND, Isaeva VV. *Evolutsiya Ontogeneza*. Moscow: KMK; 2016. (In Russ.)
7. Fedonkin MA, Vickers-Rich P, Swalla BD, Traslér P, Hall M. [Novel metazoans of White Sea Vend, which are close to ascidia]. *Paleontologicheskii Zhurnal*. 2012;46:3-14. (In Russ.)
8. Abitua PB, Wagner E, Navarrete IA, Levine M. Identification of a rudimentary neural crest in a non-vertebrate chordate. *Nature*. 2012;491(7427):104-7.
9. Berná L, D'Onofrio G, Alvarez-Valin F. Peculiar patterns of amino acid substitution and conservation in the fast evolving tunicate *Oikopleura dioica*. *Mol Phylogenet Evol*. 2012;62(2):708-17.
10. Berrill NJ. *The Origin of Vertebrates*. Oxford; 1955.
11. Brinkmann H, Philippe H. Animal phylogeny and large-scale sequencing: Progress and pitfalls. *J Systemat Evol*. 2008;46(3):274-6.

12. Brown FD, Prendergast A, Swalla BJ. Man is but a worm: chordate origins. *Genesis*. 2008;46(11):605-13.
13. Candiani S. Focus on mirnas evolution: A perspective from amphioxus. *Brief Functional Genomics*. 2012;11(2):107-17.
14. Canestro C, Yokoi H, Postlethwait JH. Evolutionary developmental biology and genomics. *Nat Rev Genet*. 2007;8(12):932-42.
15. Chavali S, Morais DA, Gough J, Babu MM. Evolution of eukaryotic genome architecture: Insights from the study of a rapidly evolving metazoan, *Oikopleura dioica*: Non-adaptive forces such as elevated mutation rates may influence the evolution of genome architecture. *BioEssays*. 2011;33(8):592-601.
16. Conklin EG. Mosaic development in ascidian eggs. *J Exp Zool*. 1905;2(2):145-223.
17. Crisp A, Boschetti C, Perry M, Tunnacliffe A, Micklem G. Expression of multiple horizontally acquired genes is a hallmark of both vertebrate and invertebrate genomes. *Genome Biol*. 2015;16(1):50.
18. Danks G, Campsteijn C, Parida M, Butcher S, Doddapaneni H, Fu B, et al. OikoBase: a genomics and developmental transcriptomics resource for the urochordate *Oikopleura dioica*. *Nucl Acids Res*. 2013;41(D1):D845-D53.
19. David B, Mooi R. How Hox genes can shed light on the place of echinoderms among the deuterostomes. *EvoDevo*. 2014;5(1):22.
20. Dehal P, Satou Y, Campbell RK, Chapman J, Degnan B, De Tomaso ADB, Di Gregorio A, Gelpke M, Goodstein DM et al. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 2002;298:2157-67.
21. Deibel D, Lowen B. A review of the life cycles and life-history adaptations of pelagic tunicates to environmental conditions. *ICES J Marine Sci*. 2012;69:358-69.
22. Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*. 2006;439:965-8.
23. Delsuc F, Tsagkogeorga G, Lartillot N, Philippe H. Additional molecular support for the new chordate phylogeny. *Genesis*. 2008;46:592-604.
24. Denoeud F, Henriot S, Mungpakdee S, Aury JM, Da Silva C, Brinkmann H, et al. Plasticity of animal genome architecture unmasked by rapid evolution of a pelagic tunicate. *Science*. 2010;330:1381-5.
25. Duboule D. Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Development*. 1994;(Suppl):135-42.
26. Duboule D. The rise and fall of Hox gene clusters. *Development*. 2007;134(14):2549-60.
27. Dunn CW, Hejnol A, Matus O, Pang, K, et al. Broad phylogenetic sampling improves resolution of the animal trees of life. *Nature*. 2008;452:745-9.
28. Edgecombe GD, Giribet G, Dunn CW, Hejnol A, Kristensen RM, Neves RC, et al. Higher-level metazoan relationships: Recent progress and remaining questions. *Organisms Divers Evol*. 2011;11(2):151-72.
29. Edwards SV. Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution*. 2009;63(1):1-19.
30. Ferrier DE. Evolution of Hox complexes. *Adv Exp Medicine Biol*. 2010;689:91-100.
31. Fujii S, Nishio T, Nishida H. Cleavage pattern, gastrulation, and neurulation in the appendicularian, *Oikopleura dioica*. *Dev Genes Evol*. 2008;218(2):69-79.
32. Govindarajan AF, Bucklin A, Madin LP. A molecular phylogeny of the Thaliacea. *J Plankton Res*. 2011;33:843-53.
33. Griggio F, Voskoboynik A, Iannelli F, Justy F, Tilak M-K, Xavier T, et al. Ascidian mitogenomics: Comparison of evolutionary rates in closely related taxa provides evidence of ongoing speciation events. *Genome Biol Evol*. 2014;6:591-605.
34. Halanych KM. The new view of animal phylogeny. *Ann Rev Ecol Evol Syst*. 2004;35:229-56.
35. Halanych KM. How our view of animal phylogeny was reshaped by molecular approaches: lessons learned. *Organisms Divers Evol*. 2016;16:319-28.
36. Hall BK. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev*. 2000;2:3-5.
37. Hall BK, Gillis JA. Incremental evolution of the neural crest, neural crest cells and neural crest-derived skeletal tissues. *J Anat* 2013;222:19-31.
38. Hall DA, Saxl H. Studies of human and tunicate cellulose and of their relation to reticulins. *Proc Roy Soc Lond Sers B Biol Sci*. 1961;155:202-17.
39. Hertel J, Stadler PF. The expansion of animal microRNA families revisited. *Life (Basel)*. 2015;5:905-20.
40. Holland LZ. Cephalochordata. In: Wanninger A, ed. *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 6: Deuterostomia*. Vienna: Springer Vienna; 2015.
41. Holland LZ. Tunicates. *Curr Biol*. 2016;26:R146-R52.
42. Holland PWH. Did homeobox gene duplications contribute to the Cambrian explosion? *Zool Lett*. 2015;1:1.
43. Huang W, Tsai L, Li Y, Hua N, Sun C, Wei C. Widespread of horizontal gene transfer in the human genome. *BMC Genomics*. 2017;18(1):274.



44. Ikuta T. Evolution of invertebrate deuterostomes and Hox/ParaHox genes. *Genomics, Proteomics Bioinformatics*. 2011;9(3):77-96.
45. Isaeva VV. Heterochronies, heterotopies, and cell resources of development in ontogenetic and evolutionary transformations. *Paleontol J*. 2015;49:1530-7.
46. Isaeva VV. Evolutionary gains and losses in Bilateria. *Paleontol J*. 2016;50:1477-85.
47. Jeffery WR. Ascidian neural crest-like cells: phylogenetic distribution, relationship to larval complexity, and pigment cell fate. *J Exp Zoology Part B Mol Dev Evol*. 2006;306:470-80.
48. Jue NK, Batta-Lona PG, Trusiak S, Obergfell C, Bucklin A, O'Neill MJ, et al. Rapid evolutionary rates and unique genomic signatures discovered in the first reference genome for the southern ocean salp, *Salpa thompsoni* (Urochordata, Thaliacea). *Genome Biol Evol*. 2016;8:3171-86.
49. Katija K, Choy CA, Sherlock RE, Sherman AD, Robison BH. From the surface to the seafloor: How giant larvaceans transport microplastics into the deep sea. *Scie Advances*. 2017;3(8):e1700715.
50. Kimura S, Itoh T. Biogenesis and function of cellulose in the tunicates. In: Brown RM, Saxena IM, eds. *Cellulose: Molecular and Structural Biology: Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2007.
51. Kowalevsky AO. Entwicklungsgeschichte der einfachen Ascidien. *Mem Acad Sci St-Petersburg Ser 7*. 1866;10:1-16.
52. Lamarck J-B. *Histoire Naturelle Des Animaux Sans Vertèbres*. Paris: Verdrière; 1816.
53. Lemaire P. Unfolding a chordate developmental program, one cell at a time: Invariant cell lineages, short-range inductions and evolutionary plasticity in ascidians. *Deve Biol*. 2009;332:48-60.
54. Lemaire P, Smith WC, Nishida H. Ascidians and the plasticity of the chordate developmental program. *Curr Biol*. 2008;18:R620-R31.
55. Louis A, Roest Crollius HR, Robinson-Rechavi M. How much does the amphioxus genome represent the ancestor of chordates? *Brief Funct Genomics*. 2012;11:89-95.
56. Mallo M, Alonso CR. The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development*. 2013;140:3951-63.
57. Martí-Solans J, Belyaeva OV, Torres-Aguila NP, Kedishvili NY, Albalat R, Cañestro C. Coelimination and survival in gene network evolution: Dismantling the RA-signaling in a chordate. *Mol Biol Evol*. 2016;33:2401-16.
58. Nakamura MJ, Terai J, Okubo R, Hotta K, Oka K. Three-dimensional anatomy of the *Ciona intestinalis* tailbud embryo at single-cell resolution. *Devel Biol*. 2012;372:274-84.
59. Nakashima K, Yamada L, Satou Y, Azuma JI, Satoh N. The evolutionary origin of animal cellulose synthase. *Develop Genes Evol*. 2004;214:81-8.
60. Nydam ML, Giesbrecht KB, Stephenson EE. Origin and dispersal history of two colonial ascidian clades in the *Botryllus schlosseri* species complex. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169944.
61. Pallas PS. *Spicilegia Zoologica*. Vol 1. Fascicle 10. Berlin: G.A. Lange; 1774.
62. Peterson KJ, Eernisse DJ. The phylogeny, evolutionary developmental biology, and paleobiology of the Deuterostomia: 25 years of new techniques, new discoveries, and new ideas. *Organisms Diver Evol*. 2016;16:401-18.
63. Philippe H, Lartillot N, Brinkman H. Multigene analyses of Bilaterian animals corroborate the monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Molec Biol Evol*. 2005;22:1245-53.
64. Putnam NH, Butts T, Ferrier DEK, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, et al. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*. 2008;453:1064-71.
65. Raff RA, Kaufman TC. *Embryos, Genes, and Evolution: The Developmental-Genetic Basis of Evolutionary Change*. Indiana University Press; 1991.
66. Rubinstein ND, Feldstein T, Shenkar N, Botero-Castro F, Griggio F, Mastrototaro F, et al. Deep sequencing of mixed total DNA without barcodes allows efficient assembly of highly plastic ascidian mitochondrial genomes. *Genome Biol Evol*. 2013;5:1185-99.
67. Ruppert EE. Introduction: Microscopic anatomy of the notochord, heterochrony, and chordate evolution. In: Harrison FW, Ruppert EE, eds. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 15. Hemichordata, Chaetognatha, and the invertebrate Chordata: Wiley-Liss, Inc.; 1997. p. 1-13.
68. Sagane Y, Zech K, Bouquet JM, Schmid M, Bal U, Thompson EM. Functional specialization of cellulose synthase genes of prokaryotic origin in chordate larvaceans. *Development*. 2012;137:1483-92.
69. Salvador-Martínez I, Salazar-Ciudad I. How complexity increases in development: An analysis of the spatial-temporal dynamics of Gene expression in *Ciona intestinalis*. *Mech Develop*. 2017;144:113-24.
70. Salzberg SL. Horizontal gene transfer is not a hallmark of the human genome. *Genome Biol*. 2017;18(1):85.
71. Sasakura Y, Ogura Y, Treen N, Yokomori R, Park S-J, Nakai K, et al. Transcriptional regulation of a horizontally transferred gene from bacterium to chordate. *Proc Roy Soc B Biol Sci*. 2016;283(1845).

72. Satoh N, Rokhsar D, Nishikawa T. Chordate evolution and the three-phyllum system. *Proc Roy Soc B Biol Sci.* 2014;281(1794).
73. Seo H-C, Edvardsen RB, Maeland AD, Bjordal M, Jensen MF, Hansen A, et al. Hox cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*. *Nature.* 2004;431:67-71.
74. Seo HC, Kube M, Edvardsen RB, Jensen MF, Beck A, Spriet E, Gorsky G, Thompson EM, Lehrach H, Reinhardt R, Chourrout D. Miniature genome in the marine chordate *Oikopleura dioica*. *Science* 2001;294:2506.
75. Shenkar N, Swalla BJ. Global diversity of Ascidiacea. *PLoS One.* 2011;6(6).
76. Shukalyuk AI, Isaeva VV. Molecular signature and sub-cellular machinery of metazoan gametogenic stem cells In: Perrote A, ed. *Recent Advances in Germ Cells Research: Nova Science Publishers Inc.*; 2013. p. 1-40.
77. Sieber KB, Bromley RE, Dunning Hotopp JC. Lateral gene transfer between prokaryotes and eukaryotes. *Exp Cell Res.* 2017 (Publ. ahead of print).
78. Singh TR, Tsagkogeorga G, Delsuc F, Blanquart S, Shenkar N, Loya Y, et al. Tunicate mitogenomics and phylogenetics: Peculiarities of the *Herdmania momus* mitochondrial genome and support for the new chordate phylogeny. *BMC Genomics.* 2009;10.
79. Sinkovics JG. Horizontal gene transfers with or without cell fusions in all categories of the living matter. *Adv Exp Med Biol* 2011;950:5-89.
80. Small KS, Brudno M, Hill MM, Sidow A. A haplome alignment and reference sequence of the highly polymorphic *Ciona savignyi* genome. *Genome Biol* 2007;8:R41
81. Smith KF, Abbott CL, Saito Y, Fidler AE. Comparison of whole mitochondrial genome sequences from two clades of the invasive ascidian, *Didemnum vexillum*. *Marine Genomics.* 2015;19:75-83.
82. Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet.* 2015;16:472-82.
83. Stach T. Chordate phylogeny and evolution: A not so simple three-taxon problem. *J Zool.* 2008;276: 117-41.
84. Stach T, Braband A, Podsiadlowski L. Erosion of phylogenetic signal in tunicate mitochondrial genomes on different levels of analysis. *Mol Phylogenet Evol.* 2010;55:860-70.
85. Stach T, Turbeville JM. Phylogeny of Tunicata inferred from molecular and morphological characters. *Mol Phylogenet Evol.* 2002;25:408-28.
86. Stolfi A, Brown FD. Tunicata. In: Wanninger A, ed. *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates.* 6. Wien: Springer; 2015. p. 135-204.
87. Swalla BJ, Xavier-Neto J. Chordate origins and evolution. *Genesis.* 2008;46(11):575-9.
88. Swithers KS, Soucy SM, Gogarten JP. The Role of Reticulate Evolution in Creating Innovation and Complexity. *Int J Evol Biol.* 2012;10.
89. Tassy O, Dauga D, Daian F, Sobral D, Robin F, Khoueiry P, et al. The ANISEED database: Digital representation, formalization, and elucidation of a chordate developmental program. *Genome Res.* 2010;20:1459-68.
90. Telford MJ, Copley RR. Improving animal phylogenies with genomic data. *Trends Genet.* 2011;27: 186-95.
91. Tsagkogeorga G, Turon X, Galtier N, Douzery EJP, Delsuc F. Accelerated evolutionary rate of housekeeping genes in tunicates. *J Mol Evol.* 2012;71: 153-67.
92. Tsagkogeorga G, Turon X, Hopcroft RR, Tilak MK, Feldstein T, Shenkar N, et al. An updated 18S rRNA phylogeny of tunicates based on mixture and secondary structure models. *BMC Evol Biol.* 2009;9(1).
93. Yarrell W. *A History of British Fishes.* London: Van Voorst J.;1836.
94. Wang K, Dantec C, Lemaire P, Onuma TA, Nishida H. Genome-wide survey of miRNAs and their evolutionary history in the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *BMC Genomics.* 2017;18(1):314.
95. Willey A. *Amphioxus and Ancestry of Vertebrata.* N.Y.; 1894.
96. Zervoudaki S, Frangoulis C, Svensen C, Christou ED, Tragou E, Arashkevich EG, et al. Vertical carbon flux of biogenic matter in a coastal area of the Aegean Sea: The importance of appendicularians. *Estuaries and Coasts.* 2014;37:911-24.