

Коваленкова Мария Владимировна

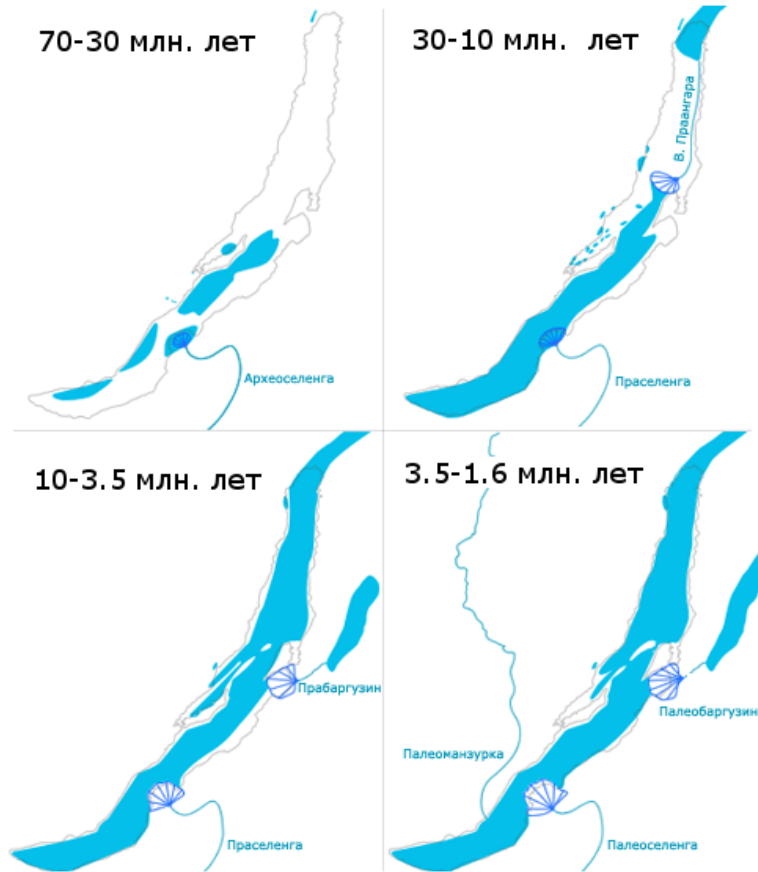
ОСОБЕННОСТИ ЭВОЛЮЦИИ БОГАТЫХ ВИДАМИ
ГРУПП БАЙКАЛЬСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ НА
ОСНОВАНИИ ИНФОРМАЦИИ О НУКЛЕОТИДНЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ЯДЕРНЫХ ИНТРОНОВ

03.02.07 – генетика

Научный руководитель: д.б.н., Щербаков Д.Ю.

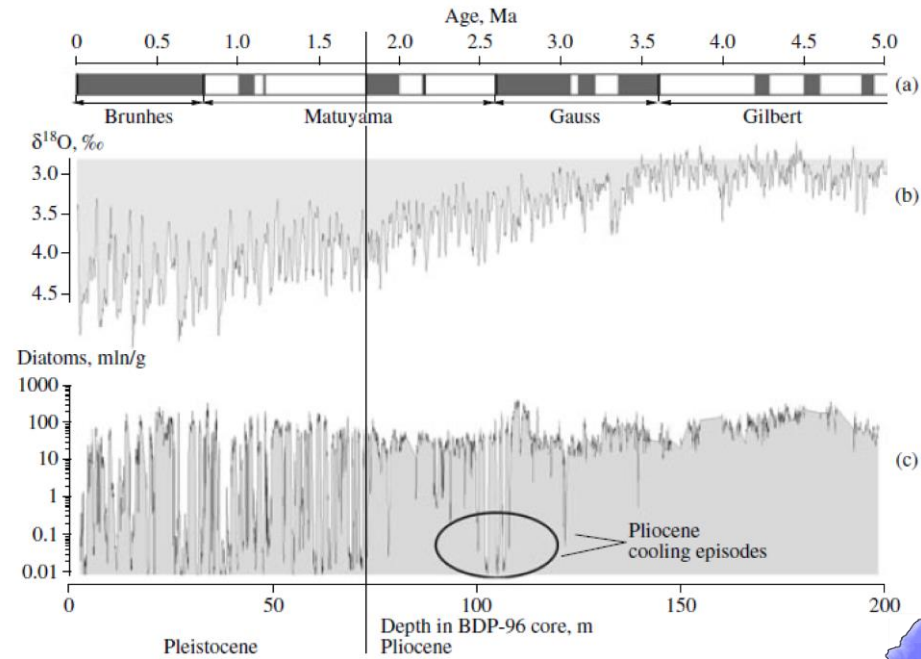
Научный консультант: д.б.н., Ситникова Т.Я.

Актуальность работы

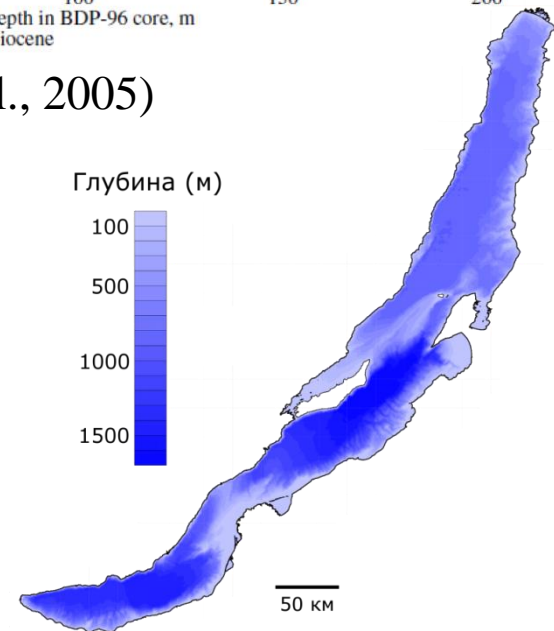


по (Мац, Ефимова, 2011)

- Протяженность береговой линии 2000 км.
- Средняя глубина более 700 м.
- > 2.500 видов животных (Тимошкин, 2001).

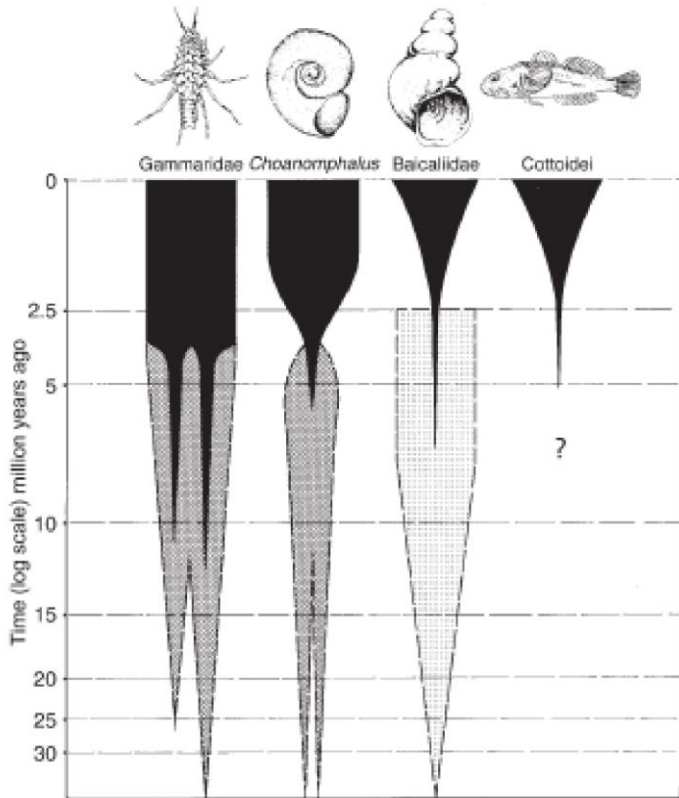


по (Goldberg et al., 2005)

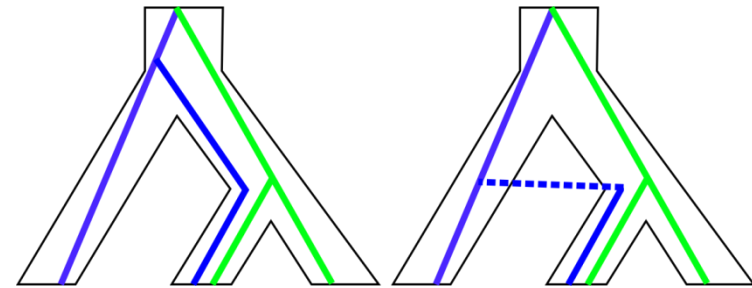


Актуальность работы

- Несмотря на то, что Байкал — древнейшее из всех существующих пресноводных озер, время происхождения большинства населяющих его групп животных относительно невелико, что затрудняет исследование их филогенетических отношений.
- Дерево, построенное по одному локусу может не соответствовать эволюционной истории видов.
- Необходимы переменные ядерные локусы для получения корректной филогенетической истории.



по (Sherbakov, 1999)



- EPIC (Exon-Primed Intron-Crossing)-PCR (Lessa et al., 1992).
- Универсальные праймеры для амплификации единственных интронов генов α - и β -субъединиц АТФ-синтазы (Jarman et al., 2002).

Актуальность работы



G. fasciatus

Генералист, 0 -5 м.

Амфиподы надсем.

Gammaroidea

>360 видов

(8 сем. 8-25 млн).

(Камалтынов, 2001).



Полихеты р. *Manayunkia*

3 вида ?

(возраст 5-2,5 млн)

Видообразование в

соответствии с

субстратными

предпочтениями

(Пудовкина и др., 2015).



K. semenkewitschii

Псаммофил, 3-20 м.

Моллюски подсем.

Vaicaliinae

>40 видов

(возраст 6-3 млн)

Видообразование в

соответствии с

субстратными

предпочтениями

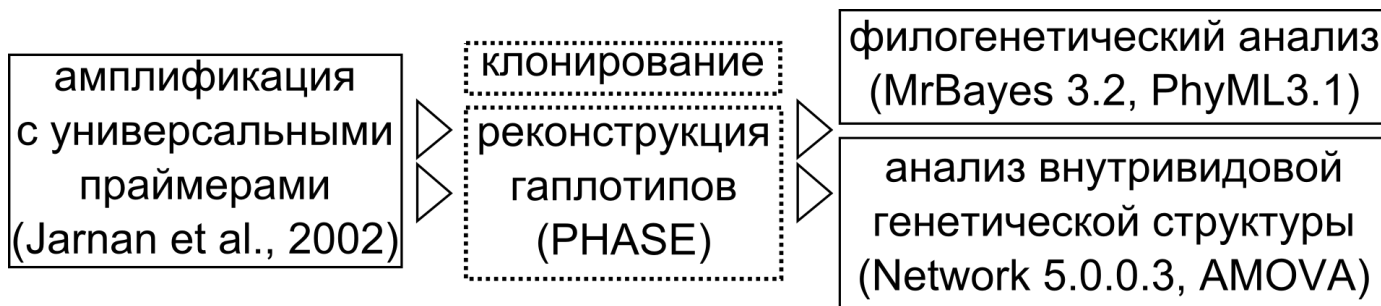
(Ситникова, 2004).

Цель работы – исследовать особенности эволюции нуклеотидных последовательностей **интронов генов α - и β -субъединиц АТФ-синтазы**, оценить их пригодность в качестве филогенетических маркеров богатых видами групп байкальских беспозвоночных.

1. Исследование возможности применения интронных маркеров для уточнения филогенетических отношений байкальских эндемиков: амфипод надсем. Gammaroidea, полихет р. *Manayunkia*, моллюсков подсем. Baicaliinae и изучения внутривидового генетического разнообразия амфипод *Gmelinoides fasciatus* и моллюсков *Korotnewia semenkewitschii*;
2. Сравнение филогенетических деревьев, построенных с использованием нуклеотидных последовательностей интронов с результатами анализа фрагментов мтДНК и систематикой, основанной на морфологических признаках амфипод, полихет и моллюсков;
3. Объединение морфологических, экологических и генетических данных моллюсков подсем. Baicaliinae для получения наиболее полной картины эволюции представителей подсемейства.

Материалы и методы

Группа??	Кол-во видов	Кол-во экз.	Кол-во станций сбора	Маркер
Амфиподы	14	101	39	ATPs β
<i>Gmelinoides fasciatus</i>	—	76	28	ATPs β
Моллюски (B)	12	24	8	ATPs β
Моллюски (A)	21	94	43	ATPs α
<i>Korotnewia semenkewitschii</i>	—	29	13	ATPs α
Полихеты	3+M.sp1+M.sp2	32	13	ATPs α



Положения, выносимые на защиту:

1. Нуклеотидные последовательности единственных интронов генов α - и β -субъединиц АТФ-синтазы амфипод надсем. *Gammaoidea* и моллюсков подсем. *Baicaliinae* достаточно информативны для осуществления филогенетического анализа, являются нейтральными маркерами, эволюционирующими со скоростью митохондриальных и быстрых ядерных локусов;
2. Совместное использование сведений полученных с помощью ядерных (интроны генов α и β -субъединиц АТФ-синтазы) и митохондриального локуса позволяет наиболее полно характеризовать процессы формирования богатых видами групп байкальских беспозвоночных, в частности выявить случаи интрогрессии у байкальских моллюсков подсем. *Baicaliinae*;
3. Анализ нуклеотидных последовательностей интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы позволил достоверно определить границы популяций амфипод *G. fasciatus* в Байкале.

3.1. Эволюция интронов амфипод надсем. Gammaroidea

Амфиподы надсем. Gammaroidea

В Байкале представлено 8 семействами,

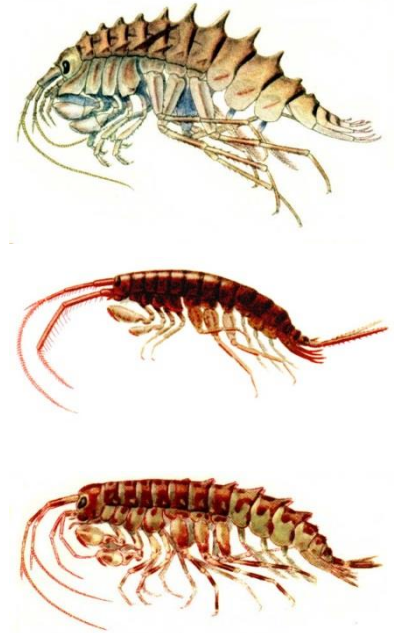
7 из которых эндемичные.

>360 видов

8-25 млн.

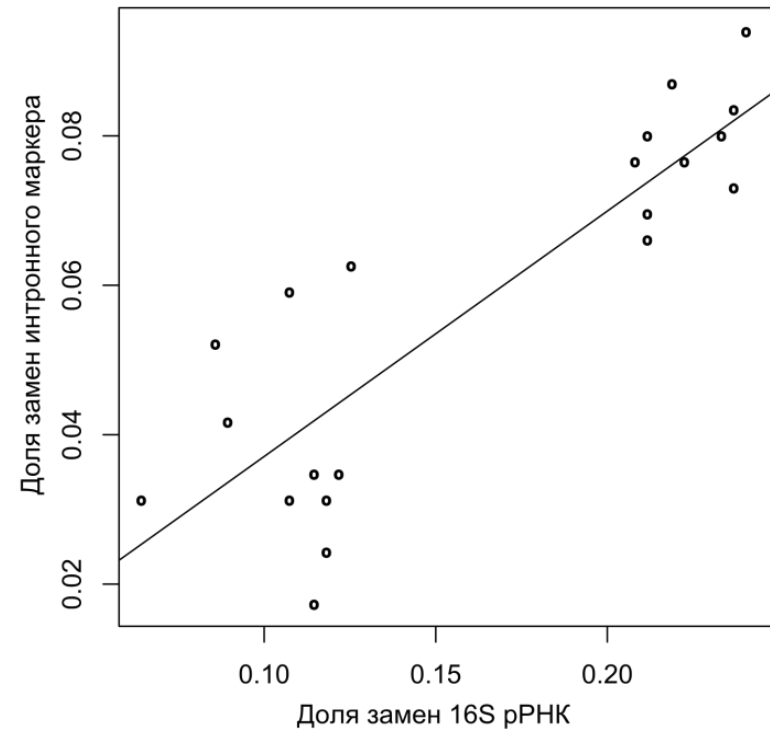
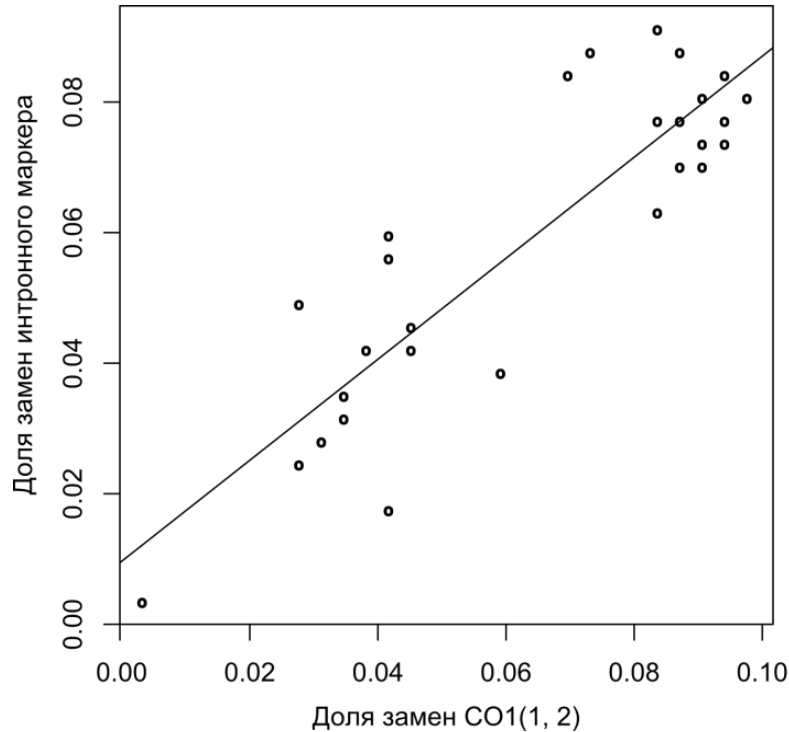
(Камалтынов, 2001).

Результаты молекулярно-филогенетических исследований не вполне согласуются с морфологическими характеристиками групп, есть свидетельства стремительного видообразования у относительно молодых представителей сем. Acantogammaridae, Eulimnogammaridae и Pallaseidae (Naumenko et al., 2017).



илл. В.Ч. Дорогостайского

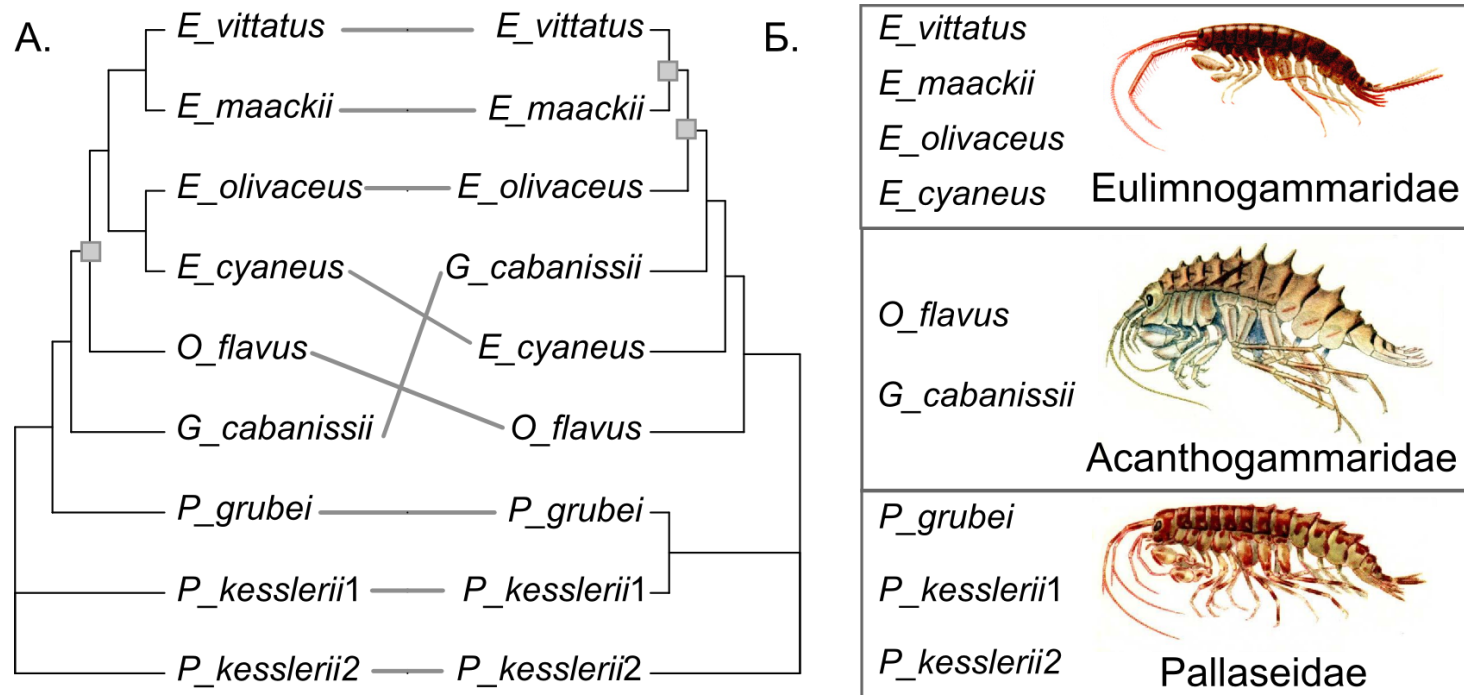
3.1.1. Эволюция интронов амфипод сем. Acontogammaridae, Eulimnogammaridae и Pallaseidae



Корреляции генетических дистанций амфипод сем. Acontogammaridae, Eulimnogammaridae и Pallaseidae по ядерному и митохондриальным маркерам.

- Генетические дистанции интронного локуса хорошо коррелируют с дистанциями по митохондриальным фрагментам (CO1 и 16S рРНК).

3.1.1. Эволюция интронов амфипод сем. Acanthogammaridae, Eulimnogammaridae и Pallaseidae



ML-клатограммы амфипод полученные с использованием интронного локуса (А) и фрагмента гена CO1 (Б).

Серым отмечены узлы с вероятностями менее 0.75.

- Дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей интронного локуса, в большей степени соответствует существующей систематике байкальских амфипод.

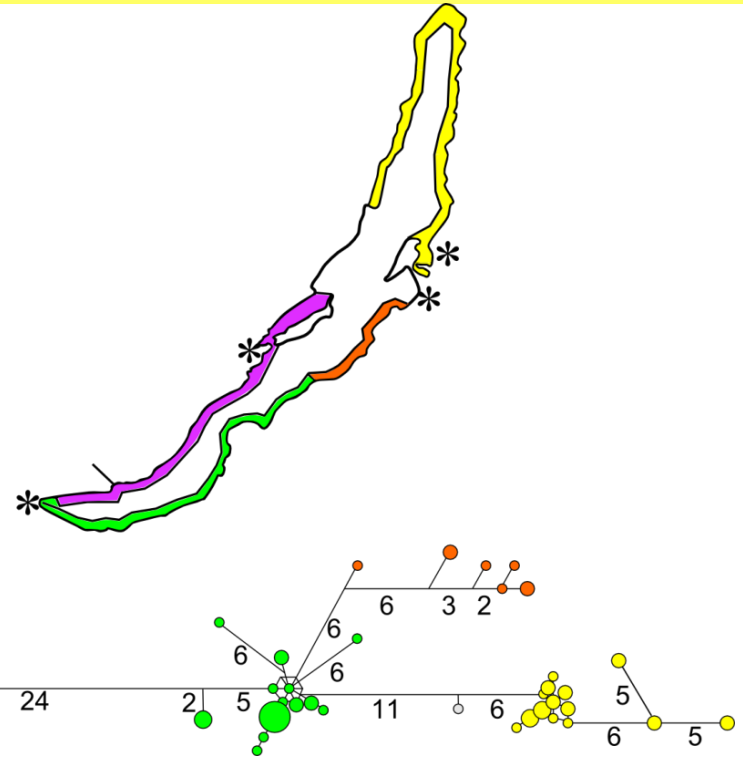
3.1. Эволюция интронов амфипод надсем. Gammaroidea

- Интрон гена β -субъединицы АТФ-синтазы информативен для достаточно крупных таксономических рангов (сем. Acantogammaridae, Eulimnogammaridae и Pallaseidae имеют 25% замен в фолмеровском фрагменте гена цитохром с-оксидазы).

3.1.2. Генетическая структура амфипод *Gmelinoides fasciatus* в Байкале

Сем. Micrurpodidae одно из наиболее древних и сильно отличающихся от остальных представителей надсемейства. «Теплолюбивые реликты».
(Камалтынов, 2001).

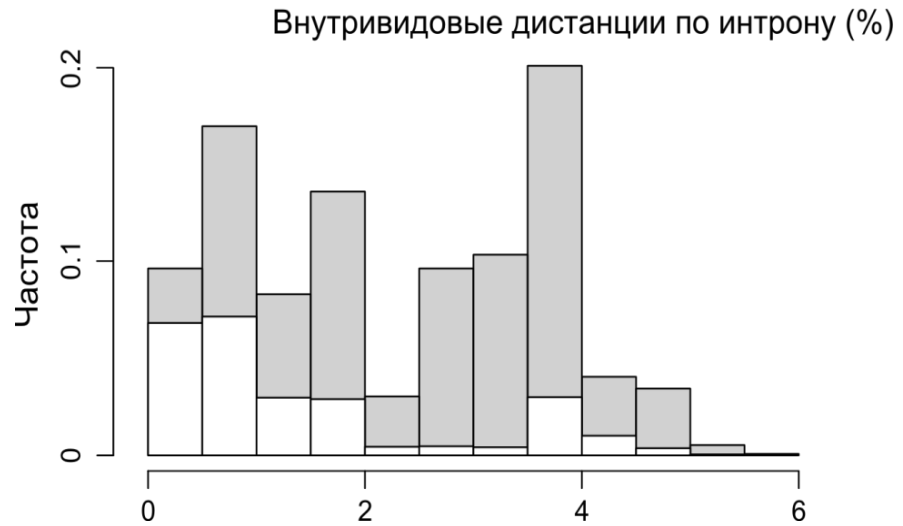
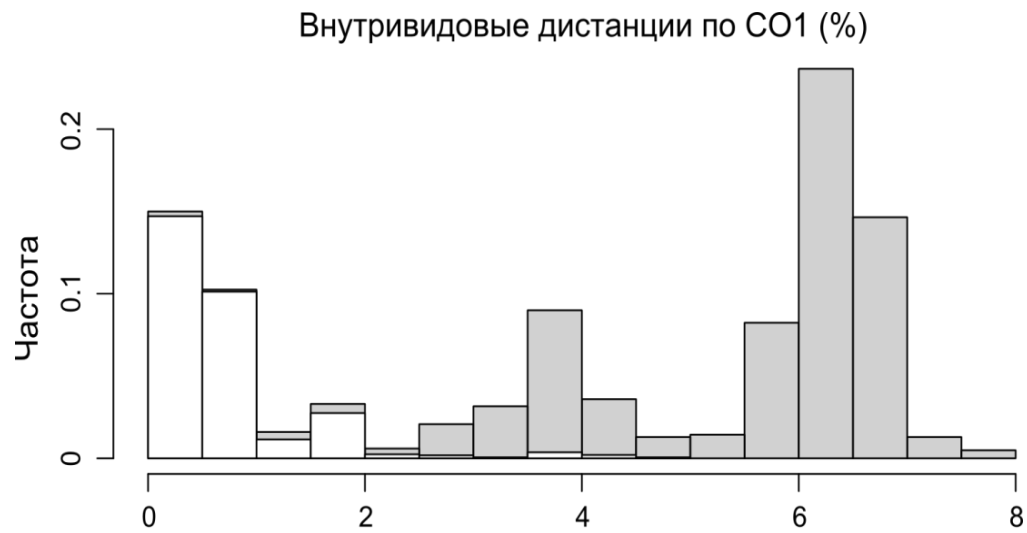
G. fasciatus –генералист, 0-5 м, «ленточный ареал»



По Гоманенко и др, 2005;
дополнено собств. данными

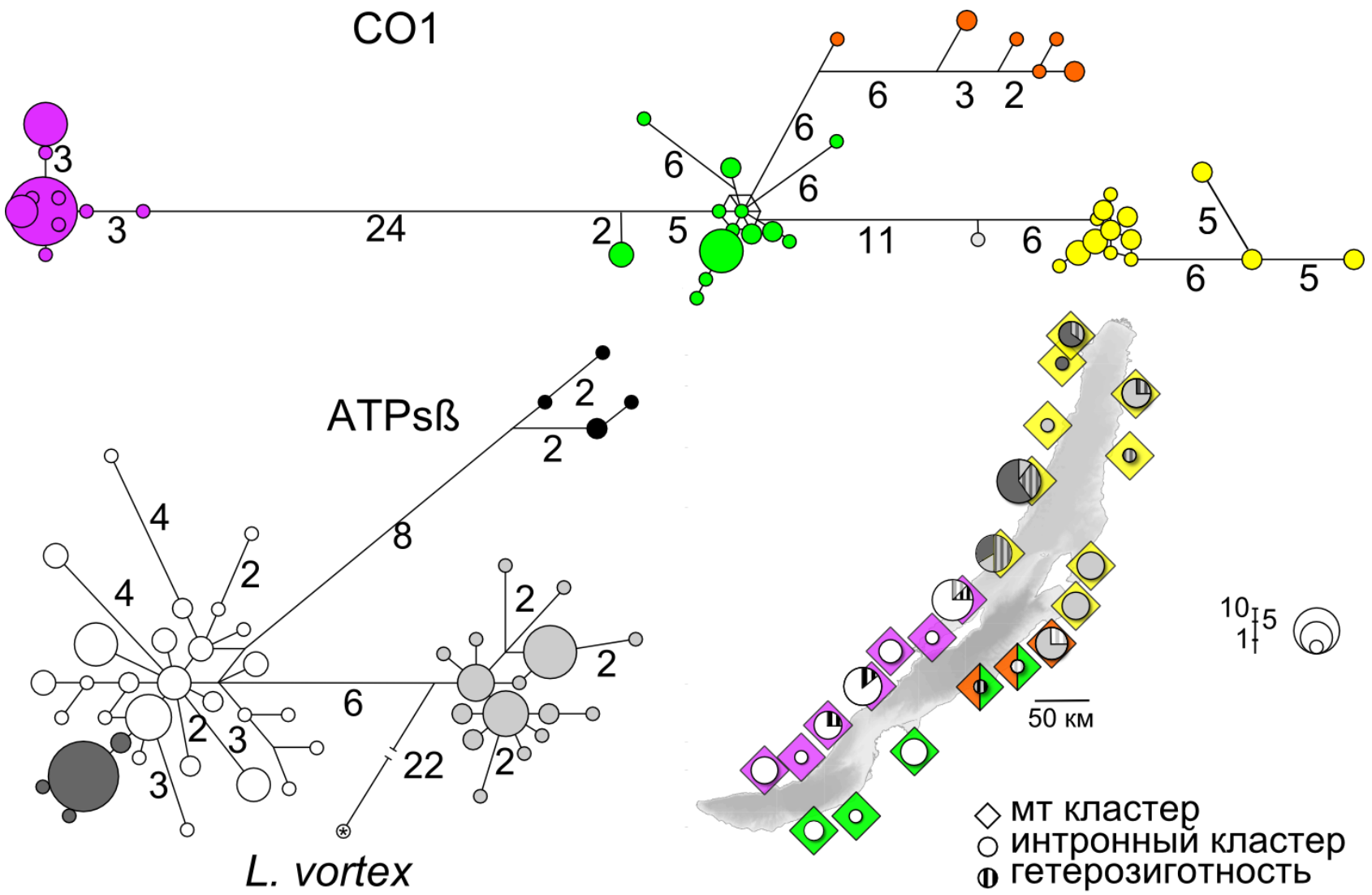
Ранее при использовании фолмеровского фрагмента гена цитохром с-оксидазы показано наличие в Байкале 4-х популяций, границы которых не совпадают с известными географическими барьерами, предполагается рефугиальное происхождение популяций (Гоманенко и др., 2005).

3.1.2. Генетическая структура амфипод *Gmelinoides fasciatus* в Байкале



Распределение попарных дистанций между аллелями CO1 и интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы из одной популяции (белый цвет) и разных популяций (серый цвет).

3.1.2. Генетическая структура амфипод *Gmelinoides fasciatus* в Байкале



Медианные сети по митохондриальному (CO1) и интронному (ATPsβ) маркерам и карта-схема точек сбора и частот аллелей *G.fasciatus* в Байкале.

3.1.2. Генетическая структура амфипод *Gmelinoides fasciatus* в Байкале

- Интрон гена β -субъединицы АТФ-синтазы является информативным маркером для изучения внутривидового разнообразия *G. fasciatus*.
- Показано, что генетическая структура *G. fasciatus* в Байкале, определенная на основании полиморфизма интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы в большей степени соответствует географической подразделенности озера, чем митохондриальное дерево вида.

3.2. Эволюция интронов моллюсков подсем. Baicaliinae

Моллюски подсем. Baicaliinae

>40 видов

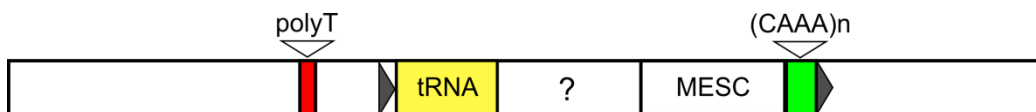
возраст «букета видов» 6-2 млн.

- Видообразование в соответствии с субстратными предпочтениями и высокая морфологическая изменчивость (Ситникова, 2004).
- Стремительная эволюция (Зубаков и др. 1997).



3.2. Эволюция интронов моллюсков подсем. *Baicaliinae*

3.2.1. Интрон гена β - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. *Baicaliinae*



Структура диспергированного повтора. polyT- предполагаемый полипиримидиновый тракт интрона; polyA- сигнал полиаденилирования транспозона. (CAAA)n- концевой повтор ретротранспозона

- Интрон гена β - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. *Baicaliinae* может быть использован как дополнительный филогенетический маркер, но необходимо исследование его на соответствие нейтральной модели эволюции.

3.2. Эволюция интронов моллюсков подсем. Baicaliinae

3.2.1. Интрон гена β - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. Baicaliinae

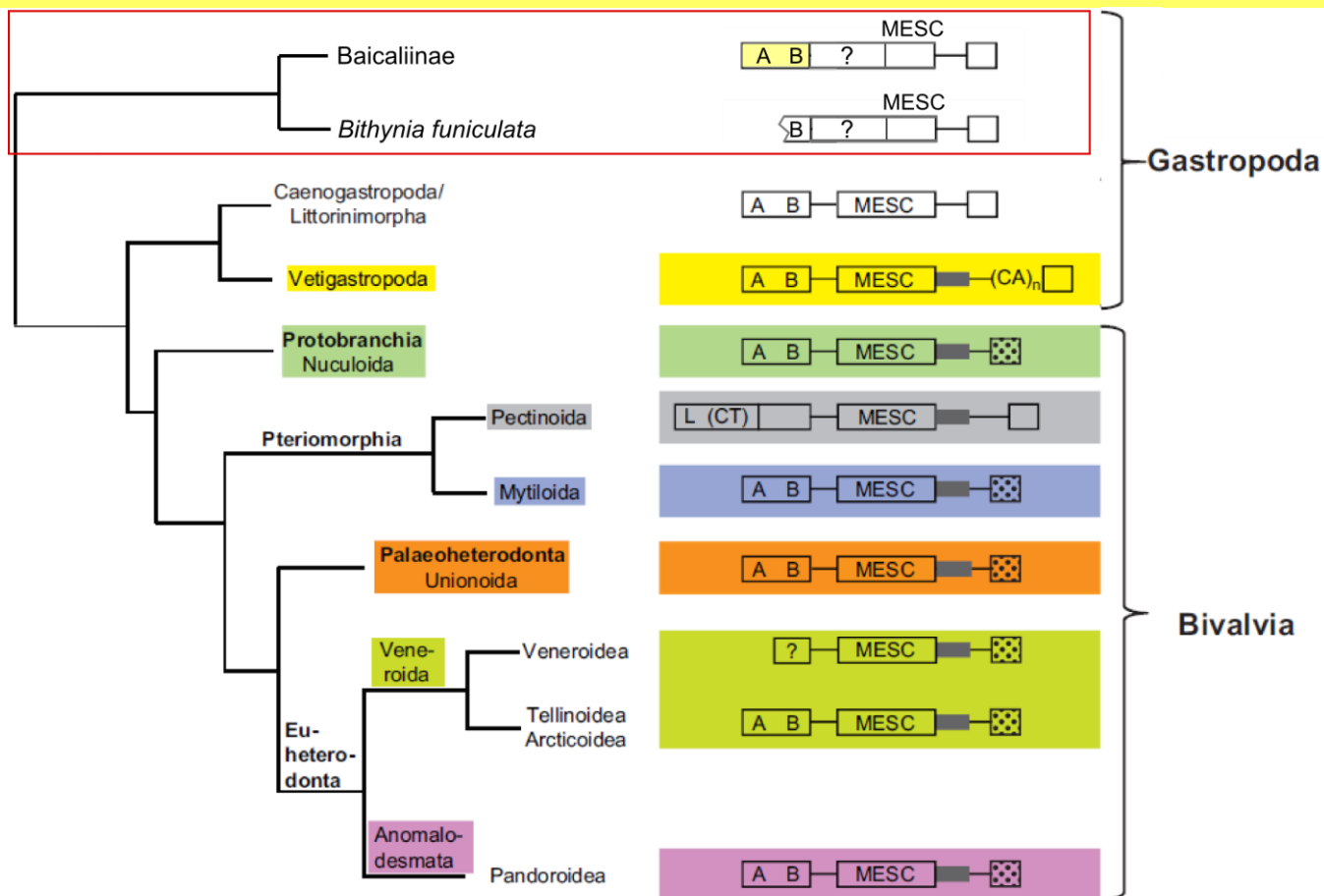
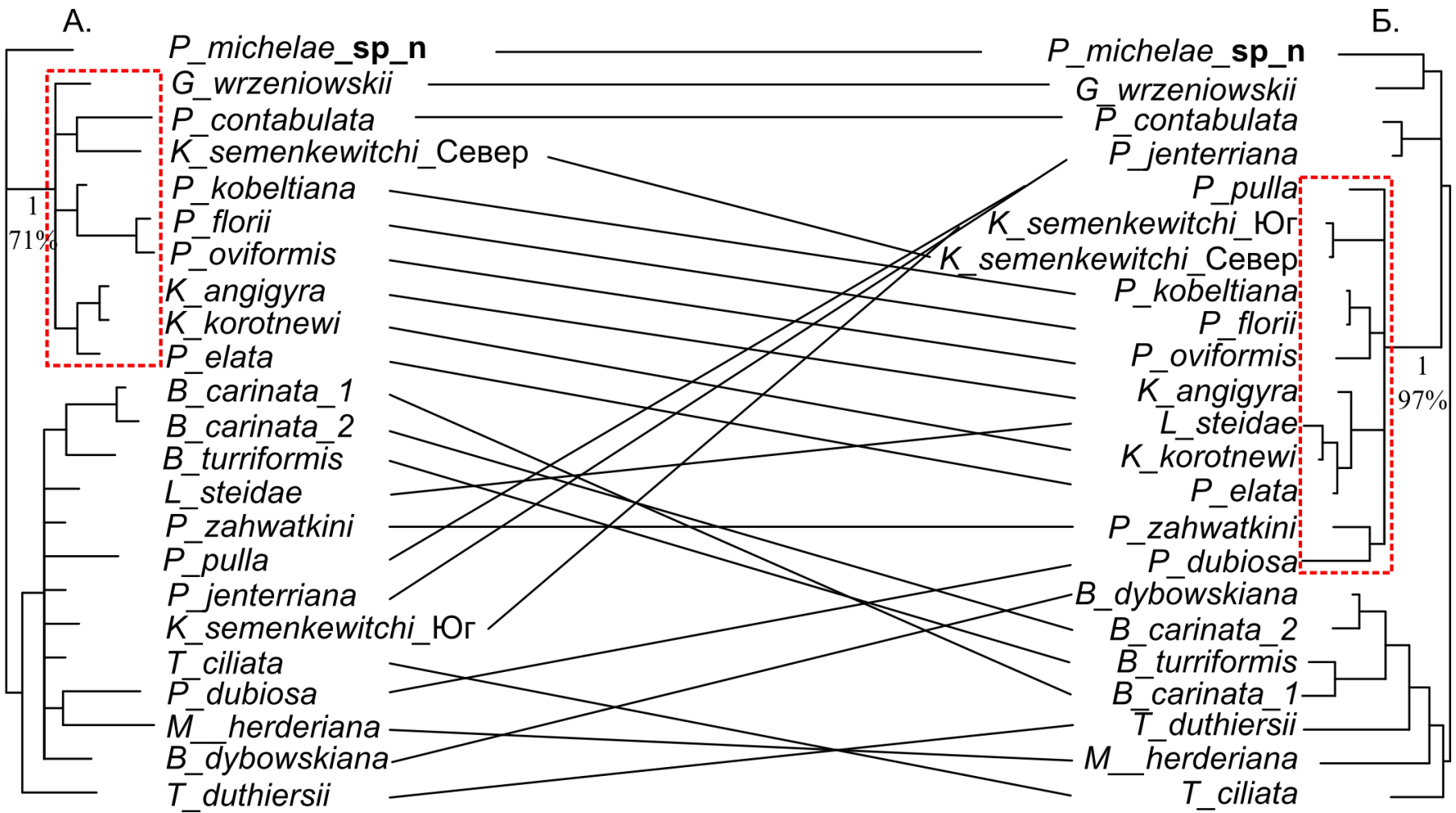


Схема распространения повторов семейства MESC в геномах и транскриптах моллюсков (Matetovici et al., 2016).

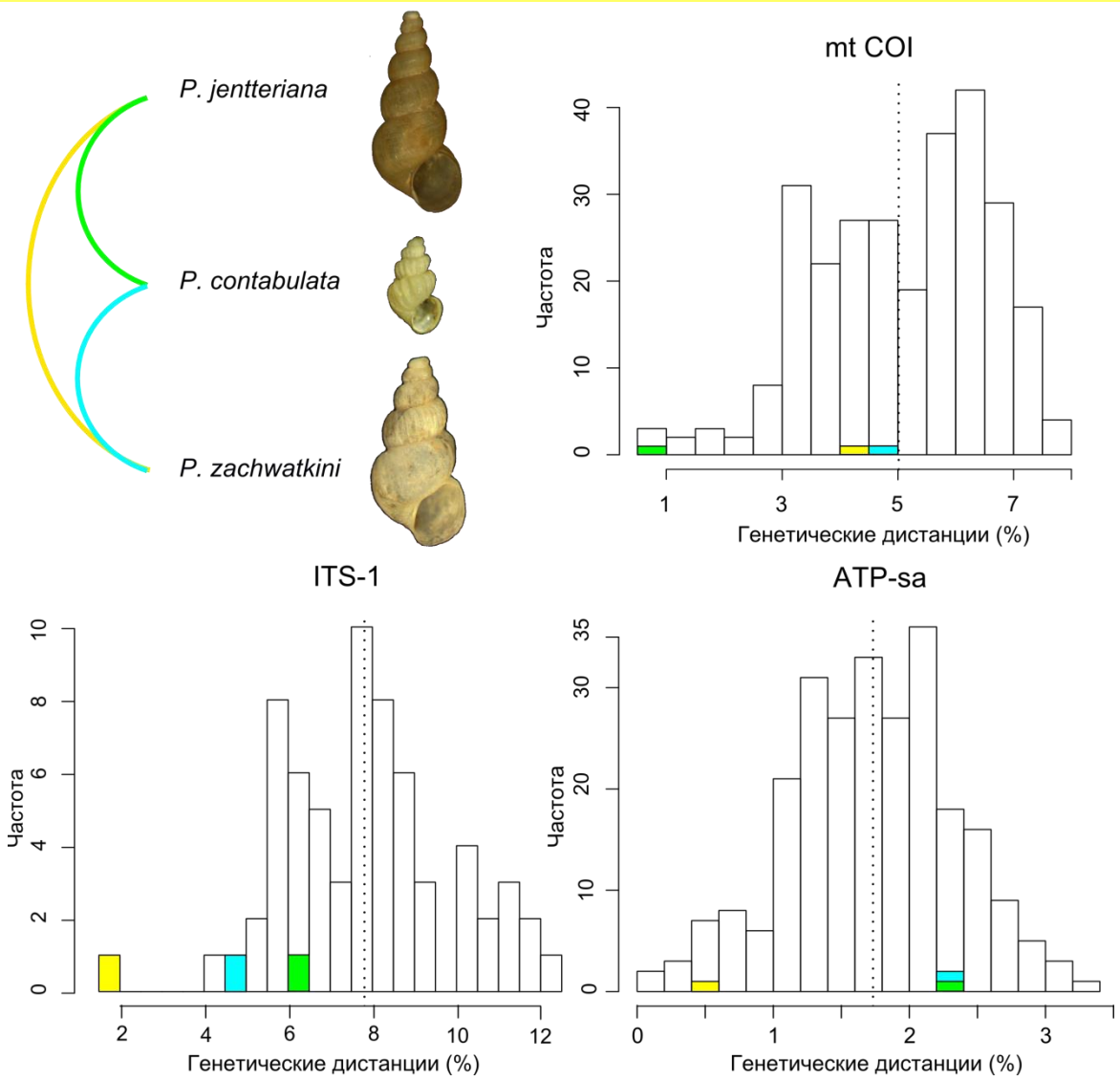
- Транспозон, обнаруженный в геномах байкалийн (*Amnicolidae*) и *Bithynia funiculata* (*Bithyniidae*) отличается от прочих представителей семейства транспозонов MESC.

3.2.2. Интрон гена α - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. Baicaliinae



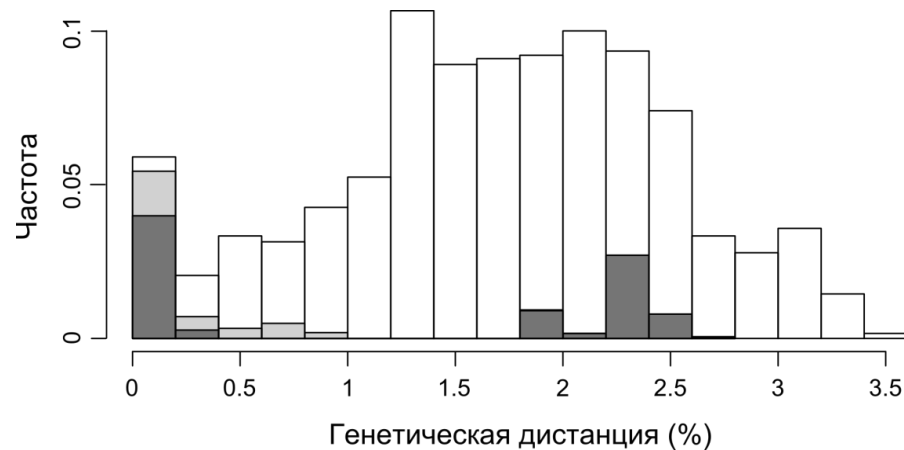
Филогенетические деревья моллюсков подсем. Baicaliinae на основании нуклеотидных последовательностей «центральных аллелей» интрона гена α -субъединицы АТФ-синтазы (А) и фолмеровского фрагмента CO1 (Б). Узлы со значениями апостериорных вероятностей менее 0.5 схлопнуты в политомии.

3.2.2. Интрон гена α - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. Baicaliinae



Локализация средних межвидовых генетических дистанций трех видов р. *Pseudobaicalia* на распределении попарных межвидовых дистанций байкалийн по трем локусам.

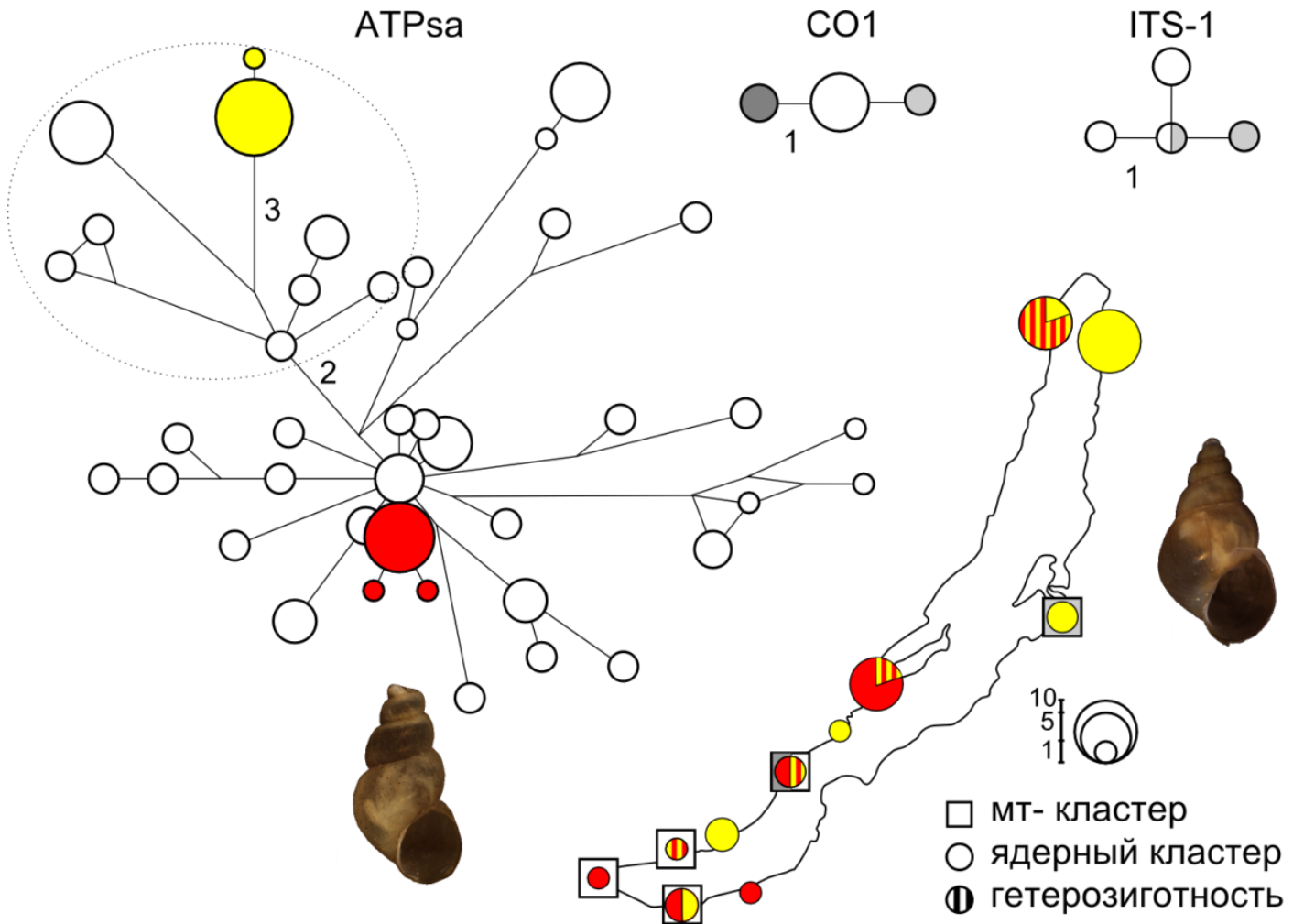
3.2.2. Интрон гена α - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. *Baicaliinae*



Гистограмма межвидовых (белый цвет) и внутривидовых (светло-серый) попарных генетических дистанций аллелей интрона гена α -субъединицы АТФ-синтазы моллюсков. Темно-серым показаны дистанции внутри вида *K. semenkewitschii*.

- Обнаружен общий для трех видов аллель интрона. Часть несоответствий топологий, полученных при использовании митохондриального и интронного локусов может быть связана с сохранением предкового полиморфизма, а в ряде случаев может быть следствием межвидовой гибридизации и интрогрессии.

3.2.3. Генетическая структура *Korotnewia semenkewitschii* в Байкале

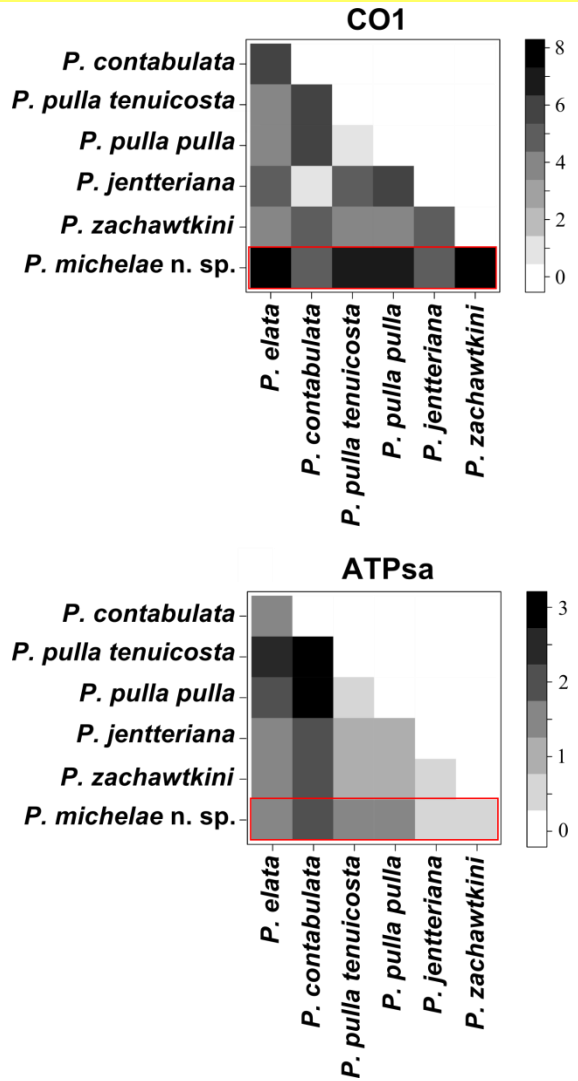
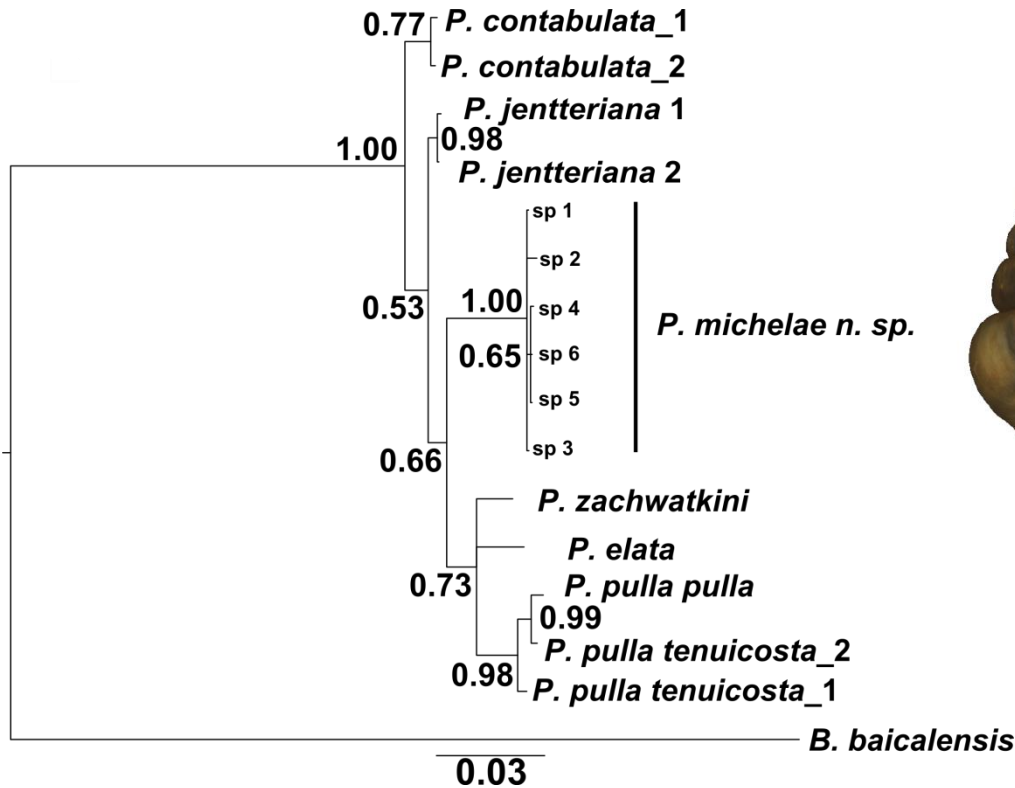


Внутривидовая изменчивость *K. semenkewitchii* по интронному, митохондриальному и межгенному маркерам. Карта-схема частот аллелей.

3.2.3. Генетическая структура *Korotnewia semenkewitschii* в Байкале

- Интрон гена α -субъединицы АТФ-синтазы является информативным маркером для исследования популяций *K. semenkewitschii*.
- Высокий уровень внутривидового полиморфизма может быть связан с интрогрессией фрагмента ядерного генома.

3.2.4. Таксономический статус *Pseudobaikalia michelae* sp. n.



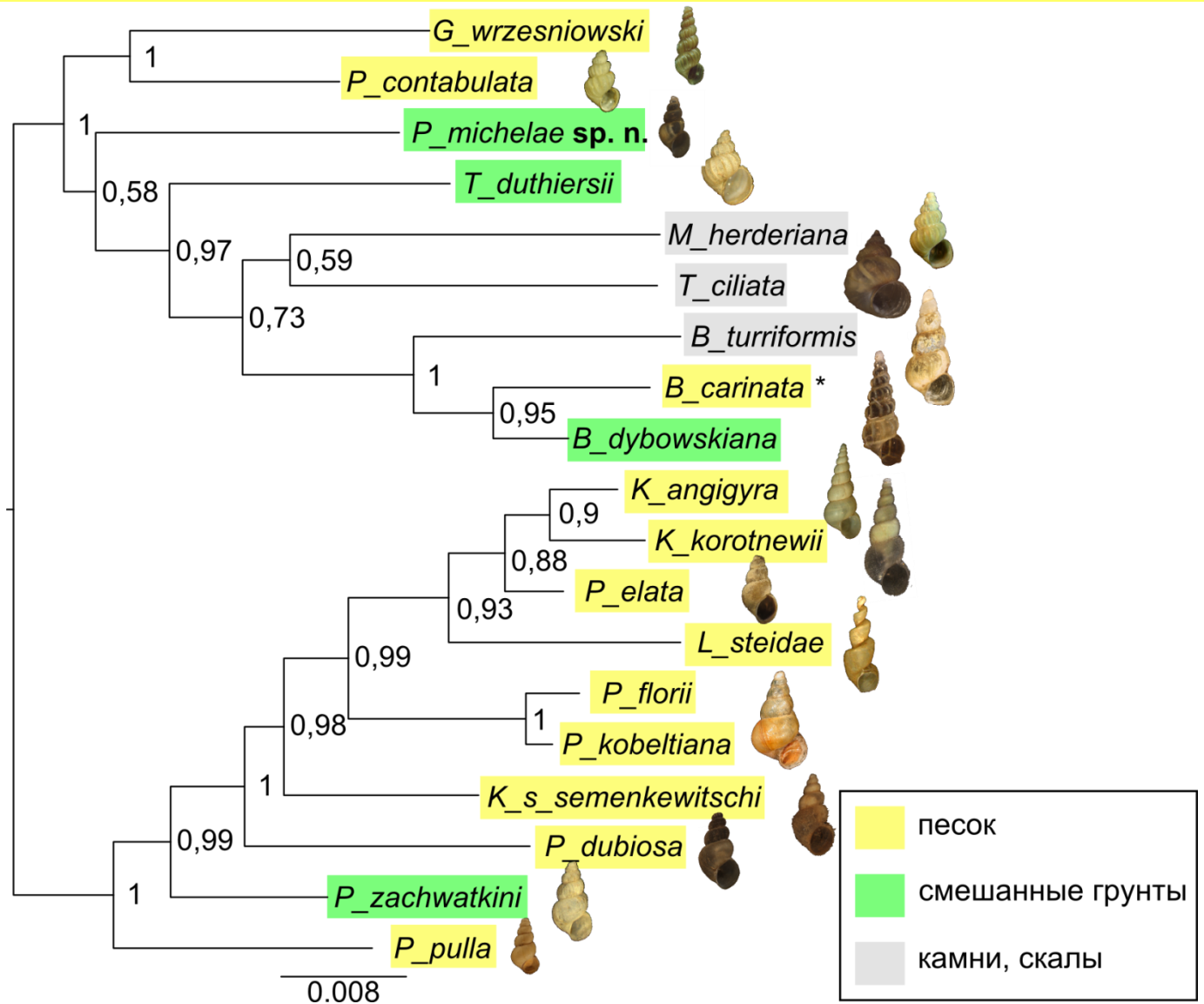
Байесовское дерево моллюсков рода *Pseudobaikalia*, построенное на основании объединения трех генетических маркеров (ATP α , CO1, 16S рРНК).

Тепловые карты межвидовых генетических дистанций

3.2.2. Интрон гена α -субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. Baicaliinae

- Интрон гена α -субъединицы АТФ-синтазы является информативным маркером для исследования филогенетических отношений моллюсков подсем. Baicaliinae, несмотря на то, что в ряде случаев (р. *Pseudobaikalia* и *Teratobaikalia*) отмечено явление сохранения предкового полиморфизма.

3.2.4. Объединение генетических, морфологических и экологических признаков моллюсков подсем. Baicaliinae



Байесовское дерево девятнадцати видов байкалийн, построенное на основании объединения морфологических и генетических признаков.

3.2.3. Объединение генетических, морфологических и экологических признаков моллюсков подсем. *Baicaliinae*

- Впервые получено полностью разрешенное дерево моллюсков подсем. *Baicaliinae*, которое в значительной степени согласуется с экологическими и морфологическими характеристиками видов.

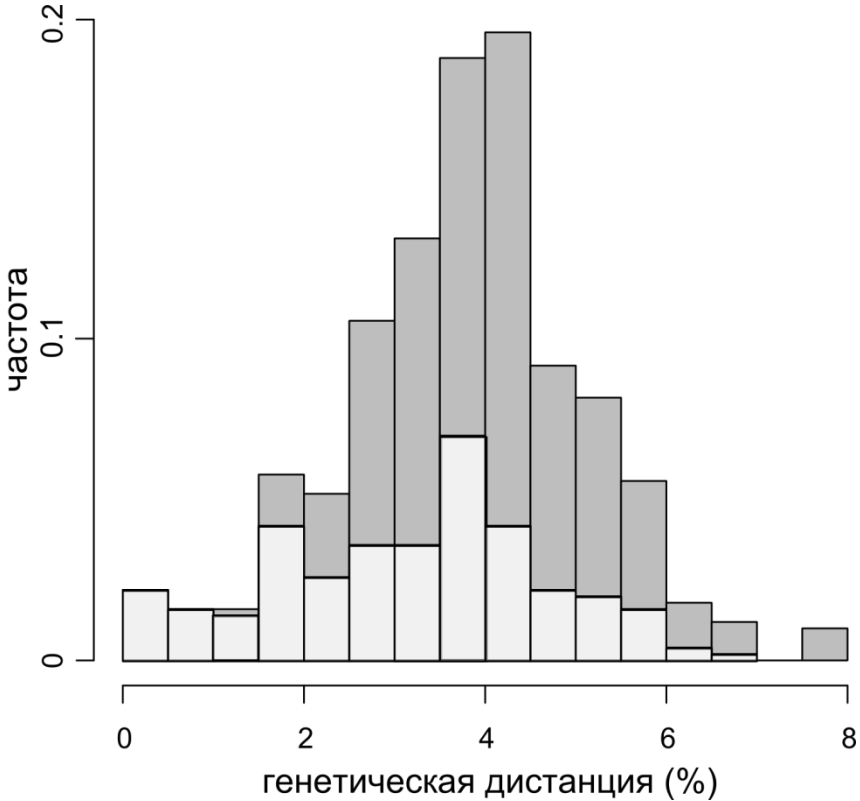
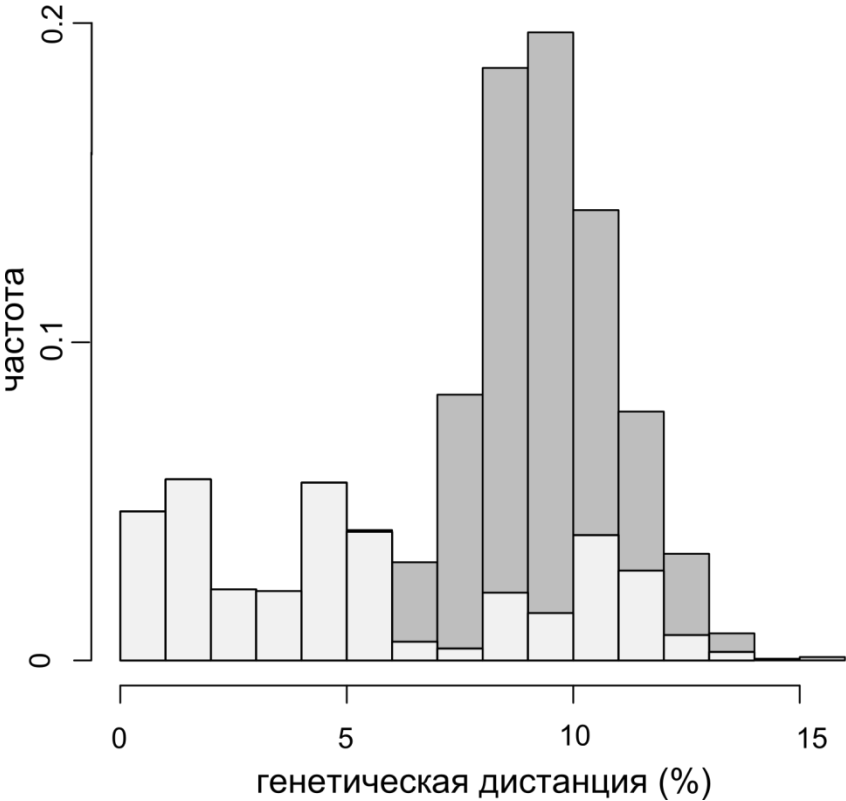
3.3. Филогенетическое исследование полихет р. *Manayunkia*

Полихеты р. *Manayunkia*
в Байкале представлен 3 видами
возраст байкальских манаюнкий ок. 5-2,5 млн.

- Видообразование в соответствии с субстратными предпочтениями: разные виды используют разные субстраты для построения трубочек.
- «Пятнистое» распределение в Байкале.
- Высказано предположение о существовании криптических видов в комплексе *M. zenkewitschii* из-за больших генетических дистанций (Пудовкина и др., 2015).
- Есть относительно подвижная стадия: мужские половые клетки могут перемещаться с током воды на некоторое расстояние.

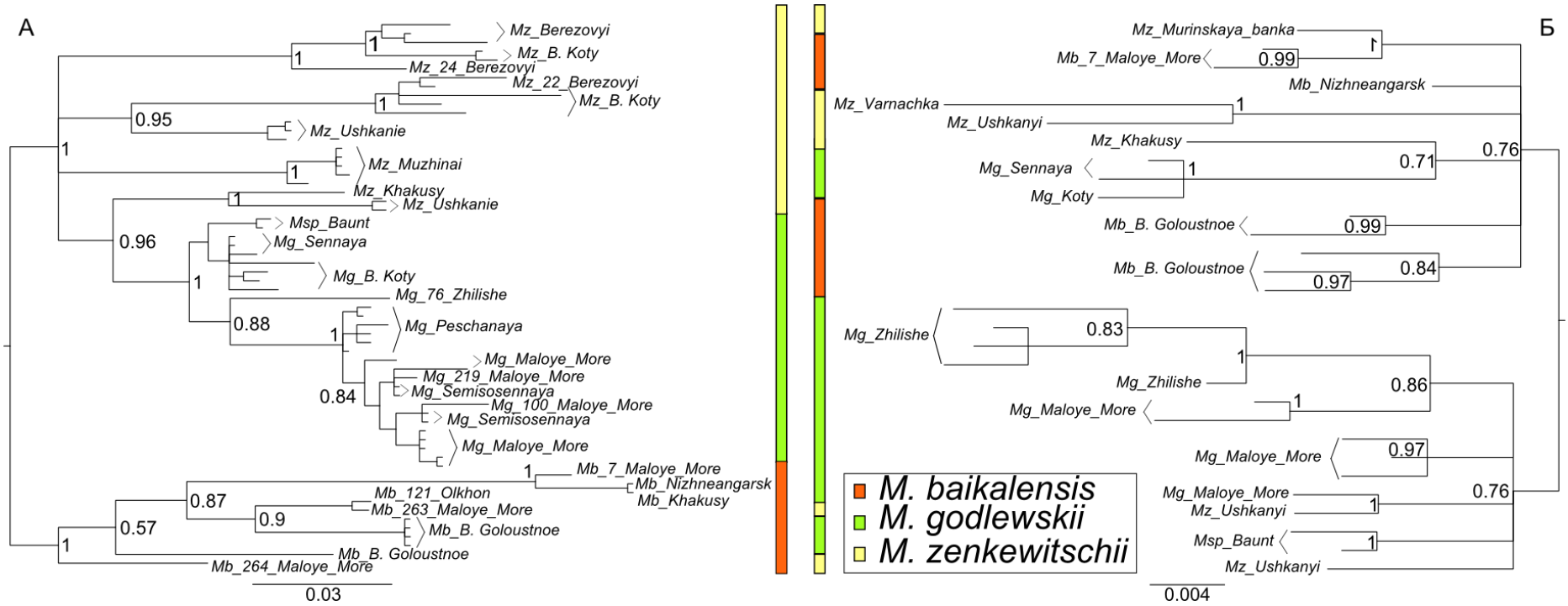


3.3. Филогенетическое исследование полихет р. *Manayunkia*



Распределения внутривидовых (светло-серый) и межвидовых (темно-серый) дистанций по локусам митохондриальной (CO1) и ядерной (интрон ATP8a) локализации.

3.3. Филогенетическое исследование полихет р. *Manayunkia*



Филогенетические деревья полихет по фолмеровскому фрагменту CO1 (А) и интрону гена α -субъединицы АТФ-синтазы (Б).

3.3. Филогенетическое исследование полихет р. *Manayunkia*

- Наблюдаемые несоответствия топологий деревьев по митохондриальному и ядерному маркерам могут быть следствием сохранения предкового полиморфизма интронным локусом, поскольку оценки эффективной численности аутомсомных локусов в 4 раза больше, чем для митохондриального генома и сортировка линий происходит медленнее.
- Интрон гена α -субъединицы АТФ-синтазы не подходит для видовой идентификации полихет.

Выводы:

1. Показано, что нуклеотидные последовательности интронов генов α и β -субъединиц АТФ-синтазы являются информативными маркерами относительно быстрых эволюционных процессов у различных групп эндемичных байкальских беспозвоночных: амфипод надсем. Gammaroidea и моллюсков подсем. Baicaliinae.
2. Сравнение эволюционного дерева манаюнкий, построенного с использованием интрона гена α -субъединицы АТФ-синтазы, с известным митохондриальным деревом показало, что достоверные различия между ними соответствуют различиям, ожидаемым при неполном разделении предковых линий по интронному локусу.
3. Показано, что топология дерева, построенного на основании нуклеотидных последовательностей интрона гена α -субъединицы АТФ-синтазы, отличается от топологии митохондриального дерева моллюсков подсем. Baicaliinae, что указывает на митохондриальные интрогрессии у этих моллюсков в Байкале.
4. Впервые в результате совместного использования морфологических и молекулярных признаков получено полностью дихотомическое дерево моллюсков подсем. Baicaliinae, которое объясняет экологическую специализацию видов.
5. В единственном интроне гена β -субъединицы АТФ-синтазы байкалийн обнаружена последовательность ретротранспозона, родственного семейству транспозонов MESC, широко распространенному у брюхоногих и двустворчатых моллюсков.
6. Показано, что генетическая структура *Gmelinoides fasciatus* в Байкале, определенная на основании полиморфизма интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы в большей степени соответствует географической подразделенности озера, чем митохондриальное дерево вида.
7. Найден и описан новый вид *Pseudobaikalia michelae* sp. n. на основании генетических и впервые обнаруженных морфологических данных.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Коваленкова М. В., Ситникова Т. Я., Щербаков Д. Ю. Генетическая и морфологическая диверсификации гастропод семейства Baicaliidae //Экологическая генетика. – 2013. – Т. 11. № 4.
2. Sitnikova T., Kovalenkova M., Peretolchina T., Sherbakov D. A new, genetically divergent species of Pseudobaikalia Lindholm, 1909 (Caenogastropoda, Baicaliidae) //ZooKeys. – 2016. № 593. – P. 1.
3. Щербаков Д. Ю., Коваленкова М. В., Майкова О. О. Некоторые результаты молекулярно-филогенетических исследований байкальских эндемичных беспозвоночных //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. № 4. – С. 404-407.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю – д.б.н. Щербакову Д.Ю., научному консультанту – д.б.н. Ситниковой Т.Я., а также коллегам лаб. геносистематики за ценные консультации и поддержку на всех этапах подготовки диссертационной работы.

Огромную благодарность за сбор материалов:

К. Н. Регель

Д. В. Матафонову

Т. А. Пудовкиной

Ж.В. Петуниной

Выводы:

1. Нуклеотидные последовательности интронов генов α и β -субъединиц АТФ-синтазы являются информативными маркерами относительно быстрых эволюционных процессов у различных групп эндемичных байкальских беспозвоночных: амфипод надсем. Gammaroidea и моллюсков подсем. Baicaliinae;
2. Интрон гена α -субъединицы АТФ-синтазы не пригоден для филогенетических реконструкций манаюнок, что может быть следствием неполного разделения предковых линий интронного локуса;
3. Показано, что топология дерева, построенного на основании нуклеотидных последовательностей интрона гена α -субъединицы АТФ-синтазы, отличается от митохондриального дерева моллюсков подсем. Baicaliinae, что указывает на митохондриальные интрогрессии у этих моллюсков в Байкале;
4. Совместное использование морфологических и молекулярных признаков позволило впервые получить дихотомическое дерево моллюсков подсем. Baicaliinae, которое в значительной степени согласуется с их экологической специализацией;
5. В единственном интроне гена β -субъединицы АТФ-синтазы байкалийн обнаружена последовательность ретротранспозона, родственного семейству транспозонов MESC, широко распространенному у брюхоногих и двустворчатых моллюсков;
6. Показано, что генетическая структура *Gmelinoides fasciatus* в Байкале, определенная на основании полиморфизма интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы в большей степени соответствует географической подразделенности озера, чем митохондриальное дерево вида;
7. Подтверждена генетическая обособленность нового для науки вида *Pseudobaikalia michelae* **n. sp.**