

На правах рукописи



КОВАЛЕНКОВА Мария Владимировна

**АНАЛИЗ ЭВОЛЮЦИИ БОГАТЫХ ВИДАМИ ГРУПП
БАЙКАЛЬСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ НА ОСНОВАНИИ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ИНТРОНОВ ГЕНОВ α - И β -
СУБЪЕДИНИЦ АТФ-СИНТАЗЫ**

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2018

Работа выполнена в лаборатории геносистематики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологического института СО РАН (ЛИН СО РАН), г. Иркутск

Научный

Щербаков Дмитрий Юрьевич

руководитель:

д.б.н., заведующий лабораторией геносистематики, ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

Официальные

Блинов Александр Геннадьевич

оппоненты:

к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических систем ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Лавренченко Леонид Александрович

д.б.н., заведующий лабораторией микроэволюции млекопитающих ФГБУН Института проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова РАН, г. Москва

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Защита диссертации состоится « 6 » февраля 2019 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел: +7(383) 363-49-06 (1321); факс: +7(383) 333-12-78

e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан « » декабря 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук



Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Исследование механизмов формирования и поддержания современного биоразнообразия является одной из ключевых задач генетики и имеет огромное практическое значение в контексте мониторинга состояния окружающей среды и рационального природопользования.

Озеро Байкал — крупнейший в мире резервуар пресной воды, как и другие древние озера, населено исключительно разнообразной фауной, при этом более половины обитающих в Байкале видов животных — эндемики (Тимошкин, 2001).

В течение последнего пятилетия в литоральной зоне озера Байкал отмечаются стремительные изменения бентосных сообществ (Kravtsova et al., 2014; Timoshkin et al., 2016), поэтому исследование протекающих в них эволюционных процессов приобретает большое значение. Для прогнозирования возможных изменений экосистемы в целом необходимо иметь сведения об исходном состоянии и масштабах естественных преобразований, происходящих в озере.

Несмотря на то, что Байкал — древнейшее из всех существующих озер, время дивергенции большинства его обитателей относительно невелико, что затрудняет исследование их филогенетических отношений (Sherbakov, 1999). Филогенетические построения, основанные на единичных молекулярных маркерах, могут исказить эволюционную картину для «молодых» таксономических групп. Для получения наиболее полной информации о процессах видообразования необходимо применение, по возможности, большего числа несцепленных и вариабельных маркеров. При этом изменчивые фрагменты должны быть фланкированы достаточно консервативными регионами, для упрощения создания универсальных праймеров. Интроны ядерных генов получили достаточно широкое распространение в качестве таких маркеров (Reisser et al., 2011; David et al., 2016; Colgan, 2018). Однако существует ряд ограничений их применения в филогенетических исследованиях: большая изменчивость длин, отличия в скоростях накопления замен у разных таксонов, наличие регуляторных областей, подверженных действию отбора.

Чтобы исследовать особенности эволюции и, соответственно, возможности применения интронных фрагментов для решения разных эволюционных задач, были выбраны три группы байкальских беспозвоночных, которые отличаются по экологическим характеристикам и времени дивергенции этих групп в Байкале: амфиподы надсем. *Gammaroidea* (Latreille, 1802), моллюски подсем. *Baicaliinae* (Fisher, 1885), полихеты рода *Manayunkia* (Bourne, 1883) (Зубаков и др., 1997; Камалтынов, 2001; Пудовкина и др., 2015).

Цели и задачи исследования. Цель данной работы – исследовать особенности эволюции нуклеотидных последовательностей интронов генов α - и β -субъединиц АТФ-синтазы, оценить их пригодность в качестве филогенетических маркеров для богатых видами групп байкальских беспозвоночных. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование возможности применения интронных маркеров для уточнения филогенетических отношений байкальских эндемиков: амфипод надсем. *Gammaroidea*, полихет рода *Manayunkia*, моллюсков подсем. *Baicaliinae* и изучения внутривидового генетического разнообразия амфипод *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899);
2. Выяснение эволюционных историй модельных групп полихет, моллюсков, амфипод с помощью сравнения деревьев, построенных на основании разнородных данных - нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров ядерной и митохондриальной локализации, а также морфологических признаков;
3. Объединение морфологических, экологических и генетических данных моллюсков подсем. *Baicaliinae* для получения наиболее полной картины эволюции представителей подсемейства.

Научная новизна работы. Впервые охарактеризована изменчивость интронных последовательностей на межвидовом уровне – у амфипод надсем. *Gammaroidea*, моллюсков подсем. *Baicaliinae* и полихет рода *Manayunkia*, и внутривидовом – у амфипод *G. fasciatus* и моллюсков *Korotnewia semenkewitschi*. Показано, что последовательности интронов генов α - и β -субъединиц АТФ-синтазы по уровню полиморфизма сопоставимы с другими быстро эволюционирующими генетическими маркерами (например, CO1 и

ITS-1). Разрешающая способность филогенетического анализа на основании интронных маркеров зависит от возраста и эволюционной истории анализируемых групп: для эволюционно более молодых групп – байкальских полихет и моллюсков – затруднено использование последовательностей интронов для видовой идентификации.

В ходе работы впервые за последние 40 лет обнаружен и описан новый для науки вид моллюсков подсем. Baicaliinae — *Pseudobaikalia michelae* sp. n., который является эндемиком озера Байкал. Впервые получены подтверждения интрогрессии у гастропод сестринских видов рода *Pseudobaikalia* (Lindholm, 1909) и у подвидов *K. semenkewitschi*.

В библиотеках ридов геномов трех видов байкалийн и в интроне гена β -субъединицы АТФ-синтазы обнаружен ретротранспозон частично схожий с ретротранспозонами семейства MESC, широко распространенными у двустворчатых и брюхоногих моллюсков.

Научно-практическое значение. Результаты диссертационной работы расширяют уже имеющиеся сведения о механизмах эволюции «букетов видов» байкальских беспозвоночных. Полученные данные полезны для проведения таксономической ревизии моллюсков подсемейства Baicaliinae и амфипод надсем. Gammaoidea, а также для моделирования микроэволюционных процессов гибридизации и интрогрессии. Нуклеотидные последовательности обнаруженного мобильного элемента возможно использовать для поиска сходных структур в геномах моллюсков надсем. Rissooidea (Gray, 1847) и анализа эволюции SINE-элементов. Полученные материалы используются в учебных программах биолого-почвенного факультета Иркутского государственного университета и вошли в учебное пособие для бакалавров и магистров «Актуальные проблемы современной генетики: биоинформационные методы анализа биоразнообразия».

Положения, выносимые на защиту:

1. Нуклеотидные последовательности единственных интронов генов α - и β -субъединиц АТФ-синтазы амфипод надсем. Gammaoidea и моллюсков подсем. Baicaliinae являются нейтральными маркерами,

эволюционирующими со скоростью, сопоставимой со скоростью митохондриальных (CO1 и 16S рРНК) и быстрых ядерных маркеров (ITS-1).

2. Полиморфизм интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы отражает существование в Байкале двух не полностью изолированных групп амфипод *Gmelinoides fasciatus*, что отчасти соответствует внутривидовой изменчивости фрагмента митохондриальной ДНК (CO1) и географическому распределению популяций этого вида в озере.

3. Межвидовая интрогрессия оказала существенное влияние на формирование видового разнообразия эндемичных байкальских моллюсков подсем. Baicaliinae.

Апробация работы. Результаты работы представлены: на VI Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия» (2013 г., г. Иркутск, Россия); на III Всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (2013 г., г. Улан-Удэ, Россия); на 4-й Международной конференции «Molecular Phylogenetics-4» (2014 г., г. Москва, Россия), на 6-й Международной Верещагинской Байкальской Конференции (2015 г., г. Иркутск, Россия), на 8-ом международном симпозиуме МАРЕЕГ-2015 (2015 г., г. Владивосток, Россия), на 10-й Международной конференции BGRS\SB-2016 (2016 г., г. Новосибирск, Россия).

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность д.б.н. Т.Я. Ситниковой, а также всем коллегам лаб. геносистематики за ценные консультации и поддержку на всех этапах подготовки диссертационной работы.

Объем и структура диссертации. Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, заключение, список цитируемой литературы (190 источников) и приложение; изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и 42 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы содержит информацию об особенностях симпатрического видообразования и эволюционных процессов в древних озерах, о таксономическом составе байкальских полихет, гастропод и амфипод, и их экологии. Приведен обзор научной литературы об использовании интронов ядерных генов для исследования эволюционно молодых групп животных.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В главе описаны методики сбора амфипод, моллюсков и полихет оз. Байкал, экстракции тотальной ДНК, амплификации ядерных и митохондриальных фрагментов. Амплификацию фрагментов генов α - и β - субъединиц АТФ-синтазы проводили с использованием универсальных праймеров, фланкирующих единственные интроны этих генов (Jarman et al., 2002). Для определения последовательностей ядерных маркеров использовалось клонирование предшествующее секвенированию, или последующая реконструкция гаплотипов с помощью алгоритма PHASE (Garrick et al., 2010). Модель нуклеотидных замен для каждого фрагмента определяли с помощью программы jModelTest (Posada, 2008). Филогенетический анализ проведен в программе MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012) и PhyML 3.1 (Guindon et al., 2010), поддержки топологий оценивались с помощью апостериорных вероятностей и методом бутстреп-теста (1000 репликаций). Анализ генетической структуры *G. fasciatus* и *K. semenkewitschi* проведен с помощью программы Network 5.0.0.3 (Bandelt et al., 1999). В программе DNASP v. 5 (Librado, Rozas, 2009) для отдельных популяций *G. fasciatus* были проведены тесты на нейтральность эволюции: тест Таджimy (Tajima, 1989), тест F_s (Fu, 1997), чтобы различить эволюционные сценарии проводили тесты R_2 (Ramos-Onsins and Rozas, 2002) и H (Fay and Wu, 2000).

Для анализа морфологических признаков моллюсков использовались метод главных компонент и кластерный анализ, для выявления влияния факторов среды – критерий Фишера. Взаимосвязь между величинами оценивалась с помощью корреляционного анализа по методу Спирмена и Мантел-теста. Нормальность распределения

выборки оценивались с помощью тестов Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Неравенство медианных значений выборок тестировалось по методу Уилкоксона. Отличия дисперсии выборок также оценивались с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Статистическая обработка данных проводилась в среде программирования R с помощью пакетов «ape», «pegas», «vegan» (Okasen, 2010; Paradis et al., 2004, 2010). Поиск высокоповторенных последовательностей в библиотеках ридов геномов гастропод, предоставленных Т.Е. Перетолчиной, и сопоставление их с фрагментами интронов проводился с помощью набора программ RepeatExplorer (Novák et al., 2013).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетические исследования амфипод надсем. Gammaroidea

Одни из наиболее древних обитателей Байкала – амфиподы надсем. Gammaroidea. Байкальские бокоплавы полифилетичны, поскольку предки разных семейств проникли в озеро в разное время (Macdonald et al., 2005). При этом отдельные семейства зачастую формируют «букеты» близкородственных видов, что позволяет наблюдать разные степени генетического родства.

Получены нуклеотидные последовательности интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы длиной от 296 до 311 п.н. четырнадцати видов амфипод, принадлежащих четырем семействам, последовательности фрагментов митохондриальных генов соответствующих видов были взяты из GenBank.

Полиморфизм интронного маркера сопоставим с полиморфизмом первых двух позиций кодона фрагмента гена CO1 и почти вдвое ниже, по сравнению с вариабельностью фрагмента гена 16S рРНК. Межвидовые генетические дистанции между нуклеотидными последовательностями интрона и CO1 коррелируют ($r = 0.76$, $p < 0.001$). Наиболее правдоподобные филограммы, построенные по последовательностям интронного и фолмеровского фрагментов для аналогичных наборов таксонов Acanthogammaridae, Eulimnogammaridae и Pallaseidae, несколько отличаются (рисунок 1).

Оба дерева имеют низкие бутстреп-поддержки в узлах близкородственных видов. Дерево, полученное на основании

интронных последовательностей, в большей степени соответствует принятой таксономии байкальских амфипод.

Последовательности интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы представителей семейств Acanthogammaridae, Eulimnogammaridae и Pallaseidae содержат большое количество замен (18.2 %), при этом практически отсутствует сходство с интронами представителей сем. Micrurpodidae (*Gmelinoides fasciatus* и *Linevichella vortex*), что согласуется с «древним» расхождением этих групп.

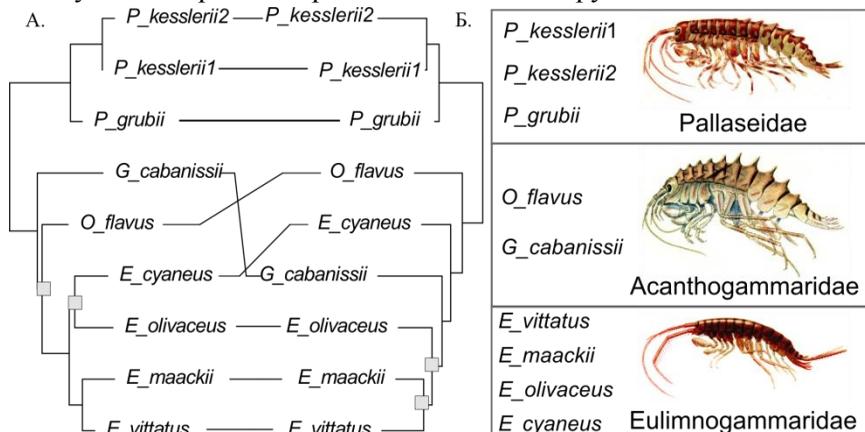


Рисунок 1. Филограммы амфипод, построенные по последовательностям интронного фрагмента (А) и фрагмента гена CO1 (Б). Серым отмечены узлы с вероятностями менее 0.75. Иллюстрации В. Ч. Дорогостайского.

Генетическая структура амфипод *Gmelinoides fasciatus* в Байкале

Чтобы оценить пригодность интронного маркера для выявления внутривидовой генетической структуры был выбран вид байкальских амфипод *Gmelinoides fasciatus*, внутривидовая изменчивость которого уже была изучена с помощью митохондриального маркера (Гоманенко и др., 2005). Населяя небольшие глубины, этот вид формирует своеобразный «ленточный ареал» по периметру озера.

В ходе исследования получены 154 нуклеотидные последовательности интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы *G. fasciatus* длиной 304 п.н. и две последовательности *Linevichella vortex*, а также 6 последовательностей CO1, 99 последовательностей CO1 взяты из GenBank.

Полиморфизм интронного маркера приблизительно вдвое ниже средней вариабельности митохондриального маркера. Генетические дистанции между уникальными аллелями интрона варьируют от 0.33 до 5.59%. Отмечен высокий уровень гетерозиготности по интронному фрагменту – 71.4% из всех исследованных организмов.

Ранее было показано, что митохондриальные гаплотипы принадлежат четырем кластерам: северному, юго-западному, юго-восточному и центральному, два последних генетически наиболее близки и смешиваются вдоль восточного берега Центральной котловины. На медианной сети гаплотипы интрона формируют только 3 клады, отличающиеся, по меньшей мере, шестью нуклеотидными заменами (Рисунок 2).

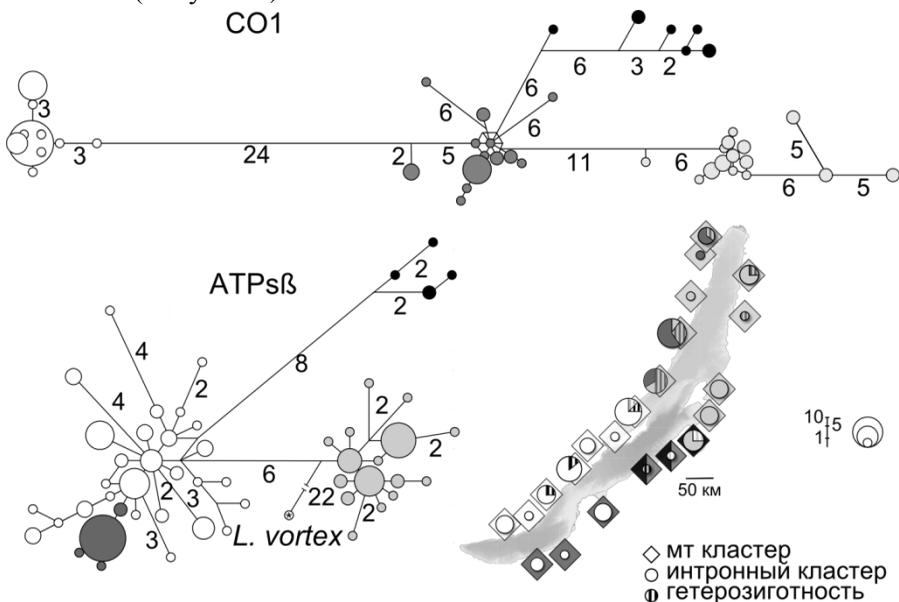


Рисунок 2. Медианнные сети, построенные на основании нуклеотидных последовательностей митохондриального (CO1) и интронного (ATPsβ) маркеров, и карта-схема точек сбора и частот аллелей *G. fasciatus* в Байкале. Цифрами отмечено количество несовпадающих нуклеотидов между гаплотипами.

Пространственно-генетические структуры *G. fasciatus* в Байкале, полученные при анализе последовательностей фрагментов митохондриального и ядерного геномов, демонстрируют значительное

сходство. При этом изоляция, обусловленная расстоянием, не оказывает существенного влияния на формирование наблюдаемого полиморфизма (значение Мантел-теста: $r = 0.24$, $p > 0.05$). Выявлено действие естественного отбора на оба генетических маркера в Юго-западной популяции (достоверно отрицательные значения тестов Таджимы, Фу, а также H-теста Фэя и Ву).

Интрон гена β -субъединицы АТФ-синтазы информативен для изучения внутривидового разнообразия *G. fasciatus*. Распределение аллелей разных клад интронного маркера позволяет выделить две крупные географические области, границы которых представляют гибридные зоны: вдоль западного берега в районе северной оконечности Малого моря и вдоль восточного берега Центральной котловины озера. Расположение межпопуляционных границ, выявленных по обоим маркерам, отчасти сходно с двумя зоогеографическими провинциями Байкала, предложенными М. М. Кожовым.

Филогенетическое исследование моллюсков подсем. Baicaliinae

Интрон гена β -субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. Baicaliinae. Структура диспергированного повтора

Одни из ярчайших представителей байкальской эндемичной фауны – моллюски подсем. Baicaliinae. Несмотря на то, что эволюционный возраст этой группы исчисляется несколькими миллионами лет, моллюски этого подсемейства существенно различаются по своим морфологическим и экологическим признакам, что позволяет предполагать «взрывное видообразование» в соответствии с субстратными предпочтениями и стремительную морфологическую эволюцию данной группы.

Были определены последовательности интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы двенадцати видов байкалийн. В интроне обнаружена копия ретротранспозона, содержащего псевдоген тРНК в качестве промоторной части (рисунок 3). Консервативный домен транспозона сходен с доменом широко-распространенного у моллюсков семейства транспозонов MESC. В геномах трех видов байкалийн найдены кластеры контигов (по одному у каждого вида), сходные на 93-96% с последовательностью повтора из интрона. Доля

повторов этого типа в геномах байкалийн, по предварительным оценкам, составляет от 0.46 до 0.68%.

Длина интрона варьирует от 474 до 777 п.н. у разных видов за счет протяженных делеций, значительно перекрывающих ретротранспозон. Интрон гена β -субъединицы АТФ-синтазы может использоваться как дополнительный маркер эволюции байкалийн, но при этом необходимо исследование его соответствия нейтральной модели эволюции.

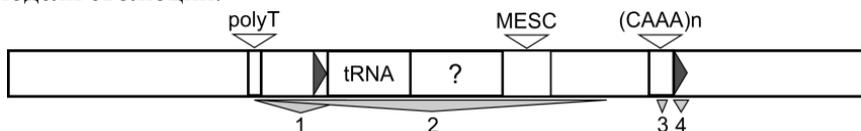


Рисунок 3. Структура ретротранспозона в составе интрона гена β -субъединицы АТФ-синтазы моллюсков. Делеции следующих видов показаны серыми треугольниками: 1 - *T. ciliata*; 2 – *L. steidae*, 3 – *K. semenkewitschi*, *M. herderiana*, *P. contabulata*, *T. duthiersii*; 4 – *T. duthiersii*. Предполагаемый полипиримидиновый тракт интрона (polyT), сигнал полиаденилирования транспозона (CAAA) и псевдоген тРНК (tRNA). Черные стрелки – 13-ти буквенный повтор, фланкирующий ретротранспозон.

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

Определены 86 нуклеотидных последовательностей интрона гена α -субъединицы АТФ-синтазы и 34 последовательности CO1 двадцати одного вида моллюсков подсем. Baicaliinae.

Отмечено неполное разделение предковых линий интронного фрагмента: у трех видов родов *Teratobaikalia* и *Pseudobaikalia* обнаружен общий аллель, занимающий «центральное» положение на медианной сети гаплотипов байкалийн. Наибольшее генетическое расстояние составляет около 3% замен. В случае внутривидовой вариабельности по интронному маркеру для каждого вида при построении деревьев выбирался гаплотип, имеющий наименьшие генетические дистанции ко всем остальным гаплотипам вида. Филогенетические древа, построенные по ядерному и митохондриальному маркерам, содержат базальные политомии. Сходство между деревьями невелико. Однако на обоих деревьях близкие группы видов (псаммофильные виды) объединяются кладами с высокими вероятностями (отмечены рамкой) (рисунок 4).

Наиболее контрастные противоречия генетических дистанций по двум маркерам отмечены у пары видов *Pseudobaikalia contabulata* - *P. jenterriana* и подвидов *K. semenkewitschi*. *P. jenterriana* генетически близок: по фолмеровскому фрагменту — с *P. contabulata*, по ядерным (интрону гена α -субъединицы АТФ-синтазы и ITS-1) — с *P. zachatkini*. Подвиды *K. semenkewitschi* совместно кластеризуются на митохондриальном древе, но на древе по интронному маркеру попадают в разные клады, что позволяет предполагать межвидовую интрогрессию у моллюсков подсем. Baicaliinae.

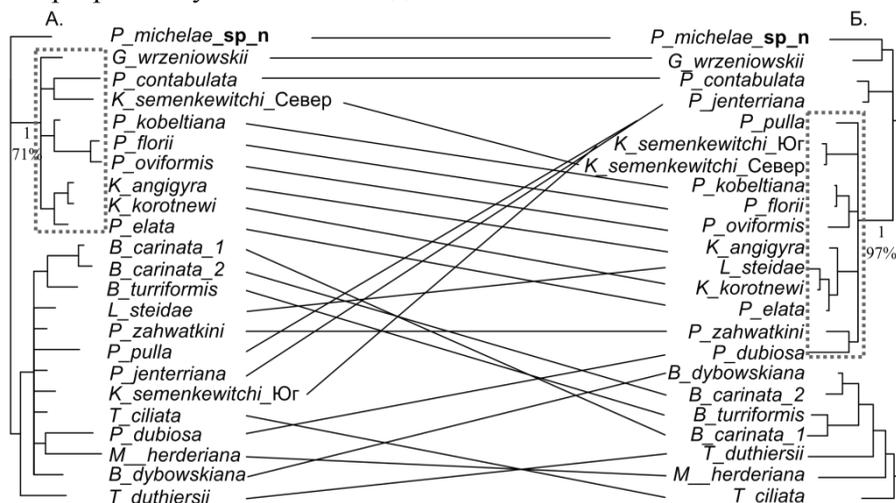


Рисунок 4. Филогенетические древа моллюсков подсем. Baicaliinae, построенные на основании нуклеотидных последовательностей «центральных аллелей» интрона гена α -субъединицы АТФ-синтазы (А) и фолмеровского фрагмента CO1 (Б). Узлы со значениями апостериорных вероятностей менее 0.5 схлопнуты в политомии.

Таксономический статус *P. michelae* sp. n.

Проведенный анализ генетических данных и морфологических признаков (форма и скульптура раковины и протоконха, строение радулы, строение половой системы) позволил описать нам новый вид гастропод *Pseudobaikalia michelae* sp. n. Sitnikova, Kovalenkova.

По размеру и скульптуре раковины *P. michelae* sp. n. более всего схож с *P. jenterriana*, обитающим только в Северной котловине Байкала, но отличается по цвету раковины и тела, а также по строению женской половой системы (Sitnikova et al., 2016).

Объединение генетических, морфологических и экологических признаков моллюсков подсем. Baicaliinae

Двадцать два морфологических и экологических признака, нуклеотидные последовательности CO1 и интрона гена α -субъединицы АТФ-синтазы, а также бинарная информация об инделах интрона были объединены для построения филогенетического дерева девятнадцати видов байкалийн. *P. jenterriana* и аллели интрона, характерные для южных популяций *K. semenkewitschi*, не использовались, поскольку противоречия, существующие между разными генетическими маркерами, могут быть следствием межвидовой гибридизации. В результате объединения всех данных получено дихотомическое дерево (рисунок 5).

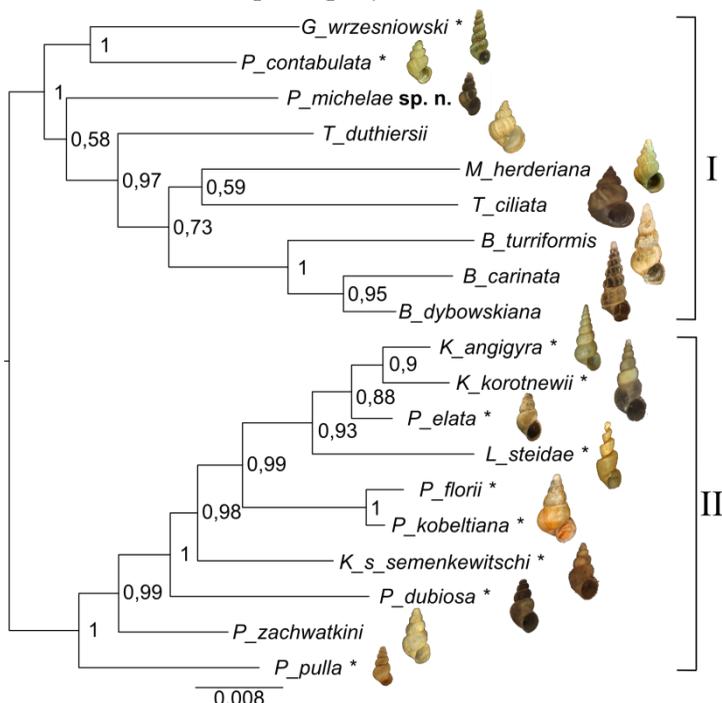


Рисунок 5. Байесовское дерево девятнадцати видов байкалийн, построенное на основании объединения морфологических и генетических признаков. Звездочкой отмечены псаммофильные виды.

Девятнадцать видов делятся на две группы. В первую группу входят преимущественно литофильные или мигрирующие на камни в

период размножения виды, при этом все, кроме *P. michelae* sp. n. и *B. carinata*, имеют выраженную скульптуру. Во вторую группу входят виды, которые внешне сходны и обитают на мягких грунтах (пески, илы), кроме *P. zachvatkini*, обитающего на смешанных грунтах. В отличие от деревьев, полученных с использованием отдельных маркеров, псаммофильная клада полностью разрешена.

Филогеография *Korotnewia semenkewitschi* в Байкале

Два подвида гастропод *K. semenkewitschi* имеют географическую структуру, которая согласуется с делением на зоогеографические провинции, предложенным М. М. Кожовым: *K. s. semenkewitschi* обитает в северной части озера, *K. s. nitida* – в южной.

Проведен морфометрический анализ тридцати шести особей *K. semenkewitschi* из литоральной зоны озера по тринадцати линейным характеристикам телеоконха. Моллюски, сгруппированные по зоогеографической провинции, достоверно отличаются по количеству оборотов и высоте завитка. Однофакторный дисперсионный анализ показал, что наибольшее влияние на количество оборотов оказывает принадлежность к зоогеографической провинции, хотя минимальная глубина обитания также имеет достоверное влияние.

Пять гаплотипов интрона, обнаруженные у двадцати девяти особей, по-разному располагаются на филогенетическом древе байкалиин. Гаплотипы, преобладающие вдоль западного побережья и в Южной котловине, очень сходны с аллелем, занимающим центральное положение на древе байкалиин, а положение гаплотипов, вероятно, принадлежащих *K. s. semenkewitschi*, в большей степени согласуется с положением этого вида на митохондриальном древе (рисунок 6). Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена CO1 и ITS-1 не позволил выявить географических паттернов у 10 представителей *K. semenkewitschi* из разных географических районов (дистанции по митохондриальному маркеру составляют менее 0.2% замен), в то время как генетические дистанции между аллелями интронного маркера сопоставимы с межвидовыми (1.9% замен).

Наличие гетерозиготных по последовательностям интрона особей свидетельствует об отсутствии репродуктивного барьера между разными формами *K. semenkewitschi*. Мозаичность распределения

аллелей разных клад в Южной котловине озера может быть следствием генетического дрейфа в локальных популяциях, поскольку моллюски малоподвижны и имеют «пятнистое» распределение в озере.

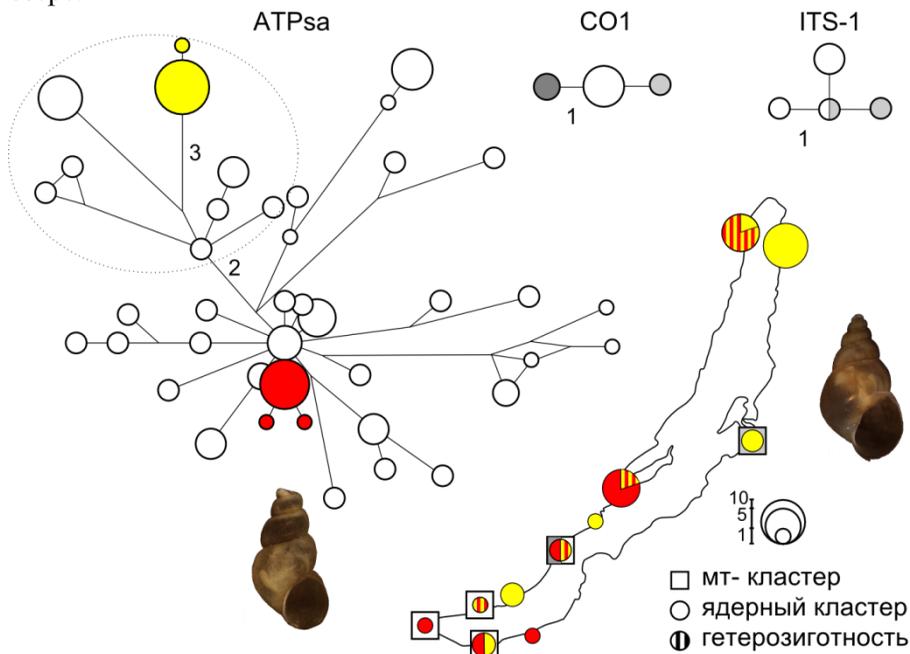


Рисунок 6. Внутривидовая изменчивость *K. semenkewitschi* по интронному, митохондриальному и межгенному маркерам.

Филогенетическое исследование полихет рода *Manayunkia*

Байкальские полихеты рода *Manayunkia* по многим экологическим характеристикам сходны с моллюсками подсем. Baicaliinae, по генетическим данным вселились в Байкал несколько раньше (Пудовкина и др., 2015), но менее разнообразны морфологически и насчитывают только три вида.

Определены нуклеотидные последовательности интрона гена α -субъединицы АТФ-синтазы двадцати восьми особей, принадлежащих трем видам байкальских полихет рода *Manayunkia*, двух полихет из озера Баунт (Бурятия), и двух – из озера Глухое в бассейне р. Колымы.

Сходство последовательностей интрона сибирских и дальневосточных полихет невелико и ограничивается регионами

вблизи границ экзонов. Медианные значения внутри- и межвидовых генетических дистанций полихет отличаются лишь незначительно: $3.16 \pm 1.90\%$ и $4.02 \pm 1.74\%$.

Топологии филогенетических деревьев, полученных по интронному и митохондриальному маркерам, существенно различаются. На древе по митохондриальному маркеру (CO1) все представители *M. baicalensis* и *M. godlewskii* формируют отдельные хорошо поддержанные клады. Интронные последовательности на филогенетическом древе формируют две группы: в первую входят *M. godlewskii* и *M. zenkewitschii*, а также полихеты из оз. Баунт; во вторую – представители всех трех байкальских видов. Анализ молекулярной дисперсии AMOVA для особей, разделенных в соответствии с митохондриальными кладами, показал, что большая часть генетической изменчивости по последовательностям интрона (90.5%) приходится на внутривидовую вариацию.

При отсутствии зависимости генетических дистанций между последовательностями интрона от видовой принадлежности организмов, наиболее вероятной является гипотеза о сохранении исходного полиморфизма вследствие большей эффективной численности вида, оцененной по ядерным генам диплоидного организма, по сравнению с «гаплоидными» митохондриальными маркерами.

Заключение

Быстро эволюционирующие ядерные маркеры оказались достаточно информативны как при исследовании молодых групп видов, так и на внутривидовом уровне (для амфипод *G. fasciatus* и моллюсков *K. semenkewitschi*). Отдельный интерес представляет сравнение результатов анализа ядерных и митохондриальных фрагментов, позволяющее выявлять случаи межвидовой интрогрессии.

Разрешающая способность филогенетического анализа на основании интронных маркеров зависит от возраста и эволюционной истории анализируемых групп: для относительно древних байкальских амфипод надсем. Gammaoidea результаты анализа последовательностей фрагментов мтДНК и интрона гена β -

субъединицы АТФ-синтазы сходны. У более молодых групп – полихет рода *Manayunkia* и ряда моллюсков подсем. Baicaliinae выявлено сохранение предкового полиморфизма в интроне гена α -субъединицы АТФ-синтазы. В то же время выявлены несоответствия между генетическими дистанциями, оцененными по последовательностям митохондриального (CO1), межгенного (ITS-1) и интронного маркеров, которые могут свидетельствовать о вторичных нарушениях репродуктивного барьера у байкальских моллюсков рода *Pseudobaikalia* и подвидов *K. semenkewitschi*.

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. Gammaoidea и моллюсков подсем. Baicaliinae.
2. Сравнение эволюционного дерева манаюнокий, 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.
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 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

Статьи:

1. **Коваленкова М. В.**, Ситникова Т. Я., Щербаков Д. Ю. Генетическая и морфологическая диверсификация гастропод семейства Baicaliidae //Экологическая генетика. – 2013. – Т. 11. № 4. – С.3-11.
2. Sitnikova T., **Kovalenkova M.**, Peretolchina T., Sherbakov D. A new, genetically divergent species of *Pseudobaikalia* Lindholm, 1909 (Caenogastropoda, Baicaliidae) //ZooKeys. – 2016. № 593. – P. 1-14.
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.

Прочие публикации:

1. **Коваленкова М.В.**, Пудовкина Т.А., Ситникова Т.Я., Щербаков Д.Ю. Несоответствие филогенетических сигналов ядерного и митохондриального молекулярных маркеров для полихет р. *Manayunkia* //Актуальные проблемы науки Прибайкалья. – Вып. 1. 2015. – С. 144-148.
2. Актуальные проблемы современной генетики: биоинформационные методы анализа биоразнообразия: Учебное пособие / Д. Ю. Щербаков, Р.В. Адельшин, **М.В. Коваленкова.** – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2018. – 119 с.