

На правах рукописи

ЯХНЕНКО АЛЁНА СЕРГЕЕВНА

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВНУТРИВИДОВОЙ И МЕЖВИДОВОЙ
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГУБОК БАЙКАЛА
(PORIFERA: SPONGILLIDA)**

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ИРКУТСК – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН)

Научный

руководитель:

ИЦКОВИЧ Валерия Борисовна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Официальные

оппоненты:

АЛЁШИН Владимир Вениаминович

доктор биологических наук, заведующий отделом эволюционной биохимии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

МЮГЕ Николай Сергеевич

кандидат биологических наук, начальник отдела молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» г. Москва

Ведущая

организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д 002.214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3. Тел: (499) 135-62-13, факс: (499) 132-89-62, e-mail: dissovet@vigg.ru. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

И.И. Горячева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Озеро Байкал является уникальным древним рифтовым водоемом, содержащим 20% мировых запасов пресной воды (Кожов, 1962; Jaguś et al., 2015). История озера насчитывает более 25 млн лет, в течение которых сформировались уникальные условия, способствовавшие возникновению огромного количества эндемичных видов и семейств (Тимошкин, 2011). Среди обитателей Байкала губки составляют до 44% биомассы бентоса каменистой литорали (Pile et al., 1997a). Преобладающая их часть – представители эндемичного семейства *Lubomirskiidae*, сформировавшегося 3,4 млн лет назад, насчитывающего 4 рода и 15 видов (Ефремова, 2004; Itskovich et al., 2006, 2008, 2015; Meixner et al., 2007; Maikova et al., 2015; Manconi, Pronzato, 2019; Schuster et al., 2018; Bukshuk, Maikova, 2020). На мелководье также встречаются представители четырех видов космополитного семейства *Spongillidae* (Ефремова, 2004). Губки ведут сидячий образ жизни. Они являются основным источником биоактивных веществ, выделяемых гидробионтами (Varijakzhan et al., 2021; Martignago et al., 2023). По типу питания эти животные относятся к фильтраторам, что способствует накоплению в их организме загрязняющих веществ (Kulikova et al., 2013). Благодаря этим особенностям, губки одними из первых реагируют на изменения в окружающей среде и служат чувствительными биоиндикаторами состояния водных экосистем (Hansen, et al., 1995; Perez et al., 2003; Manconi, Pronzato, 2008; Barros de et al., 2013; Itskovich et al., 2019; Girard et al., 2021; Yakhnenko et al., 2022).

В последние годы экосистема озера Байкал находится под повышенным антропогенным воздействием и реагирует на глобальное потепление (Hampton et al., 2008; Maikova et al., 2021). С 2011 года наблюдаются массовые цветения цианобактерий, повсеместное развитие нитчатых водорослей, заболевания и гибель эндемичных губок (Kravtsova et al., 2014; Timoshkin et al., 2016; Khanaev et al., 2018; Roberts et al., 2018; Maikova et al., 2021). В связи с этим необходимо продолжение регулярного мониторинга состояния экосистемы озера как классическими методами (Khanaev et al., 2018, Maikova et al., 2021, Yakhnenko et al., 2022), так и с использованием молекулярно-генетических методов.

Исследование генетического разнообразия эндемичных байкальских губок является фундаментально важным для оценки их состояния, особенно в условиях массовой гибели, наблюдаемой в озере Байкал (Калюжная, Ицкович, 2015; Belikov et al., 2019; Деникина и др., 2016; Itskovich et al., 2018; Khanaev et al., 2018; Kulakova et al., 2018; Механикова и др., 2023). Для лучшего понимания демографической истории байкальских губок, а также их внутри- и межвидовых взаимоотношений, перспективным является использование молекулярно-генетических маркеров, как было показано на морских и пресноводных космополитных видах губок (Duran et al., 2004; Calderón et al., 2007; Blanquer et al., 2009; Blanquer, Uriz, 2010; Dailianis et al., 2011; Lucentini et al., 2013; Li et al., 2018; Riesgo et al., 2019a).

Изучение обитающих в Байкале семейств Lubomirskiidae и Spongillidae на молекулярно-генетическом уровне активно ведется в последние годы. К настоящему времени секвенирован геном и транскриптом *Lubomirskia baikalensis* (Pallas, 1771), транскриптом *Lubomirskia abietina* (Swartschewski, 1902), *Baikalospongia bacillifera* (Dybowski, 1880) (Kenny et al., 2019) и *Swartschewskia papyracea* (Dybowski, 1880) (Kenny, Itskovich, 2021), а также геном и транскриптом *Ephydatia muelleri* (Lieberkühn, 1856) (Kenny et al., 2020), проанализирована разрешающая способность ряда молекулярно-генетических маркеров (Itskovich et al., 2006, 2013, 2015; Masuda, 2009; Kenny et al., 2019, 2020). Несмотря на большие успехи в этой области, неохваченными остаются вопросы, касающиеся популяционной структуры Lubomirskiidae и Spongillidae, а также подбора молекулярно-генетических маркеров, пригодных для изучения внутри и межвидовых взаимоотношений семейства Lubomirskiidae.

Степень разработанности темы. Популяционно-генетическая структура байкальских эндемичных губок до настоящего времени оставалась совершенно неисследованной, а для космополитных пресноводных губок опубликованы всего две работы (Lucentini et al., 2013; Li et al., 2018) и набор микросателлитных маркеров для одного вида (Anderson et al., 2010). В ходе работы были успешно разработаны наборы микросателлитных маркеров для одного вида из сем. Spongillidae и пяти видов сем. Lubomirskiidae. Проведены исследования популяционной структуры *L. baikalensis* и *E. muelleri*, а также изучены межвидовые взаимоотношения между представителями всех родов Lubomirskiidae. Полученный объем данных составляет более 50% имеющихся на данный момент в области популяционной генетики пресноводных губок.

Цель и задачи исследования. Цель работы – с помощью митохондриальных и ядерных молекулярно-генетических маркеров проанализировать внутри- и межвидовые взаимоотношения представителей двух семейств губок – байкальского эндемичного Lubomirskiidae и космополитного Spongillidae.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить перспективность использования митохондриальных молекулярно-генетических маркеров для изучения внутри- и межвидовых взаимоотношений байкальских губок семейств Lubomirskiidae и Spongillidae.
2. Разработать наборы видоспецифичных и универсальных ядерных микросателлитных маркеров для представителей семейств Lubomirskiidae и Spongillidae.
3. Оценить возможность выявления межвидовой генетической подразделенности представителей семейства Lubomirskiidae с помощью микросателлитных маркеров.
4. Изучить популяционно-генетическую структуру Lubomirskiidae и Spongillidae на примере видов *L. baikalensis* и *E. muelleri* с помощью разработанных микросателлитных маркеров.

Научная новизна. Впервые с помощью разработанных микросателлитных маркеров изучена популяционно-генетическая структура байкальских эндемичных губок на примере *L. baikalensis*. Установлено наличие четкой пространственно-генетической подразделенности. Выявлено разделение вида на три генетических кластера, соответствующих котловинам обитания в озере Байкал. Проведена реконструкция изменения эффективной численности, показан резкий рост численности в недавнем прошлом. Согласно полученным данным, все 8 популяций находятся в равновесии Харди-Вайнберга и не имеют признаков прохождения через бутылочное горлышко, что свидетельствует о достаточном количестве особей в популяциях в контексте событий массовой гибели и заболеваний, отмеченных в последнее десятилетие. Изучена популяционно-генетическая структура представителя космополитных пресноводных губок *E. muelleri*. Показано наличие пространственно-генетической подразделенности популяций, несмотря на небольшое географическое расстояние и наличие бесполого размножения. Разработан набор микросателлитных маркеров, позволивший подтвердить генетическую дифференциацию между представителями разных родов байкальских эндемичных губок.

Теоретическое и практическое значение работы. Данные о популяционно-генетической структуре эндемичных губок оз. Байкал имеют большое значение, поскольку показатели генетического разнообразия отображают современное состояние их популяций. Показано, что разработанный набор универсальных микросателлитных маркеров обладает достаточной разрешающей способностью для генетической дифференциации родов *Lubomirskiidae*, что особенно актуально в связи с высокой морфологической пластичностью семейства в контексте использования губок в качестве биоиндикаторов состояния экосистемы озера. Полученные данные станут основой для последующих мониторинговых исследований, включающих в себя анализ динамики популяционной структуры губок. Кроме этого, наборы микросателлитных маркеров послужат фундаментом для дальнейшего изучения популяционной структуры других видов эндемичных байкальских губок.

Методология и методы диссертационного исследования. Для исследований внутри- и межвидовых взаимоотношений пресноводных губок были выбраны два участка маркерного гена *COI* (5' концевой и *I3-M11*), а также микросателлитные маркеры. Для разработки видоспецифичных и кросс-видовых микросателлитных маркеров анализировали геномные и транскриптомные данные байкальских и космополитных губок с помощью SSRome, The Galaxy platform, BLAST+ и Primer BLAST NCBI. Для проведения исследования применяли следующие методы: выделение ДНК, ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, гель-электрофорез, фрагментный анализ ДНК. Дальнейший анализ полученных данных проводили с помощью следующих программ: GenMarker 3.01, BioEdit 7.0, Mega 5, MAFFT, Arlequin 3.5.2.2,

Microchecker 2.2.3, Iqtree 1.6.12, Genepop 4.7.5., Arlequin 3.5.2.2, GenAlex 6.5, Structure 2.3.4, языка программирования R, BOTTLENECK 1.2.0.2.

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена в лаборатории аналитической биоорганической химии ЛИН СО РАН. Автор принимал активное участие в экспедиционных работах по сбору материала, самостоятельно осуществлял постановку методик, проведение экспериментальных работ, обработку и анализ данных, обобщение результатов и написание научных статей.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее эффективным для разработки наборов как видоспецифичных микросателлитных маркеров, так и общих для близкородственных видов, является подход, включающий поиск универсальных последовательностей, содержащих фланкирующие районы и тандемный повтор как в геномах видов из списка изучаемых близкородственных, так и в геноме ближайшего общего родственного вида для исследуемой группы.
2. Для семейства Lubomirskiidae выявлено наличие внутри- и межвидовой генетической подразделенности с помощью набора разработанных микросателлитных маркеров. Внутривидовая подразделенность Lubomirskiidae соответствует модели изоляции расстоянием. Расселение губок происходит вдоль изобаты глубин обитания.
3. В настоящий момент эффективная численность байкальских эндемичных губок достигает наиболее высокого уровня за последние несколько десятков поколений. Это свидетельствует о том, что, губки не находятся под угрозой исчезновения в связи с событиями их массовых заболеваний и гибели.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов подтверждается применением современных высокоточных молекулярно-генетических методов, воспроизводимостью полученных данных, высокими уровнями значимости статистических тестов, а также публикацией результатов в рецензируемых научных журналах с высоким рейтингом. Результаты исследований, на которых основаны выводы, в полном объеме изложены в тексте диссертации и приложениях.

Апробация результатов работы. Результаты работы представлены на симпозиумах и конференциях: Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (22-25 октября 2019, Новосибирск), BGRS/SB-2020: 12th International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» (06-10 июля 2020, Новосибирск), «Science Present and Future: Research Landscape in the 21st century» (29 мая 2020, Иркутск), VII Международная Верещагинская Байкальская Конференция (07-13 сентября 2020, Иркутск), 1st International Electronic Conference on Biological Diversity, Ecology and Evolution (15-31 марта 2021, online), FEBS Congress 2021 (3-8 июля 2021, Словения, Любляна), Международная научная конференция, посвящённая 150-летию

Севастопольской биологической станции — Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий» (13-18 сентября 2021, Севастополь), 13th International Multiconference on «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» – BGRS/SB-2022 (04–08 июля 2022, Новосибирск), MAPEEG-2022 International Symposium (8-12 сентября 2022, Владивосток). Результаты работ были использованы при выполнении проектов фонда РФФИ (№№ 17-04-01598, 17-44-388103 и 20-44-383010).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 16 работ, в том числе 3 статьи в журналах из списка ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 125 страницах, содержит 20 таблиц и 18 рисунков, а также пять приложений. Материалы работы представлены в виде глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», а также «Заключения», «Выводов», «Списка литературы» и Приложений. Список литературы содержит 185 источников, из них 162 на иностранном языке.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю к.б.н. Ицкович В.Б. за помощь и поддержку в работе, консультации и передачу опыта в проведении молекулярно-генетических исследований, к.б.н. Букину Ю.С., к.б.н. Перетолчиной Т.Е. и к.б.н. Бондарь Е.И. за всестороннюю поддержку и помощь в анализе и интерпретации данных, к.б.н. Кричильчику С.В. и к.б.н. Кондратову И.Г. за консультации при разработке микросателлитных маркеров, к.б.н. Майковой О.О. и к.б.н. Бутиной Т.В. за помощь в отборе образцов, консультации и всестороннюю поддержку, к.б.н. Дзюба Е.В. за консультации и всестороннюю помощь, д.б.н. Беликову С.И. за предоставление научно-технического оборудования лаборатории для проведения исследования, Ханаеву И.В., к.б.н. Небесных И.А., Ющуку Ю.А. и командам НИС «Г. Титов» и НИС «Академик Коптюг» за неоценимую помощь в отборе образцов эндемичных губок, к.т.н. Яхненко М.С., Васильеву В.В., к.г.-м.н. Аржанникову С.Г., д.г.-м.н. Аржанниковой А.В., Косареву П.А. Деревцовой К.А. Даниловой К.Б., Казакову Д.И. за помощь в организации экспедиций и отборе образцов космополитных губок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы описаны особенности и современное состояние экосистемы озера Байкал, рассмотрены особенности биологии и экологии байкальской спонгиофауны. Особое внимание уделено изучению внутри- и межвидовых взаимоотношений губок с помощью молекулярно-генетических маркеров, в особенности микросателлитных.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор образцов. Для определения разрешающей способности двух участков маркерного гена *COI* использовали коллекционные образцы байкальских эндемичных и космополитных губок, собранные в 2013-2017 гг. в 5 регионах России – Санкт-Петербурге, Псковской области, Московской области, о. Сахалин, Якутии ($n=7$, *Spongilla lacustris*), озере Байкал ($n=54$, *Lubomirskiidae*), Сербии ($n=1$, *S. lacustris*), Японии ($n=1$, *Spongilla alba*), Турции ($n=2$, *S. alba*) и Абхазии ($n=1$, *Ephydatia fluviatilis*), всего было получено 66 последовательностей двух участков гена *COI* мтДНК. Для популяционно-генетического анализа с использованием микросателлитных локусов яДНК с помощью легкого водолазного снаряжения в 2018-2021 гг. были собраны образцы *L. baikalensis* из 8 районов озера Байкал ($n=251$) и образцы *E. muelleri* из 2 районов ($n=41$) (рис. 1).

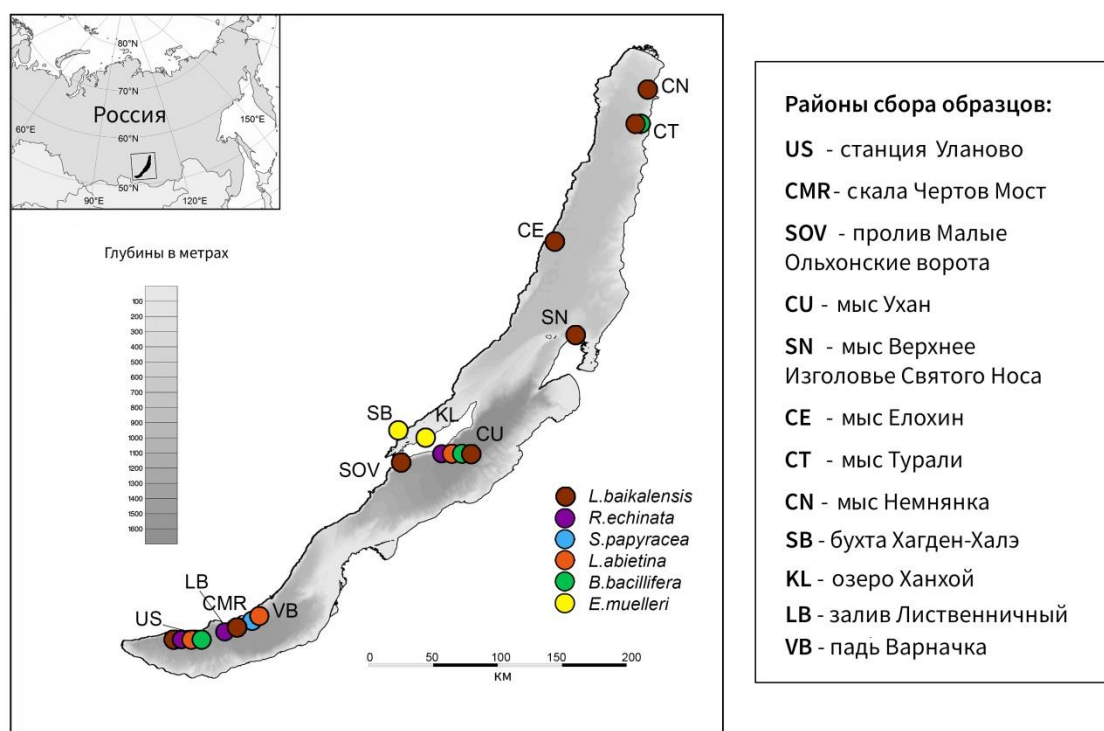


Рисунок 1. Карта-схема расположения районов отбора образцов в оз. Байкал, основанная на карте проекта INTAS 99-I 669. Далее по тексту используются сокращения названий районов, приведенные на рисунке.

Для изучения межвидовых взаимоотношений губок из разных районов оз. Байкал были собраны образцы 4 видов *Lubomirskiidae* – *Baikalospongia bacillifera* ($n=5$), *Lubomirskia abietina* ($n=5$), *Rezinkovia echinata* ($n=5$), *Swartschewska papyracea* ($n=5$) (рис. 1). Все образцы были успешно генотипированы.

2.2 Выделение ДНК. Выделение ДНК осуществляли из небольших фрагментов ткани губки, объемом около 100 мкл, зафиксированной в 70% этаноле с помощью СТАВ метода (Gustincich et al., 1991), а также с помощью

набора АмплиПрайм РИБОсорб (ИнтерЛабСервис) после предварительной отмывки от этанола дистиллированной водой.

2.3 Амплификация и генотипирование. ПЦР амплификацию гена *COI* осуществляли с праймерами LCO1490 и HC02198, описанными ранее (Folmer et al., 1994) для 5'-концевого фрагмента и праймерами CO1F4 и CO1R4 для фрагмента *I3-M11* (Raleigh et al., 2007). Продукты реакции анализировали посредством горизонтального гель-электрофореза. Секвенирование и фрагментный анализ проводили на секвенаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Генотипирование по результатам фрагментного анализа осуществляли в программе GenMarker 3.01 (Hulce et al., 2011). Для фрагментов гена *COI* данные секвенирования обрабатывали в программах BioEdit 7.0 (Hall, 1999) и Mega 5.0 (Tamura et al., 2011).

2.4 Разработка микросателлитных маркеров. Поиск микросателлитных локусов в геноме *L. baikalensis* (Kenny et al., 2019) проводили с помощью сервисов SSRome (Mokhtar, Atia, 2019) и The Galaxy platform (Afgan et al., 2018). Выравнивание фланкирующих районов на геном *E. muelleri* (Kenny et al., 2020) осуществляли в программе BLASTn из программного пакета BLAST+ (Camacho et al., 2009). Праймеры для микросателлитных локусов подбирали с помощью сервиса Primer BLAST NCBI (Ye et al., 2012). Прямые праймеры снабжали флуоресцентной меткой (FAM, ROX, R6G, TAMRA).

Позицию каждого локуса анализировали в геномном браузере (Kenny et al., 2020). Поиск микросателлитных последовательностей и фланкирующих районов в транскриптомах *L. baikalensis*, *L. abietina*, *S. papyracea*, *B. bacillifera*, опубликованных ранее (Kenny et al., 2019; Kenny, Itskovich, 2021), осуществляли в программе BLASTn из программного пакета BLAST+ (Camacho et al., 2009). Выравненные последовательности извлекали из генома с помощью скрипта на языке программирования R. Выравнивание и анализ извлеченных последовательностей проводили в программах BioEdit v7.0,9 (Hall, 1999) и MAFFT online 7 (Kato et al., 2018).

2.5 Анализ данных.

2.5.1 Анализ данных секвенирования. Выравненные на референсный ген *COI* *B. intermedia* KU324767.1 последовательности объединили. Последовательности загрузили в базу данных GenBank NCBI под номерами MN985248-MN985294, MN990736-MN990743, PQ218765-PQ218776. На основе полученного фрагмента построили филогенетическое древо методом максимального правдоподобия в программе IQ-TREE 1.6.12 (Minh et al., 2020) с применением наиболее подходящей модели НКУ+I. Уровень поддержки узлов древа определяли с помощью 1000 бутстреп реплик и aLRT коэффициента, рассчитанных в программе IQ-TREE. Эволюционную модель определяли алгоритмом «model finder» в программе IQ-TREE на основе значений BIC (Kalyaanamoorthy et al., 2017).

2.5.2 Анализ геномных и транскриптомных данных. Опубликованные ранее сборки геномов и транскриптомов пресноводных губок (Kenny et al., 2019, 2020; Kenny, Itskovich, 2021) анализировали помощью стандартных средств на языке программирования R и программ BLASTn (Camacho et al., 2009), BioEdit v7.0,9 (Hall, 1999) и MAFFT online 7 (Kato et al., 2018).

2.5.3 Анализ микросателлитных данных. Наличие нуль-аллелей и ошибок генотипирования проверяли с помощью Microchecker 2.2.3 (Oosterhout Van et al., 2004). Анализ показателей разнообразия микросателлитных локусов осуществляли в программе GenAlex 6.5 (Peakall, Smouse, 2006), оценку достоверности отклонения от равновесия Харди-Вайнберга для каждого локуса – в web-версии программы Genepop 4.7.5 (Raymond, Rousset, 1995; Rousset, 2008) и Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier, Lischer, 2010). Анализ показателей разнообразия в популяциях и тесты на неравновесное сцепление проводили в программах GenAlex 6.5, Arlequin 3.5.2.2 и пакете Genepop 4.7 для языка программирования R. Популяционную структуру оценивали в программе Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). В программах Structure Selector (Li, Liu, 2018) и Structure Harvester (Earl, vonHoldt, 2012) вычисляли ΔK по методу Эванно (Evanno et al., 2005). Степень изоляции между точками отбора проб оценивали с помощью попарного F_{ST} (Slatkin, 1991). Расчеты выполняли в программе Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier, Lischer, 2010). Попарные значения миграционных потоков генов (M) (Slatkin, 1991, 1993) между исследуемыми группами организмов оценивали на основе рассчитанных значений F_{ST} по формуле $M=(1/ F_{ST} - 1)/4$. По алгоритму работы (Slatkin, 1993) проводили линейный регрессионный анализ для определения зависимости между логарифмом значения скорости миграции M и логарифмом географической дистанции. Таким образом оценивали применимость модели изоляции расстоянием как механизма формирования генетического разнообразия *L. baikalensis*. Регрессионный анализ выполняли методом наименьших квадратов стандартными средствами языка программирования R. Степень сходства между организмами визуализировали на основе попарных микросателлитных дистанций Бруво с использованием метрического многомерного шкалирования (MDS) (Bruvo et al., 2004). Расчеты дистанций Бруво выполняли с помощью пакета «Poppr» 2.9.3 (Kamvar et al., 2014) для языка программирования R. Дендрограммы на основе наборов микросателлитных данных строили методами UPGMA и NJ на основе генетических дистанций Бруво с использованием пакетов «phangorn» 2.11.1 (Schliep, 2011) и «Poppr» 2.9.3 (Kamvar et al., 2014). Достоверность группировки особей в выделяемых на дендрограммах кластерах оценивали методом AMOVA (Excoffier et al., 1992) в пакете «pegas» 1.2 (Paradis, 2010) для языка программирования R. Анализ главных координат выполняли в программе GenAlex 6.5 (Excoffier et al., 1992; Paradis, 2010; Schliep, 2011; Kamvar et al., 2014). Реконструкцию истории изменения эффективного размера популяций проводили с помощью метода generalized skyline plot (Strimmer, Pybus, 2001).

Тестирование гипотез прохождения численностей исследуемых групп особей через бутылочное горлышко и резких недавних изменений численности проводили в программе BOTTLENECK (Piry et al., 1999) и с помощью коэффициента G-W (Garza, Williamson, 2001) в программе Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier, Lischer, 2010).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Изучение внутри и межвидовых взаимоотношений Lubomirskiidae и Spongillidae с помощью двух участков гена COI. Получены последовательности двух участков гена *COI* – стандартного 5'-концевого участка (632 п.н.) и участка *I3-M11* (433 п.н.) для 66 образцов байкальских эндемичных и космополитных губок семейств Lubomirskiidae и Spongillidae (Yakhnenko, Itskovich, 2020a). На древе, построенном методом по объединенным последовательностям в отдельную кладу с высоким уровнем бутстреп и aLRT поддержки (>95%) группируются образцы, принадлежащие ко всем родам Lubomirskiidae и родам *Ephydatia* (Spongillidae). Полученная кластеризация согласуется с эволюционной историей возникновения Lubomirskiidae (его происхождение от общего с *E. muelleri* предка), показанной ранее с помощью различных молекулярно-генетических маркеров и транскриптомных данных (Meixner et al., 2007; Itskovich et al., 2008, 2022; Kenny, Itskovich, 2021). Таким образом, полученные данные подтверждают, что род *Ephydatia* является эволюционно ближайшим родственным таксоном для байкальских эндемичных губок. Несмотря на подтверждение эволюционной истории Lubomirskiidae с помощью объединенного фрагмента гена *COI*, его использование для видовой идентификации и популяционно-генетических исследований не корректно (Yakhnenko, Itskovich, 2020a). В свете полученных данных, наиболее перспективным для этих целей будет использование более переменчивых микросателлитных маркеров.

3.2 Разработка наборов универсальных и видоспецифичных микросателлитных маркеров для близкородственных видов губок. В геноме *L. baikalensis* (Kenny et al., 2019) выявлено 6900 совершенных микросателлитных локусов с длиной повтора от 2 до 5 п.н. и количеством повторов от 9 до 17, которые выравнивали вместе с фланкирующими участками на геном близкородственной *E. muelleri*. В дальнейший анализ были взяты 47 микросателлитных последовательностей, имеющих совпадения с геномом *E. muelleri*, 19 из которых имели частичные совпадения, и остальные 28 – длину выравнивания не менее 300 пар нуклеотидов. Для всех 47 локусов разработали пары праймеров, которые протестировали на пяти образцах *L. baikalensis* из разных районов Байкала.

По результатам лабораторных тестов, для случайно выбранных локусов, имевших лишь частичную гомологию в геноме *E. muelleri* во фланкирующих районах, только 10,5% локусов ($n=2$) оказались пригодными для использования в популяционно-генетическом анализе *L. baikalensis*, тогда как для микросателлитных локусов, найденных в обоих геномах – 28,5% ($n=8$), что в 2,7

раза выше. В результате был разработан набор из 10 видоспецифичных, вариабельных микросателлитных маркеров, имеющих динуклеотидные повторы, дающих стабильную амплификацию для популяционно-генетических исследований *L. baikalensis* (Yakhnenko et al., 2024a). Далее 28 микросателлитных локусов с фланкирующими районами, имевших длину выравнивания с участками генома *E. muelleri* более 300 пар нуклеотидов, были протестированы на 5 образцах ДНК *E. muelleri*. Из них 7 локусов, имевших ди- и тринуклеотидные повторы, оказались подходящими для популяционно-генетического анализа, который был проведен на 41 образце из двух районов озера Байкал (рис. 1). Учитывая высокий уровень присутствия клонов, было выявлено 24 уникальных гаплотипа.

Для определения уровня межвидовой специфичности микросателлитных локусов среди всех родов Lubomirskiidae, 28 микросателлитных локусов, найденных в геномах *E. muelleri* и *L. baikalensis*, были протестированы на 20 образцах ДНК (по пять каждого вида – *L. abietina*, *B. bacillifera*, *S. papyracea* и *R. echinata*). Были составлены наборы универсальных маркеров для всех четырех видов байкальских эндемичных губок и набор для сравнительного анализа представителей Lubomirskiidae и Spongillidae. Набор универсальных локусов для анализа межвидовых взаимоотношений Lubomirskiidae содержит 10 локусов, тогда как для анализа популяционной структуры каждого вида по отдельности наборы оказались несколько шире – 15 локусов для *R. echinata*, 14 для *S. papyracea*, 18 для *L. abietina* и 13 для *B. bacillifera*. Для *E. muelleri*, *R. echinata* и *L. abietina* 6 локусов оказались универсальными пригодными для изучения межвидовых взаимоотношений пресноводных губок на уровне семейств Lubomirskiidae и Spongillidae. Поиск 28 микросателлитных последовательностей вместе с фланкирующими районами в транскриптомах *L. baikalensis*, *L. abietina*, *B. bacillifera* и *S. papyracea* (Kenny et al., 2019; Kenny, Itskovich, 2021) показал присутствие фланкирующих участков для всех локусов. Однако, более чем в половине случаев отсутствовала микросателлитная последовательность между фланкирующими участками, в том числе и в транскрипте *L. baikalensis*. Выявленная особенность может быть связана с тем, что изучаемые локусы находятся в области интронов, вырезаемых при процессинге мРНК. Также выявлена практически полная идентичность фланкирующих районов для всех видов и локусов, что позволяет использовать разработанные универсальные праймеры для всех исследованных представителей Lubomirskiidae.

3.3 Изучение внутри- и межвидовых взаимоотношений Lubomirskiidae и Spongillidae с помощью микросателлитных маркеров.

3.3.1 Изучение межвидовых взаимоотношений Lubomirskiidae. Для *L. abietina*, *R. echinata*, *S. papyracea* и *B. bacillifera* (каждого вида по 5 экз.) получены данные микросателлитных генотипов по 10 локусам. По F_{ST} показаны значительные отличия между видами. Наибольшее значение F_{ST} (0,51) оказалось для пары видов *R. echinata* и *S. papyracea*. Наименьшие значения

были показаны для пар видов *R. echinata* и *L. abietina* (0,22) и *B. bacillifera* и *L. abietina* (0,11). В связи с малой выборкой ($n=5$) для каждого вида, полученные значения могут быть несколько завышены, как было отмечено на выборках для птиц, млекопитающих и беспозвоночных (Hale et al., 2012; Aguirre-Liguori et al., 2020), однако уровень точности пригоден для сравнения видов между собой. Все значения F_{ST} имели P-value $<0,05$.

Ранее было показано, что опубликованные филогенетические деревья на основе ядерных и митохондриальных последовательностей ДНК (Meixner et al., 2007; Itskovich, Belikov, 2007; Itskovich et al., 2008; Yakhnenko, Itskovich, 2020; Itskovich et al., 2022) не обладают разрешающей способностью, достаточной для разделения видов и родов Lubomirskiidae. Для полученных данных по 10 микросателлитным локусам для 20 образцов, принадлежащих к четырем видам байкальских эндемичных губок, были рассчитаны попарные генетические дистанции Бруво. На основе дистанций были построены дендрограммы методами UPGMA и NJ. На дендрограмме образцы всех четырех видов образуют отдельные кластеры (рис. 2). Достоверность разделения на кластеры определяли с помощью теста AMOVA, значения P-value были $<0,05$ для всех узлов, указанных на рисунке 2, что говорит о достоверности группировки образцов по видам. На рисунке 2 приведена дендрограмма, построенная методом UPGMA. Дендрограмма, построенная методом NJ, имела аналогичную группировку образцов и значения P-value AMOVA и поэтому не приводится. Распределение по кластерам в соответствии с морфологически определенной видовой принадлежностью отмечено для 19 из 20 образцов.

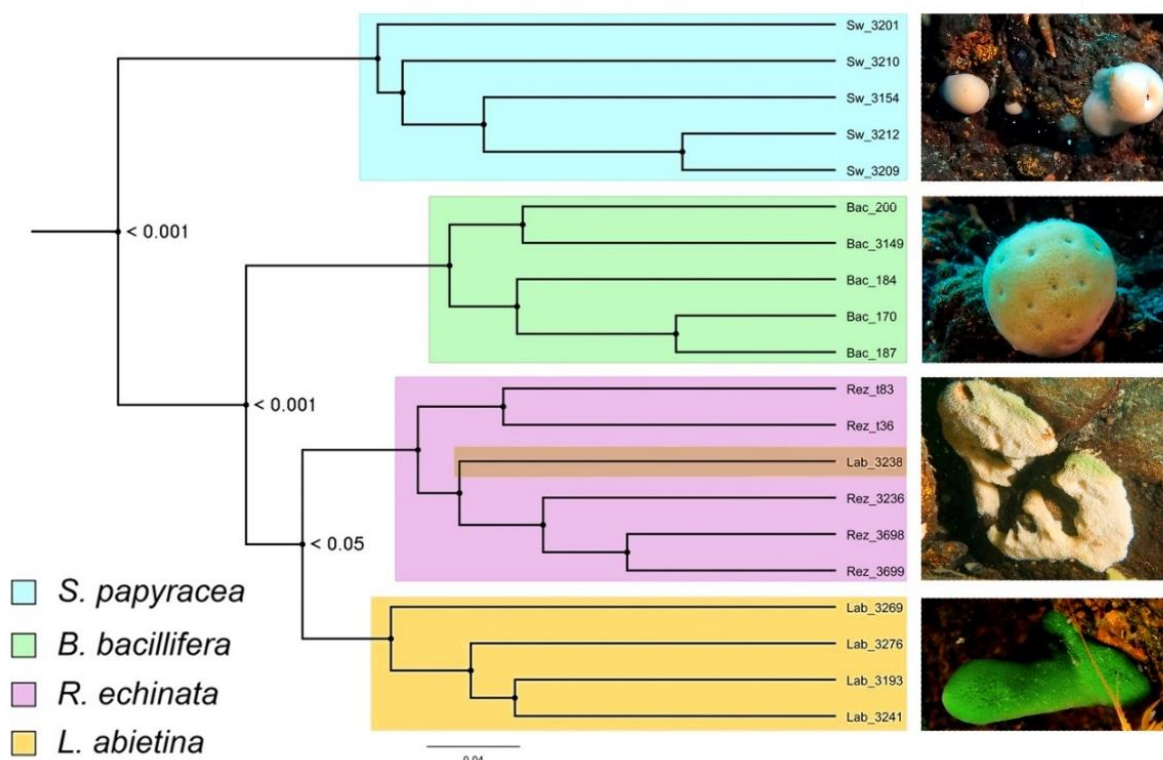


Рисунок 2. Дендрограмма, основанная на дистанциях Бруво, рассчитанных по 10 микросателлитным локусам, для четырех видов Lubomirskiidae,

построенная по методу UPGMA. В узлах находятся значения P-value теста AMOVA, указывающие уровень достоверности разделения на клады (Yakhnenko et al., 2024b). Фото И. Ханаева и О. Каменской.

Стоит отметить, что все виды, использованные в анализе, принадлежат к разным родам, поэтому для изучения возможности дифференциации видов одного рода требуются дополнительные исследования. Один образец Lab_3238, морфологически определенный как *L. abietina*, попал в кластер с образцами *R. echinata*. Предположительно, это может быть связано как с ограничениями предложенного метода, так и с межвидовой гибридизацией, однако образец не имел морфологических признаков (форма и размер спикул, структура скелета) таковой. Также на возможную гибридизацию указывали результаты кластерного анализа Structure, и низкие значения F_{ST} между видами *L. abietina* и *R. echinata* (0,22), соответствующие уровню внутривидовой варибельности для *L. baikalensis*. Вопрос межвидовой гибридизации Lubomirskiidae остается открытым и требует дальнейшего изучения. Результаты кластерного анализа, выполненного с помощью Structure методом ΔK и анализа главных координат согласуются со значениями F_{ST} и группировкой образцов на дендрограмме. Таким образом, с помощью 10 ядерных микросателлитных маркеров показана возможность дифференциации представителей разных родов семейства Lubomirskiidae.

3.3.2 Анализ внутри- и межвидовой разрешающей способности микросателлитных маркеров. Из набора универсальных микросателлитных локусов было выбрано 6, подходящих для изучения межвидовых взаимоотношений *E. muelleri* (Spongillidae) и *L. abietina* и *R. echinata* (Lubomirskiidae). Анализ был проведен на 34 образцах (по 5 образцов для *L. abietina* и *R. Echinata*, 24 образца для *E. muelleri*). Расчет попарных генетических дистанций F_{ST} , дендрограмма, основанная на дистанциях Бруво, кластерный анализ Structure методом ΔK и анализ главных координат показали достоверное разделение на уровне семейств, что соответствует разрешающей способности ядерных и митохондриальных маркеров для байкальских эндемичных и космополитных губок (Yakhnenko, Itskovich, 2020; Itskovich et al., 2022) с помощью которых можно разделить семейства, но не виды.

3.3.3 Анализ популяционно-генетической структуры *L. baikalensis*. В ходе работ были получены данные длин аллелей 10 микросателлитных локусов для 251 образца *L. baikalensis*, отобранных в 8 районах озера Байкал (рис. 1) (не менее чем по 30 образцов из каждого района). По результатам анализа с помощью Arlequin 3.5 ни один из локусов не показал значимого отклонения от равновесия Харди-Вайнберга (HWE) (P -value < 0,05) в среднем по всем районам. Среднее значение H_e составило 0,598, что попадает в интервал от 0,4 до 0,9, характерный для морских (Dailianis et al., 2011; Riesgo et al., 2016, 2019) и пресноводных (Li et al., 2018) видов губок. Данные генетического разнообразия всех 8 популяций *L. baikalensis*, представлены в таблице 1. Значение показателя Гарза-Вильямсона (G-W) для всех локусов всех популяций было больше 0,68,

что указывает на отсутствие резкого снижения эффективного размера популяций за последние 100 поколений. Кластерный анализ методом ΔK показал наибольшие значения $K=3$. Популяции распределяются в кластеры по котловинам (рис. 3а) (первый кластер – станция Уланово и скала Чертов Мост, второй кластер – мыс Ухан и пролив Малые Ольхонские ворота, третий кластер – мыс Турали, мыс Немнянка, мыс Елохин, мыс Верхнее Изголовье Святого Носа). Согласно результатам AMOVA, 18,91% варибельности было выявлено между популяциями ($P<0,001$). Достоверные различия наблюдались между всеми популяциями. Значения F_{ST} (рис. 3б) соответствовали географическому расположению популяций и обитанию в определенной котловине – между популяциями из одной котловины значение F_{ST} варьировало между 0,02 (мыс Немнянка – мыс Турали) и 0,15 (мыс Елохин – мыс Верхнее Изголовье Святого Носа), тогда как между любыми двумя парами популяций из разных котловин F_{ST} составило от 0,14 (мыс Верхнее Изголовье Святого Носа – пролив Ольхонские ворота, мыс Верхнее Изголовье Святого Носа – мыс Ухан) до 0,29 (мыс Елохин – скала Чертов Мост и мыс Немнянка – станция Уланово).

Таблица 1. Основные параметры генетического разнообразия *L. baikalensis* из разных районов оз. Байкал (Yakhnenko et al., 2024a).

Район	Na	Ne	Ho	He	HWE P-value	HWE P-value adj.	H	Диапазон аллелей	G-W	Fis	LD
US	5,11	2,71	0,59	0,61	0,52	0,62	4,63	6,89	0,73	0,03	1
CMR	5,50	2,78	0,52	0,54	0,51	0,62	5,14	6,80	0,77	0,03	4
SOV	6,20	3,13	0,59	0,61	0,49	0,62	6,25	8,40	0,69	0,04	1
CU	6,10	3,88	0,62	0,64	0,55	0,62	12,24	7,50	0,75	0,03	1
SN	5,00	2,80	0,62	0,62	0,62	0,62	4,11	6,50	0,76	0,01	3
CE	5,00	2,83	0,55	0,57	0,37	0,62	4,64	5,60	0,80	0,02	7
CT	5,40	3,18	0,59	0,59	0,53	0,62	7,22	6,50	0,74	0,01	3
CN	4,78	2,72	0,56	0,60	0,34	0,62	5,12	5,78	0,72	0,07	2

Na – число аллелей, Ne – число эффективных аллелей, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, Fis – коэффициент инбридинга среди особей, HWE P-value – уровень значимости для теста на равновесие Харди-Вайнберга, HWE P-value adj. скорректированное – уровень значимости для теста на равновесие Харди-Вайнберга с коррекцией Бежамини-Ходжберга, H – Тета, G-W – индекс Гарза-Вильямсона, LD – количество значимых случаев неравновесного сцепления локусов.

Визуализация с помощью дендрограммы, построенной по методу UPGMA по значениям F_{ST} (рис. 3б) демонстрирует деление образцов на три группы, в соответствии с местообитанием особей, что согласуется с результатами, полученными с помощью Structure (рис. 3а). Такой же результат показывает дополнительная визуализация многомерного шкалирования на основе генетических дистанций Бруво.

Значения F_{ST} от 0,02 (мыс Немнянка – мыс Турали) до 0,29 (мыс Елохин – скала Чертов Мост и мыс Немнянка – Станция Уланово) показывают наличие генетической подразделенности как на небольших (28,9 км), так и на значительных (566 км) географических дистанциях. Это первые данные о внутривидовой подразделенности, полученные для эндемичных губок древних озер. Для морских губок, собранных на расстоянии от 43 до 9115 км, значения попарных генетических дистанций F_{ST} варьировали от 0,03 до 0,45 (Riesgo et al., 2019), от 30 до 3000 км – от 0,022 до 0,33 (Duran et al., 2004), а от 7 до 2952 км – от 0,02 до 0,16 (Dailianis et al., 2011). Для пресноводных космополитных губок в системе рек и озер на расстоянии от <100 до >600 км значения F_{ST} варьировали от 0,05 до 0,23 (Lucentini et al., 2013), для космополитных пресноводных губок, обитающих в системе рек от 10 до 140 км, значения F_{ST} находились в диапазоне от 0,02 до 0,21 (Li et al., 2018).

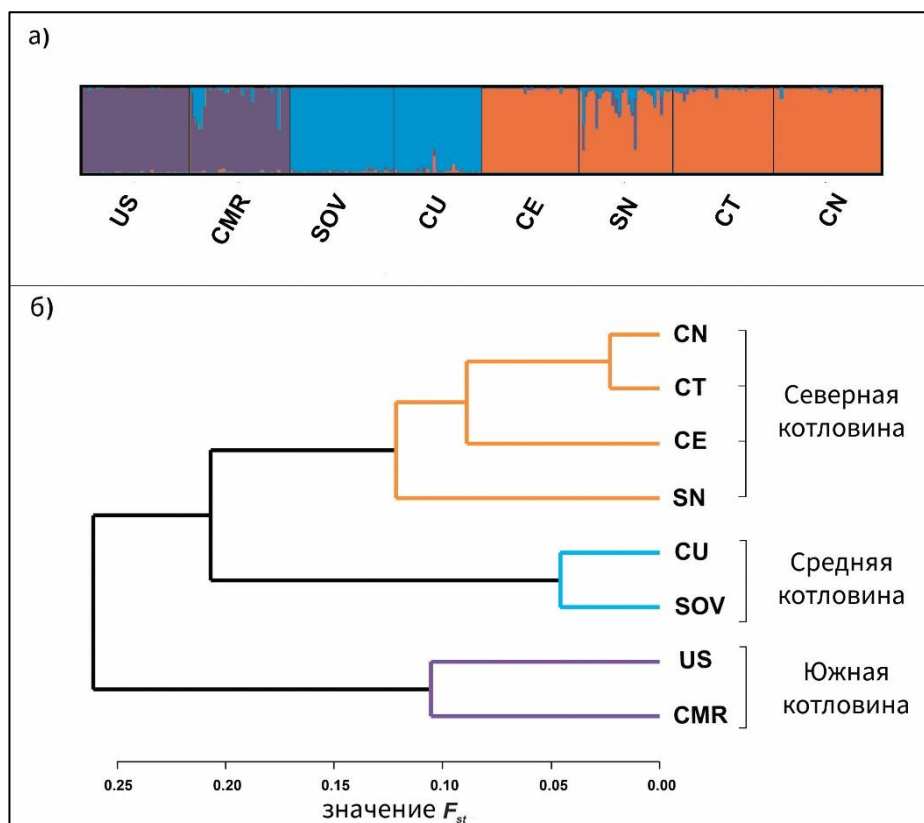


Рисунок 3. Визуализация сходства-различия между популяциями *L. baikalensis*: а – наиболее вероятное деление на генетические кластеры, полученное с помощью Structure (методом ΔK по методу Эванно); б – иерархический кластерный анализ точек отбора проб на основе значений F_{ST} (Yakhnenko et al., 2024a).

Таким образом, уровень генетической подразделенности байкальских эндемичных губок в целом соответствует уровням, наблюдаемым у морских губок, при этом, в Байкале на гораздо меньших географических расстояниях. Возможно, наблюдаемые различия связаны с историей развития озера и рядом эпизодов резкого значительного роста и падения численности губок вследствие изменений климата и катастрофических событий за последние сто тысяч лет (Osipov, Khlystov, 2010; Arzhannikov et al., 2018).

Для 8 популяций *L. baikalensis* были вычислены уровни миграции. Число мигрантов последнего поколения варьировало от 0,44 между районами скала Чертов Мост – мыс Елохин и мыс Елохин – пролив Малые Ольхонские ворота, до 65,4 между районами мыс Турали – мыс Немнянка. Согласно результатам регрессионного анализа, наибольшая отрицательная корреляция наблюдается между уровнями миграции и географическими дистанциями между популяциями, измеренными в диапазоне глубин обитания *L. baikalensis* ($R=0,46$, $P\text{-value}<0,0001$). Все 8 популяций имели значение коэффициента G-W $>0,68$ (табл. 1), что свидетельствует об отсутствии сигнала резкого снижении эффективной численности в недавнем прошлом (Garza, Williamson, 2001).

Реконструкция изменения размера эффективной численности губок по популяциям и общая для всех образцов с помощью метода *generalized skyline plot* показала одинаковый сценарий (рис. 4). Согласно полученной реконструкции, некоторое время назад был продолжительный период низкой численности, затем резкий рост и выход на плато высокой численности, на котором популяции находятся и в настоящий момент. Предполагаемая цепь демографических событий поддерживается данными подсчета спикул в кернах из донных отложений озера Байкал за последние 24 тыс. лет (Вейнберг, 2005).

Концентрация спикул в большей степени отражает изменение объема биомассы, чем численности, однако порядок роста биомассы в 28,9 раза соотносится с порядком роста эффективной численности популяций в нашей реконструкции (55,5 раза в среднем по всем популяциям).

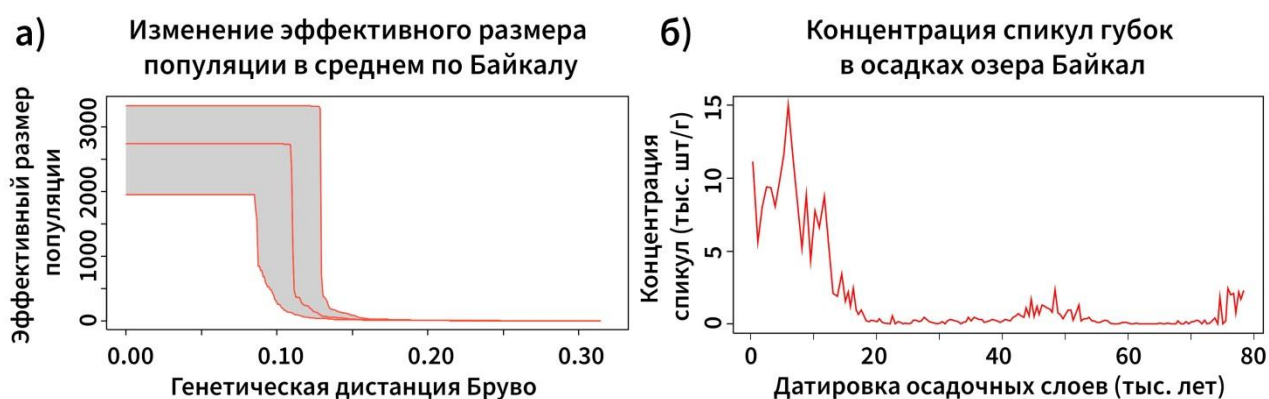


Рисунок 4. История изменения численности популяций губок в соответствии с а) реконструкцией, полученной методом *generalized skyline plot* для всех 8 популяций; б) графиком изменения концентрации спикул во времени, определенной с помощью анализа кернов, основанном на данных Вейнберг (2005) (Yakhnenko et al., 2024a).

События массовой гибели и болезней губок, наблюдаемые на Байкале в последнее десятилетие, по всей видимости, не оказали значительного влияния на генофонд ни одной из исследуемых популяций, несмотря на то, что больные особи были отмечены при отборе образцов во всех исследуемых районах. На это указывают сходные картины изменения эффективной численности во времени и то, что ни одна из популяций достоверно не отклоняется от равновесия Харди-Вайнберга, а также что тест на бутылочное горлышко не показал таких событий в недавнем прошлом. Таким образом, несмотря на значительное наблюдаемое снижение покрытия дна озера губками для ряда районов, значимого влияния на уровень генетического разнообразия не выявлено.

3.3.4 Анализ популяционно-генетической структуры *E. muelleri*. Успешно генотипирован 41 образец *E. muelleri* из 2 районов Малого Моря озера Байкал по 7 микросателлитным маркерам. Среди образцов выявлено 24 уникальных гаплотипа. Полученные значения генетического разнообразия двух популяций *E. muelleri* (табл. 2) находятся в интервале от 0,4 до 0,9, характерном для морских (Dailianis et al., 2011; Riesgo et al., 2016, 2019) и пресноводных (Li et al., 2018) видов.

Таблица 2. Основные параметры генетического разнообразия по двум популяциям *E. muelleri*

Район	N	Na	Ne	Ho	He	HWE P- value	Teta (H)	Диапазон аллелей	G-W	Fis
озеро Ханхой	11	3,71	2,82	0,676	0,627	ns	1,73	18	0,244	-0,038
бухта Хагден- Халэ	13	4,57	2,57	0,587	0,547	ns	1,53	22	0,236	-0,046

N – количество образцов, Na – число аллелей, Ne – число эффективных аллелей, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, HWE P-value – уровень значимости для теста на равновесие Харди-Вайнберга, G-W – индекс Гарза-Вильямсона, Fis – коэффициент инбридинга среди особей.

Значение Teta (H) незначительно отличается для обеих популяций (для оз. Ханхой H=1,73 и для бухты Хагден-Халэ H=1,53), что свидетельствует о схожих размерах их эффективной численности. Наибольшее значение диапазона аллелей зафиксировано для особей из бухты Хагден-Халэ (22), что указывает на то, что их ближайший общий предок является более древним, по сравнению с ближайшим общим предком для особей из оз. Ханхой. Значение

коэффициента $G-W$ было ниже 0,68 для обеих популяций, что демонстрирует снижение эффективной численности в недавнем прошлом. Значения F_{is} оказались крайне низкими и отрицательными для обеих популяций ($F_{is}=-0,038$ для озера Ханхой и $F_{is}=0,046$ для бухты Хагден-Халэ. В каждом районе отбора образцов присутствуют частные аллели, что подтверждает наличие некоторой генетической изоляции между районами. Согласно результатам теста на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, обе популяции находятся в равновесии по всем локусам. Значение F_{ST} составило 0,152 ($P\text{-value}<0,001$), что говорит о наличии слабой, но достоверной дифференциации между двумя исследованными районами. Географическое расстояние между двумя исследованными районами составляет 15 км по прямой. Наличие значимой генетической изоляции на небольшом расстоянии в озере Байкал в целом соответствует уровням генетической дифференциации, оцененной для Spongillidae, обитающих в системе рек (Li et al., 2018), где на расстоянии до 20 км было выявлено значение $F_{ST}=0,178$ между двумя популяциями. Таким образом, с помощью микросателлитных маркеров была изучена популяционно-генетическая структура *E. muelleri*, показано наличие его генетической подразделенности в районе залива Малое Море озера Байкал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые изучена внутри- и межвидовая вариабельность объединенного фрагмента гена *COI* для байкальских эндемичных и пресноводных космополитных губок семейств Lubomirskiidae и Spongillidae. Подтверждена эволюционная история Lubomirskiidae. Показана низкая вариабельность объединенного фрагмента гена *COI* и его непригодность для видовой идентификации и популяционно-генетических исследований Lubomirskiidae.

Подобран и оптимизирован эффективный подход для разработки наборов видоспецифичных и универсальных маркеров для группы близкородственных видов на примере эндемичных и космополитных видов губок озера Байкал. Подход заключается в поиске универсальных участков генома, содержащих микросателлитные последовательности и фланкирующие районы в двух и более геномах, где один геном принадлежит представителю вида из исследуемого набора, а второй – ближайшему виду, являющемуся родственником для изучаемой группы видов. Он оказался наиболее эффективен в сравнении с такими подходами, как анализ транскриптомных данных, тестирование кросс-видовой специфичности микросателлитных маркеров, подобранных только для близкородственного вида и разработка микросателлитных маркеров с помощью анализа геномных данных только одного вида.

Разработаны и успешно апробированы наборы микросателлитных маркеров для популяционно-генетических исследований Lubomirskiidae (*L. baikalensis*, *L. abietina*, *B. bacillifera*, *S. papyracea* и *R. echinata*), а также набор универсальных микросателлитных маркеров для изучения межвидовых взаимоотношений. Набор универсальных маркеров для четырех видов Lubomirskiidae позволяет дифференцировать их по родам.

С помощью разработанного набора микросателлитных маркеров для *L. baikalensis* был проведен популяционно-генетический анализ губок из 8 районов озера ($n=251$). Было выявлено наличие хорошо выраженной генетической структуры. Показана генетическая подразделенность внутри вида на три кластера, соответствующих котловинам обитания в озере Байкал. Все исследованные популяции эндемичных губок находятся в равновесии Харди-Вайнберга. Регрессионный анализ показал наиболее вероятное направление миграций по изобате глубины обитания вида *L. baikalensis*, на которое не оказывают влияния циркуляционные течения.

Проведенная реконструкция изменения эффективной численности *L. baikalensis* во времени показала резкий рост и последующий выход на плато, которое наблюдается в настоящий момент. Реконструкция соотносится с результатами, полученными ранее при анализе кернов, и, предположительно, описывает события возрастом до 24 тыс. лет, связанные с последним оледенением. Изменений структуры популяций, взаимосвязанных с событиями массовой гибели губок на Байкале, наблюдаемыми в последнее десятилетие, выявлено не было. Высокий уровень эффективной численности, наблюдаемый на сегодняшний день, указывает на то, что байкальские эндемичные губки не находятся под угрозой исчезновения в связи с событиями массовой гибели на текущий момент. Однако, необходим регулярный мониторинг состояния популяций в разных районах озера Байкал, в том числе, с помощью популяционно-генетического анализа. Полученные данные имеют мировое значение и позволяют составить представление о генетической структуре популяций эндемичных губок древних озер и глубоко понять внутривидовые взаимоотношения *L. baikalensis*.

Перспективным видом пресноводных космополитных губок для проведения популяционно-генетических исследований на Байкале является близкородственный Lubomirskiidae вид – *E. muelleri*. Для *E. muelleri* разработан набор микросателлитных маркеров, с помощью которого проведен популяционно-генетический анализ для двух районов залива Малое Море оз. Байкал. Определены основные показатели генетического разнообразия, выявлено, что обе проанализированные популяции находятся в равновесии. Показано наличие пространственно-генетической подразделенности в районе залива Малое Море оз. Байкал. Учитывая данные, полученные для байкальских эндемичных губок, выявлено, что способность к бесполому размножению не является определяющей для наличия пространственно-генетической подразделенности у пресноводных губок.

Определены границы разрешающей способности разработанных микросателлитных маркеров: для дифференциации пресноводных губок на уровне семейств – 6 локусов; для изучения внутривидовых взаимоотношений Spongillidae – 7 локусов и для изучения внутри- и межвидовых взаимоотношений близкородственных видов Lubomirskiidae – 10 локусов.

Таким образом, данное исследование внесло весомый вклад в понимание внутри- и межвидовых взаимоотношений байкальских эндемичных губок, а

разработанные наборы микросателлитных маркеров являются перспективной основой для дальнейших популяционно-генетических исследований и изучения межвидовых взаимоотношений для представителей родов *Lubomirskia*, *Baikalospongia*, *Rezinkovia* и *Swartchewskia*.

ВЫВОДЫ

1. С помощью филогенетического анализа на основе двух участков гена *COI* подтверждено эволюционное происхождение семейства *Lubomirskiidae* от общего предка с родом *Ephydatia* семейства *Spongillidae*.
2. Наиболее перспективными маркерами для изучения внутри- и межвидовых взаимоотношений близкородственных таксонов семейств *Lubomirskiidae* и *Spongillidae* являются микросателлитные локусы, которые вместе с фланкирующими районами содержатся в геномах двух видов – одного из списка целевых близкородственных и второго – ближайшего общего родственного вида для всех исследуемых видов.
3. С помощью разработанного набора универсальных микросателлитных маркеров выявлена генетическая подразделенность между байкальскими эндемичными губками *L. abietina*, *B. bacillifera*, *S. papyracea* и *R. echinata*.
4. Внутри вида *L. baikalensis* имеется сложная пространственно-генетическая структура, соответствующая модели изоляции расстоянием. Показано, что расселение губки не зависит от циркуляционных течений и осуществляется вдоль изобаты глубин ее обитания.
5. Внутри вида *E. muelleri* в районе залива Малое Море оз. Байкал имеется пространственно-генетическая подразделенность, не зафиксировано отклонений от равновесия Харди-Вайнберга.
6. Уровень эффективной численности *L. baikalensis* претерпел ряд изменений в недавнем прошлом, соответствующих изменению концентрации спикул губок в донных отложениях озера Байкал. Согласно полученным молекулярно-генетическим данным, снижения эффективной численности не выявлено, несмотря на события массовых заболеваний и гибели.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Yakhnenko A.S.**, Bukin Y.S., Bondar E.I., Khanaev I.V., Kirilchik S.V., Kondratov I.G., Itskovich V.B. Population genetic structure of the endemic sponge *Lubomirskia baikalensis* in Lake Baikal in the light of mass disease and mortality events // *Freshwater Biology*. 2024. Vol. 00. P. 1–14.

2. **Yakhnenko A.S.**, Bukin Y.S., Khanaev I.V., Itskovich V.B. Genetic diversity studies of Baikal endemic sponges at the interspecies and population levels using high-resolution microsatellite markers // *Aquatic Sciences*. 2024. Vol. 86. № Art. 85.

3. **Yakhnenko A.S.**, Itskovich V.B. Analysis of mtDNA variability in closely related Baikal sponge species for new barcoding marker development // *Limnology*. 2020. Vol. 21, №. 1. P. 49–57.

Статьи, индексируемые РИНЦ:

1. **Yakhnenko A.S.**, Itskovich V.B. Study of microsatellite cross-species specificity in freshwater sponge families Lubomirskiidae and Spongillidae // *Limnology and Freshwater Biology*. 2020. Vol. 6. P. 1084–1089.

2. **Yakhnenko A.S.**, Itskovich V.B. Prospects for population genetic studies of cosmopolitan freshwater sponges of the Spongillidae family in Lake Baikal // *Limnology and Freshwater Biology*. 2021 Vol. 6. P. 1199–1204.

Работы в материалах конференций:

1. **Yakhnenko A.S.**, Itskovich V.B. Universal microsatellite markers for Baikal endemic sponge family Lubomirskiidae // *The Thirteenth International Multiconference, Novosibirsk, Russia – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2022. P. 1148.*

2. **Yakhnenko A.S.**, Bondar E.I., Itskovich V.B. Genetic differentiation at the population level in Lake Baikal endemic sponge *Lubomirskia baikalensis* // *Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics (МАРЕЕГ-2022): International Symposium, Vladivostok, Russia – Vostok Marine Biological Station: Vladivostok State University of Economics and Service, 2022. P. 80.*

3. **Яхненко А.С.**, Ицкович В.Б. Разработка микросателлитных маркеров для популяционно-генетического анализа байкальских эндемичных губок // Тезисы докладов Международной научной конференции, посвящённой 150-летию Севастопольской биологической станции - Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий». В книге: Изучение водных и наземных экосистем: история и современность, Севастополь, Россия – Севастополь: ФИЦ инБЮМ, 2021. С. 497.

4. **Yakhnenko A.S.**, Itskovich V.B. Analysis of Cross-Species Usability of Microsatellite Markers for Baikal Endemic Sponges // *The 1st International*

Electronic Conference on Biological Diversity, Ecology and Evolution Biol. Life Sci. Forum, 2021. Vol. 2, № 1. P. 22.

5. **Yakhnenko A.S.**, Itskovich V.B. First microsatellite markers developed for population genetic studies of unique sponges from Lake Baikal // FEBS Open Bio 11 (Suppl. 1), 2021. P. 103–507.

6. **Yakhnenko A.S.**, Itskovich V.B. Study of the applicability of COI gene application for a population-genetic analysis of freshwater sponges of the Lubomirskiidae and Spongillidae families // Multidisciplinary Academic Research Conference «Science Present and Future: Research Landscape in the 21st century», Irkutsk, Russia – Irkutsk scientific center: SB RAS, 2020. P. 63.

7. **Yakhnenko A.S.**, Itskovich V.B. New approaches to the development of microsatellite markers in the study of Baikal sponges // The VII Vereshchagin Baikal Conference, Limnology and Freshwater Biology, Irkutsk, 2020. Vol. 4. P. 822–823.

8. **Yakhnenko A.S.**, Itskovich V.B. Study of the COI gene fitness for a population-genetic analysis of endemic Baikal sponges *L. baikalensis* // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020): The Twelfth International Multiconference, Novosibirsk, Russia – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2020. P. 683.

9. **Яхненко А.**, Соколова А., Ханаев И., Ицкович В. Изучение генетического разнообразия пресноводных губок семейств Spongillidae и Lubomirskiidae, собранных в географически удаленных районах, с помощью двух баркодинг-маркеров // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, Новосибирск, Россия – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2019. С. 716.

10. **Яхненко А.С.**, Ицкович В.Б. Оценка применимости участка I3-M11 гена COI для видовой идентификации близкородственных байкальских губок. Социально-экологические проблемы Байкальского региона и сопредельных территорий // Международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященная 100-летию ИГУ, Иркутск, Россия – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2018. С. 409.

11. **Яхненко А.С.**, Ицкович В.Б. Сравнительный анализ variability стандартного 5' концевой участка и участка I3M11 гена COI для близкородственных байкальских губок // Международная конференция «Пресноводные экосистемы – современные вызовы», Иркутск, Россия – Иркутск: ООО «Мегапринт», 2018. С. 365.