

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Лимнологический институт Сибирского отделения
Российской академии наук

На правах рукописи

Яхненко Алёна Сергеевна

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

1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Ицкович Валерия Борисовна

Иркутск – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Общая характеристика озера Байкал.....	13
1.1.2 Современное состояние экосистемы Байкала.....	15
1.2 Спонгиофауна озера Байкал.....	17
1.3 Изучение внутри- и межвидовых взаимоотношений губок с помощью молекулярно-генетических маркеров.....	22
1.4 Микросателлитные маркеры для изучения внутри- и межвидовых взаимоотношений.....	25
1.4.1 Разработка микросателлитных маркеров.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1 Сбор образцов.....	29
2.2 Выделение ДНК.....	33
2.3 Амплификация и генотипирование.....	34
2.4 Разработка микросателлитных маркеров.....	35
2.5 Анализ данных.....	36
2.5.1 Анализ данных секвенирования	36
2.5.2 Анализ геномных и транскриптомных данных	36
2.5.3 Анализ микросателлитных данных.....	36
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
3.1 Изучение внутри и межвидовых взаимоотношений <i>Lubomirskiidae</i> и <i>Spongillidae</i> с помощью двух участков гена <i>COI</i>	40
3.2 Разработка наборов универсальных и видоспецифичных микросателлитных маркеров для близкородственных видов губок.....	41
3.2.1 Тестирование кросс-видовой специфичности микросателлитных	

маркеров	42
3.2.2 Разработка наборов микросателлитных маркеров <i>de novo</i> для представителей Spongillidae и Lubomirskiidae.....	47
3.2.2.1 Тестирование двух подходов для наиболее эффективной разработки микросателлитных маркеров для <i>Lubomirskia baikalensis</i>	47
3.2.2.2 Разработка микросателлитных маркеров для <i>Ephydatia muelleri</i>	51
3.2.2.3 Определение уровня межвидовой специфичности микросателлитных маркеров внутри семейства Lubomirskiidae.....	53
3.2.3 Анализ геномных и транскриптомных данных <i>L. baikalensis</i> и <i>E.muelleri</i>	58
3.3 Изучение внутри- и межвидовых взаимоотношений Lubomirskiidae и Spongillidae с помощью микросателлитных маркеров.....	60
3.3.1 Изучение межвидовых взаимоотношений Lubomirskiidae	60
3.3.2 Анализ внутри- и межвидовой разрешающей способности микросателлитных маркеров.....	64
3.3.3 Анализ популяционно-генетической структуры <i>L. baikalensis</i>	67
3.3.3.1 Тест на равновесие Харди-Вайнберга.....	67
3.3.3.2 Генетическое разнообразие между популяциями.....	69
3.3.3.3 Паттерны миграции.....	76
3.3.3.4 Демографическая история	80
3.3.4 Анализ популяционно-генетической структуры <i>E. muelleri</i>	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
ВЫВОДЫ	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91
ПРИЛОЖЕНИЯ	112

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

п.н. – пар нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ALPHA – параметр Дирихле (α) для степени примеси;

aLRT – метод оценки достоверности топологии филогенетического дерева;

AMOVA – анализ молекулярной дисперсии;

BIC – баесовский информационный критерий;

COI – маркерный ген первой субъединицы цитохром С оксидазы;

СТАВ – цетилтриметиламмония бромид;

F – индекс фиксации;

F_{is} – коэффициент инбридинга среди особей;

F_{it} – коэффициент инбридинга среди особей по отношению к общему;

F_{ST} – попарные генетические дистанции;

G-W – коэффициент Гарза-Вильямсона;

Но – наблюдаемая гетерозиготность;

I – информационный индекс Шеннона;

I3-M11 – участок гена *COI*, расположенный между внутренней петлей *I3* и трансмембранным доменом *M11*;

Icoef – коэффициент инбридинга внутри субпопуляций, относительно общего количества;

ITS – маркерный ген внутреннего транскрибируемого спейсера;

ΔK – наиболее вероятное число групп в кластерном анализе;

LD – неравновесное сцепление генов;

M – уровень миграции;

MCMC – Марковская цепь Монте-Карло;

MDS – многомерное шкалирование;

ML – метод максимального правдоподобия для построения филогенетических деревьев;

Na – число аллелей;

N_e – число эффективных аллелей;

NJ – метод присоединения соседей для построения филогенетических деревьев;

P value – p-уровень значимости;

P_{hwe} – значение P-value для теста на равновесие Харди-Вайнберга;

SMM – модель пошагового мутирования;

TRM – двухфазная модель мутирования.

uN_e – несмещенная ожидаемая гетерозиготность;

UPGMA – метод построения ультраметрических филогенетических деревьев;

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), транскриптомы *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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика озера Байкал

Озеро Байкал – древний рифтовый водоем, возрастом более 25 млн лет. Байкал занимает первое место в мире по глубине (1642 м) и объему воды (23613 км³) среди пресных водоемов, что составляет 20% мировых запасов (Кожов, 1962; Galazii, 1990). Озеро питают более 300 притоков, наиболее крупными из которых являются Селенга, Верхняя Ангара, Баргузин и Турка. Сток озера осуществляется через одну реку – Ангару. Озеро окружено горными хребтами – Баргузинским, Байкальским, Приморским и Хамар-Дабаном. Озеро вытянуто с юго-запада на северо-восток на 636 км. Подводный рельеф озера представлен тремя котловинами – северной, средней и южной, разделенными подводными хребтами. Наиболее глубокая – средняя котловина (Мац и др., 2001). На территории озера расположены 30 островов, самый крупный – Ольхон (площадью 700 км²). Прозрачность озера достигает 40 м – наибольшая среди озер, она меняется в течение года, в зависимости от продуктивности фитопланктона. Максимальные значения температуры воды в поверхностном слое озера в летний период составляют 15-16°C у берегов и понижаются до 8-11°C в открытом Байкале. В хорошо прогреваемых заливах температура может достигать 20°C и выше. В зимний период в поверхностном слое подо льдом температура воды составляет 0,2-0,5°C, а в глубинных слоях она незначительно колеблется в течение года и достигает 3-3,5°C (Шимараев и др., 2009). На дне Байкала обнаружено 22 грязевых вулкана, ассоциированных с отложениями газогидратов, которые, по всей видимости, имеют биологическое происхождение и могут служить перспективной альтернативой современному углеводородному топливу (Khlystov et al., 2019). Кроме того, на дне озера обнаружены естественные выходы нефти, которые в результате жизнедеятельности микробных сообществ не оказывают негативного воздействия на водоем (Талиев и др., 1985). Озеро Байкал уникально сочетанием пресных вод и типичных для океанов гидрологических процессов, таких как термобар, стратификация,

весенняя и осенняя гомеотермия, горизонтальные циклонические течения, апвеллинги и даунвеллинги, глубокая конвекция (Weiss et al. 1991). Современная высота озера над уровнем моря составляет 456 м, однако, согласно геологическим данным, за посление 100 тыс. лет в разные периоды уровень озера был на 200 м выше и на 40 м ниже современного (Arzhannikov et al., 2020). Многочисленные заливы, бухты и соры способствуют созданию в озере своеобразного градиента абиотических характеристик среды, что находит свое отражение на разнообразии видового состава биоты. В прибрежно-соровой зоне выражены сезонные и суточные колебания условий. В ней обитают виды, характерные для других водоемов Сибири, способные адаптироваться к постоянно изменяющимся условиям обитания. Глубоководная зона характеризуется постоянными температурами, химическим составом и высокой концентрацией кислорода и населена в основном эндемичными видами, чувствительными даже к небольшим колебаниям характеристик окружающей среды (Кожов, 1962). Биоразнообразие Байкала представлено в основном эндемичными видами – около 60% из более, чем 2600 описанных (Тимошкин, 2011).

История озера насчитывает миллионы лет, за это время сформировался достаточно мощный осадочный слой, который достигает 7 км в южной котловине (Hutchinson et al., 1992). Осадочные слои формировались как во впадинах, так и на поверхности подводных хребтов (BDP-99 Baikal Drilling Project Members, 2005). Осадки содержат информацию об изменениях климата и используются для палеоклиматических реконструкций. В число индикаторов для палеоклиматических реконструкций входит содержание урана, которое было низким в периоды оледенений, по сравнению с более теплыми периодами Chebykin et al. (2004). Концентрации и видовой состав организмов, выделяющих биогенный кремнезем, также используются для изучения палеоклимата и биоразнообразия на протяжении истории озера. Среди кремнийсодержащих организмов в донных отложениях на миллионы лет сохраняются створки диатомовых водорослей (Grachev et al., 1988) и

спикулы губок (Вейнберг, 2005). С помощью датирования и последующего анализа содержания биогенного кремнезема в ядрах из различных районов озера были определены условия обитания, количество и видовой состав диатомовых водорослей и губок в более, чем на 2 млн лет назад. Различия в концентрациях створок диатомей и спикул губок в теплые и холодные периоды достигают нескольких десятков раз (Вейнберг, 2005). Помимо климатических изменений, на количество и видовой состав биоты могли влиять катастрофические события, такие как резкие изменения уровня озера, происходившие не единожды (Arzhannikov et al., 2017).

1.1.2 Современное состояние экосистемы озера Байкал

Согласно наблюдениям, ведущимся с середины прошлого века, на Байкале наблюдается рост среднегодовых температур и увеличение антропогенной нагрузки, что ведет к изменениям в составе водных сообществ в сторону космополитных видов (Roberts et al., 2018).

Для оценки повышенного антропогенного влияния на экосистему озера показательным является залив Лиственничный, который испытывает повышенную нагрузку сточными водами, о чем свидетельствуют санитарно-микробиологические показатели рек, проходящих через поселок Листвянка и впадающих в Байкал (Мальник и др., 2019). Показано увеличение концентраций биогенных элементов в Лиственничном заливе до 20-60 раз по сравнению с фоновыми показателями (Р до 420 мг/л и N до 0,20 мг/л по сравнению с 7 и 0,01 мг/л, соответственно) (Khodzher et al., 2017). В устьях рек Снежная, Голоустная, Бугульдейка, Анга, Кучулга, Сарма, Турка, Баргузин и Кичера также обнаружены высокие концентрации условно-патогенных бактерий, превышающие санитарно-эпидемиологические нормативы для поверхностных вод РФ, что свидетельствует о повышенной антропогенной нагрузке на данные реки (Suslova et al., 2019).

Повышенные концентрации биогенных элементов обнаружены и в притоках крупных рек (Баргузин, Селенга, Верхняя Ангара). При этом в пелагической зоне Байкала изменений не выявлено (Khodzher et al., 2017;

Suslova et al., 2019). Сильную антропогенную нагрузку испытывает и район города Северобайкальска, сточные воды которого стекают в речку Тья и вскоре после этого сразу попадают в Байкал. Показано, что концентрации химических компонентов сточной воды, сбрасываемой в Тью, превышают ПДК в несколько раз (Тимошкин и др., 2014).

В последнее десятилетие на Байкале наблюдаются изменения пространственного распределения и биоразнообразия организмов. В частности, изменения коснулись фитоценозов прибрежной части озера (Kravtsova et al., 2014; Тимошкин и др., 2014). Структура распределения водорослей в прибрежной зоне озера Байкал до 2011 года выглядела следующим образом: от 0 до 1,5 м преобладали водоросли *Ulothrix zonata* (Web. & Mohr.) Kütz, от 1,5 до 2,5 – *Tetraspora cylindrica* (Wahlenb.) Ag. var. *bullosa* C. Meyer и *Didymosphenia geminata* (Lyngb.) M. Schmidt, и на глубинах от 2,5 до 20 м – эндемичный байкальский род *Draparnaldioides* C. Meyer & Skabich. В 2011 году в заливе Лиственничный *U. zonata* оказался преобладающим видом на глубинах от 2,5 до 5 м. Помимо этого, бентосные маты водорослей родов *Ulothrix* и *Spirogyra* наблюдались на глубинах от 3 до 10 м, как на каменистых, так и на песчаных субстратах. Представители рода *Spirogyra* широко распространены в различных климатических зонах, они населяют реки, озера, лужи и болота (Рундина, 1998). Согласно многолетним наблюдениям, с 1925 до 1990 гг., на Байкале представители *Spirogyra* встречались в виде отдельных нитей в заливах и небольших озерах, отгороженных песчаными косами в средней и северной котловинах Байкала. С 2008 года небольшие количества *Spirogyra* наблюдались в истоке Ангары, в 2009 г. отдельные нити встречались в районе залива Большие Коты (Timoshkin et al., 2014). В 2013-2014 гг. массовые цветения *Spirogyra* наблюдались в большинстве районов озера во всех трех котловинах (Timoshkin et al., 2016). Цветение нитчатых зеленых водорослей повлияло на распределение бактериальных сообществ и диатомовых водорослей. Помимо этого, во многих районах озера наблюдаются события массовых заболеваний

и гибели эндемичных губок (Грачев и др., 2015; Тимошкин и др., 2015; Khanaev et al., 2018; Roberts et al., 2018; Maikova et al., 2021; Механикова и др., 2023). Первые упоминания о заболевших губках были сделаны в 2011 г. (Бормотов, 2011). Показано, что заболевания губок могут быть связаны с отрицательным влиянием таких факторов, как антропогенные загрязнения, повышение температуры и внесение чужеродных видов (Webster et al., 2008a,b, López-Legentil et al., 2010) и сопровождаются изменением микробиома губок (Denikina et al., 2016, Kulakova et al., 2018). С 2015 года ведется работа по мониторингу заболевания байкальских эндемичных губок. Особи с признаками заболеваний встречаются по всей акватории озера Байкал, но степень и интенсивность заболеваний разная и зависит от районов озера и глубин. В южной котловине количество больных губок относительно здоровых (на 1 м²) варьирует от 22,3 до 51,4%, в центральной и северной – 8,4-11% (Khanaev et al., 2018). В некоторых точках сбора, например, в районе поселка Большие Коты, 95% ветвистых губок на глубине 5 м погибли, либо имеют признаки заболеваний (Timoshkin et al., 2016). Поскольку места с наибольшим уровнем заболеваний географически локализуются вблизи прибрежных населенных пунктов, антропогенный фактор, с высокой вероятностью, вносит большой вклад в развитие заболеваний байкальских эндемичных губок.

1.2 Спонгиофауна озера Байкал

Байкальские губки – представители древнейшего типа многоклеточных организмов (Porifera), насчитывающего более 8500 морских и пресноводных видов (Van Soest et al., 2012). Тип Porifera включает в себя 4 класса, 128 семейств и 680 родов. Все пресноводные губки (Spongillida) относятся к классу Demospongiae (Li, 1998) и насчитывают 6 семейств и более 250 видов (Van Soest et al., 2012). Представители Spongillida встречаются на всех континентах, за исключением Антарктиды, ведут сидячий образ жизни, имеют простую организацию тела и скелет, состоящий из кремниевых спикул. Тело губки покрыто дермальным эпителием, состоящим из

пинакоцитов, окружающих органический матрикс (мезохил). Мезохил содержит специализированные клетки, такие как хоаноциты и архециты. Клетки мезохила взаимодействуют с пинакоцитами в процессе газообмена, пищеварения, структурной поддержки и размножения. По типу питания губки являются фильтраторами. Их тело пронизано каналами и полостями, выстланными хоаноцитами – клетками, играющими ключевую роль в питании губок. Каждый хоаноцит имеет жгутик и воротничок, состоящий из микроворсинок. Биение жгутиков стимулирует непрерывный ток воды с органическими частицами через тело губки. Хоаноциты поглощают органические частицы и микроорганизмы, основная часть которых имеет размеры от 2 до 10 мкм (Pile et al., 1996).

Годовой жизненный цикл большинства видов пресноводных губок состоит из периодов покоя и активного роста. Переход в стадию покоя сопровождается образованием геммул – шарообразных телец, содержащих тотипотентные клетки, защищенные слоем особых спикул – геммулосклер (Frost, 1982; Maldonado, Riesgo, 2008). Геммулы позволяют губкам переживать неблагоприятные условия среды, такие как высыхание, и расселяться на большие расстояния (Bilton et al., 2001). Переход в стадию активного роста, соответственно, начинается с вылупления молодой особи из геммулы. Особи, вылупившиеся из геммул, произведенных одной губкой, генетически идентичны, поэтому, если находятся рядом, объединяются в единый организм. Также, в случае фрагментации одного организма, могут образоваться несколько генетически идентичных особей губок (Reiswig et al., 2010). Половое размножение происходит лишь в короткие периоды активного роста. Представители Spongillidae, обитающие в открытом Байкале, могут иметь многолетний жизненный цикл, не отмирая в зимний период (Семитуркина и др., 2011). Описанные выше особенности жизненного цикла характерны для представителей космополитного семейства Spongillidae, населяющего прибрежные районы озера Байкал.

Также в Байкале обитают губки эндемичного семейства Lubomirskiidae (Pile et al., 1997), которые составляют основную часть биомассы бентоса озера. Важными особенностями представителей Lubomirskiidae, населяющих глубины от 3 до более, чем 1400 м, являются низкая скорость роста, многолетний жизненный цикл и отсутствие стадии образования геммул, характерной для космополитных пресноводных губок (Manconi, Pronzato, 2008). По всей видимости, эти особенности являются адаптацией к обитанию в стабильных условиях озера. Половое размножение и расселение осуществляется посредством свободноплавающих личинок – паренхимул (Алексеева, 1980; Manconi, Pronzato, 2008). Также, в ходе водолазных работ наблюдались случаи прирастания к субстрату отделившихся частей губки, такой механизм расселения был описан ранее для других видов класса Demospongiae (Turon et al., 1998, Reiswig and Frost, 2010). Эндемичное семейство Lubomirskiidae отделилось от предкового вида современных Spongillidae 3,4 млн лет назад (Schuster et al., 2018), в результате чего сформировался букет близкородственных видов (Itskovich et al., 2006, 2008; Meixner et al., 2007; Maikova et al., 2015). За время существования оз. Байкал происходили существенные изменения видового разнообразия и численности спонгиофауны, информация о которых была получена из донных отложений (Вейнберг, 2005). К настоящему времени описано 19 видов губок, из которых 15 являются эндемиками (Ефремова, 2001, 2004; Itskovich et al., 2015; Manconi, Pronzato, 2019; Bukshuk, Maikova, 2020). В прибрежно-соровой зоне озера обитают представители пресноводного семейства Spongillidae – *Trochospongilla* sp., *Ephydatia fluviatilis* (Linnaeus, 1759), *Ephydatia muelleri*, *Spongilla lacustris* (Linnaeus, 1759) (Ефремова, 2001). Спонгиллиды избегают открытого Байкала, только один вид – *Trochospongilla* sp. – встречается в открытой литорали озера (Ефремова, 2001, 2004). В палеонтологических летописях отмечены периоды, когда в озере преобладали представители семейства Spongillidae (Вейнберг, 2005).

Семейство Lubomirskiidae представлено 4 родами - *Lubomirskia* (Dybowski, 1880), *Baikalospongia* (Annandale, 1914), *Swartschewskia* (Makuschok, 1927), *Rezinkovia* (Efremova, 2001). Виды эндемичных губок *L. baikalensis*, *L. abietina*, *B. bacillifera*, *R. echinata* и *S. papyracea*, рассматриваемые в данной работе, представляют все роды семейства Lubomirskiidae.

Lubomirskia baikalensis – форма тела встречается как плоская, так и ветвистая. Обитает в диапазоне глубин от 3 до 120 м (Masuda, 2009). Наиболее распространен вдоль берегов Южного Байкала на глубине 8-15 м. Распространение этого вида на большие глубины может быть ограничено облигатным симбиозом с микроводорослями (Itskovich et al., 2017). Ветвистые формы встречаются повсеместно на глубинах от 3 до 25 м. Плоские формы преобладают в Северной котловине Байкала. Рост тела губки в высоту составляет от 0,2 до 3,5 см в год. *L. baikalensis*, как и другие пресноводные представители этого типа, сосуществует в симбиозе с различными бактериями, зелеными водорослями, динофлагеллятами и диатомовыми водорослями (Pile et al., 1997).

Lubomirskia abietina – имеет корковую форму тела. Распространен на глубинах от 10 до 55 м. Встречается вдоль западного побережья озера, с максимальной численностью в Южном Байкале (Ефремова, 2001).

Baikalospongia bacillifera – массовый вид губок. Образует на камнях массивные корковые наросты зеленого цвета. В истоке Ангары обнаружены формы, не прикрепленные к субстрату. Обитает на глубинах от 4,5 до 157 м. Распространен вдоль западного и восточного берегов южной и средней котловин оз. Байкал, а также вдоль западного побережья Северной котловины (Ефремова, 2001).

Swartschewskia papyracea – губка округлой формы желтовато-белого цвета, селится на камнях и скальных поверхностях с отрицательным уклоном. Обитает на глубинах от 1 до 90 м. Распространена вдоль западного

побережья Байкала, чаще встречается в Южной и Средней котловинах оз. Байкал (Ефремова, 2001).

Rezinkovia echinata – имеет корковую форму тела толщиной от 2 до 15 мм, окраска от бело-кремового до зеленого цвета, в зависимости от места обитания. Преимущественно обитает на вертикальных и отрицательных поверхностях скальных образований. Населяет глубины от 10 до 90 м. Наиболее распространена вдоль западного побережья Южной и Средней котловин оз. Байкал (Ефремова, 2004).

Ephydatia muelleri – имеет корковую форму тела, окраска от бежевого до зеленого цвета. Космополитный вид семейства Spongillidae. Встречается в мелководных бухтах залива Малое Море на глубине 0,6 м, у острова Большой Ушканий на глубине 1,5 м (Ефремова, 2001).

Байкальские губки обильно покрывают поверхность камней и являются видами-эдификаторами. На них обитает множество разнообразных организмов, образующих консорции, в состав которых может входить до 12 таксонов: Amphipoda, Chironomidae, Copepoda, Hirudinea, Isopoda, Mollusca, Nematoda, Oligochaeta, Ostracoda, Polychaeta, Trichoptera и Turbellaria (Kamaltynov et al., 1993; Weinberg et al., 2004).

Симбиотическое сообщество может составлять до 50% биомассы губки (Cervino и др., 2006; Hentschel et al., 2006; Webster, Blackall, 2009). Среди эндосимбионтов губок определены одноклеточные водоросли, дрожжи и бактерии (Парфенова и др., 2008; Калюжная и др., 2012; Гладких и др., 2014; Kulakova et al., 2014). Прокариотическая часть симбиотического сообщества губок представлена цианобактериями, а также представителями отдела *Bacteroidetes* и класса *Betaproteobacteria* (Калюжная, Ицкович, 2015). Среди эукариотических симбионтов губок отмечены одноклеточные зеленые водоросли из рода *Chlorella*, грибы и диннофлагелляты. Именно за счет представителей Chlorophyta часть видов губок имеет зеленый цвет. Соответственно, виды, обитающие на больших глубинах, где ограничен доступ солнечного света, лишены симбиотических водорослей и имеют

белосероватую, голубоватую или желтоватую окраску. Также вещества, выделяемые симбионтами, могут использоваться некоторыми видами водных плесеней как источник питания (Czeczuga et al., 2015). Фильтрационный тип питания губок, сопутствующий ему частый контакт с различными патогенами, а также прикрепленный образ жизни, способствовали возникновению механизмов пассивной защиты с помощью биологически активных веществ. Способность обнаруженных в губках биологически активных веществ подавлять развитие патогенной микрофлоры и раковых клеток является перспективной для использования в медицине (Keller-Costa et al., 2014; Calcabrini et al., 2017; Varijakzhan et al., 2021; Morais et al., 2022). Перспективными для медицинских приложений являются как вещества, производимые симбиотическим сообществом губок, так и самими губками. На сегодняшний день из губок выделено несколько десятков веществ различной природы, имеющих апоптоз-индуцирующую активность. Эти вещества относятся к нуклеозидам, алкалоидам, липидам и терпеноидам (Essack et al., 2011).

Помимо биомедицинских приложений, губки играют важную роль при проведении экологических исследований. Фильтрация воды даже с низким содержанием загрязняющих веществ ведет к повышенному контакту с ними клеток. Токсины накапливаются в теле губок, что делает последних перспективными 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). Использование байкальских губок в качестве биоиндикаторов развивается в нескольких направлениях. Первое – оценка загрязнения озера тяжелыми металлами, которые накапливаются в губках (Yakhnenko et al., 2022). Второе – оценка уровня стресса с помощью анализа дифференциальной экспрессии генов в условиях повышенных температур или других стрессовых факторов (Itskovich et al., 2018, 2019; Yakhnenko et al., 2021). Третье – ежегодные мониторинговые исследования заболеваний губок в разных районах озера

(Khanaev et al., 2018; Maikova et al., 2021). Мониторинг заболеваний и гибели губок имеет большое значение, поскольку в некоторых районах озера наблюдается сокращение популяции ветвистых губок до 100%, а корковых – до 50% (Maikova et al., 2021).

1.3 Изучение внутри- и межвидовых взаимоотношений байкальских губок с помощью молекулярно-генетических маркеров

Классификация и видовая идентификация губок является нетривиальной задачей в связи с высокой вариабельностью внешних признаков. Ранее она была основана лишь на морфологических признаках, таких как форма и размер спикул и архитектура скелета. Как было показано многими авторами (Palumbi, 1986; Bell et al., 2002; Masuda, 2009), эти параметры в достаточной степени зависят от условий среды, что может приводить к ошибочному определению вида. Для пресноводных губок важным диагностическим параметром является также строение геммул и геммосклер. У всех представителей *Lubomirskiidae* отсутствует геммулообразование, что осложняет видовую идентификацию и классификацию байкальских эндемичных губок (Itskovich et al., 2013). Отделение *Lubomirskiidae* от предковых видов *Spongillidae*, показанное с помощью молекулярно-генетических маркеров (Itskovich et al., 2006), произошло около 3,4 млн лет назад (Schuster et al., 2018).

Большинство полученных ранее филогенетических деревьев не обладают достаточной разрешающей способностью для делимитации видов. Например, для одного из стандартных маркерных генов - 28S рРНК, на филогенетическом древе образцы разных видов *Lubomirskiidae* объединяются в один кластер, но достоверно не разделяются по видам или родам (Itskovich et al., 2022). Деревья на основе *ITS*, *COI* и *18S* маркеров также демонстрируют монофилетичность семейства, однако не позволяют разрешить межвидовые взаимоотношения (Meixner et al., 2007; Itskovich et al., 2007; Itskovich et al., 2008).

Анализ *ITS1* и *ITS2* последовательностей *Lubomirskiidae* показал наличие паралогов, имеющих внутригеномную вариабельность до 2%. Филогенетическое древо, построенное на основе этих маркеров, также не позволяет разрешить внутривидовые взаимоотношения *Lubomirskiidae* (Itskovich, 2020). Филогенетическое древо, построенное по транскриптомным данным (прил. 1а), позволило выделить клады со 100% бутстреп поддержками и включало по одному образцу для *B. bacillifera*, *L. abietina*, *L. baikalensis* и *S. papyracea*, а также, представителей семейства *Spongillidae* и морских губок (Kenny, Itskovich, 2021). На древе *L. abietina* и *L. baikalensis* попадают в одну кладу, для которой *B. bacillifera* является сестринским таксоном. *S. papyracea* является сестринским таксоном для остальных видов *Lubomirskiidae* (*B. bacillifera*, *L. abietina*, *L. baikalensis*). Топология филогенетического древа, построенного по последовательностям мтДНК (Maikova, Sherbakov, 2023) (прил. 1б) отличается от описанного выше. На древе, построенном на основе митохондриальных генов, представители рода *Baikalospongia* (*B. intermedia profundalis*, *B. bacillifera* и *B. intermedia*) образуют сестринскую кладу с остальными видами *Lubomirskiidae*. *L. baikalensis* и *R. echinata* попадают в одну кладу, для которой род *Swartschewskia* (*S. papyracea* и *S. khanaevi*) является сестринским таксоном. Таким образом, актуальным остается поиск молекулярно-генетических маркеров, позволяющих изучить меж- и внутривидовые взаимоотношения *Lubomirskiidae*.

Несмотря на низкую вариабельность стандартного фрагмента гена *COI* (Duran et al., 2004; Itskovich et al., 2006; Wörheide, 2006; Cárdenas et al., 2007; Röppe et al., 2010; Ekins et al., 2016) у губок, дополнительный участок гена *COI* - *I3-M11*, с успехом применяется для популяционно-генетических исследований морских губок (Swierts et al., 2013, 2017). Участок *I3-M11* находится на 23 аминокислоты дальше 5' концевого участка, имеет протяженность от внутренней петли *I3* до трансмембранного домена *M11*.

Изучение популяционно-генетической структуры байкальских эндемичных губок ранее не проводилось. В связи с чем, вопрос наличия внутривидовой генетической подразделенности, анализ изменения эффективной численности популяций во времени и изучение паттернов распространения внутри видов представляют большой интерес. Для анализа популяционной структуры сидячих организмов, и в частности губок, наиболее эффективными считаются такие молекулярно-генетические маркеры, как стандартные баркоды *COI* (López-Legentil, Pawlik, 2009) и микросателлитные маркеры (Blanquer, Uriz, 2010). Поскольку последовательность гена *COI* является весьма консервативной, использование праймеров, разработанных ранее (Folmer et al., 1994; Raleigh et al., 2007), на космополитных и байкальских эндемичных губках весьма перспективно.

Популяционно-генетическая структура некоторых видов морских губок изучена достаточно неплохо с помощью микросателлитных маркеров (Duran et al., 2004; Calderón et al., 2007; Caujapé-Castells, 2009; Blanquer, Uriz, 2010; Blanquer et al., 2011; Riesgo et al., 2019), тогда как для пресноводных представителей этого типа опубликовано всего несколько исследований (Lucentini et al., 2013; Li et al., 2018). Популяционная структура эндемичных губок древних озер (Manconi, Pronzato, 2008) совершенно не изучена.

1.4 Микросателлитные маркеры для изучения внутри- и межвидовых взаимоотношений губок

Среди молекулярно-генетических маркеров для изучения популяционной структуры губок наиболее перспективными считаются микросателлиты, которые широко использовались для решения задач, связанных с популяционной структурой и генетическим разнообразием организмов в последнее десятилетие (Gui, Zhou, 2010; Vieira et al., 2016; Hu et al., 2019; Yu et al., 2019; Zhao et al., 2019).

Микросателлиты – это короткие участки ДНК, содержащие от 5 до 40 тандемных повторов, каждый из которых содержит от 1 до 6 нуклеотидов.

Повторы, содержащие 2-4 нуклеотида, наиболее часто используются для молекулярно-генетических исследований (Li et al., 2002). Три- и гексануклеотиды чаще всего встречаются в кодирующих областях генома, поскольку не ведут к сдвигу рамки считывания (Toth et al., 2000). Встречаются совершенные, несовершенные, прерывистые и сложные типы повторов. Совершенный тип характеризуется только повторяющимся мотивом, не прерванным ни одним посторонним нуклеотидом (АТАТАТАТАТАТ). Несовершенные повторы имеют внутри повтора замену одного из нуклеотидов (АТАТАСАТАТАТ). Прерванные – содержат короткую последовательность, прерывающую повтор (АТАТСТАТАТАТ). Сложные микросателлиты состоят из двух разных повторяющихся мотивов, следующих один за другим (АТАТАТАТАТАТТГТГТГТГТГТГТГТГТГ). Микросателлиты встречаются как у прокариот, так и в ядерной ДНК и ДНК органелл эукариот (Pérez-Jiménez et al., 2013; Phumichai et al., 2015). Идентификация микросателлитных локусов осуществляется с помощью прилегающих к ним участков ДНК, которые, как правило, консервативны для представителей одного вида. Аллели каждого локуса отличаются друг от друга числом tandemных повторов. Генотипирование осуществляется с помощью высокоразрешающего гель-электрофореза. Скорость возникновения мутаций для микросателлитных участков ДНК на 10 порядков выше, чем для точечных мутаций и находится в диапазоне от 10^3 до 10^6 на поколение клеток (Gemayel et al., 2012). Благодаря этому, с помощью микросателлитных маркеров можно изучать такие экологические аспекты, как недавняя демографическая история популяций, паттерны миграции, уровень генетической подразделенности внутри вида. Помимо этого, микросателлиты широко используются для генотипирования, анализов на родство и тестирования на некоторые генетические заболевания (O'Donnell, Warren, 2002; Wright, Bentzen, 1994; Schlötterer, 2000). Ряд исследований демонстрирует эффективность использования микросателлитов для идентификации таксонов и изучения межвидовых взаимоотношений для

родов возрастом до 48 млн лет (Груздева и др., 2020; Животовский и др., 2013; Ning et al., 2023). Высокая эффективность использования микросателлитных маркеров была показана для популяционно-генетического анализа как морских (Blanquer, Uriz, 2010; Dailianis et al., 2011; Pérez-Portela et al., 2015; Riesgo et al., 2019) и пресноводных (Lucentini et al., 2013; Li et al., 2018) губок, так и для других групп организмов (Hu et al., 2019; Yu et al., 2019; Zhao et al., 2019).

С помощью микросателлитных маркеров для морских представителей класса Demospongiae (*Crambe crambe* (Schmidt, 1862), *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789), *Spongia lamella* (Schulze, 1879) было показано наличие пространственно-генетической подразделенности на расстояниях от 30 до 3000 км, влияние океанографических фронтов на распространение губок и события резкого снижения численности в недавнем прошлом для ряда популяций (Duran et al., 2004; Pérez-Portela et al., 2014; Riesgo et al., 2019). Для пресноводного представителя Demospongiae Spongillidae (*E. fluviatilis*) было также показано наличие пространственно-генетической подразделенности для популяций как из одной системы рек, так и из отдельных водных объектов, находящихся на расстоянии от 20 до 700 км (Lucentini et al., 2013; Li et al., 2018).

1.4.1 Разработка микросателлитных маркеров

При выборе микросателлитных маркеров для анализа популяционной структуры можно использовать несколько подходов. Наиболее простой заключается в тестировании ранее разработанных маркеров для целевого или близкородственного вида (Rico et al., 1996; Peakall et al., 1998). Для беспозвоночных уровень кросс-видовой специфичности микросателлитных маркеров достигает 72% среди близкородственных видов (Barbará et al., 2007). Также использование кросс-видовых микросателлитных маркеров позволяет сравнивать тесно связанные между собой таксоны при изучении механизмов, задействованных в расхождении популяций и процессе видообразования (Noor, Feder, 2006) и для идентификации представителей

близкородственных видов (Животовский и др., 2013). Еще один подход - разработка наборов микросателлитных маркеров для одного или нескольких близкородственных видов на основе анализа геномных данных (Senan et al., 2014).

Что касается пресноводных губок, микросателлитные маркеры разработаны только для *Ephydatia fluviatilis* (Anderson et al., 2010). Поскольку байкальские эндемичные губки являются сестринской группой для *E. fluviatilis*, имеющийся набор может послужить значительным заделом для разработки микросателлитных маркеров для различных видов байкальских эндемичных губок. Кроме того, для *E. muelleri* и *L. baikalensis* имеются опубликованные геномные и транскриптомные данные (Kenny et al., 2019, 2020), которые позволят выбрать наиболее видоспецифичные последовательности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор образцов

Образцы байкальских эндемичных губок *Lubomirskia baikalensis*, *Lubomirskia abietina*, *Baikalospongia bacillifera*, *Swartchewskia papyracea* и *Rezinkovia echinata* собирали с помощью легкого водолазного снаряжения на глубинах 5-25 м в 8 районах озера (рис. 1, 2, табл. 1) в ходе кругобайкальских научно-исследовательских экспедиций 2018-2021 гг. Образцы космополитных губок *Ephydatia muelleri* собирали на глубинах от 0,5 до 1,5 м, преимущественно под камнями в заливе Малое Море (курминские озера: бухта Хагден-Халэ) и соединенном протоке с Байкалом озере Ханхой, отделенном от Байкала узкой песчаной косой (рис. 1, 3, табл. 1) в ходе экспедиций 2019-2020 гг. Все образцы фиксировали сразу после сбора в 70% этаноле в индивидуальных пластиковых емкостях. Через 24 часа этанол заменяли на свежий для длительного хранения при -20°C . Видовую идентификацию проводили с помощью светового микроскопа по морфологическим признакам (внешний вид, форма и размер спикул), дополнительно для *E. muelleri* отмечали размер геммосклер.

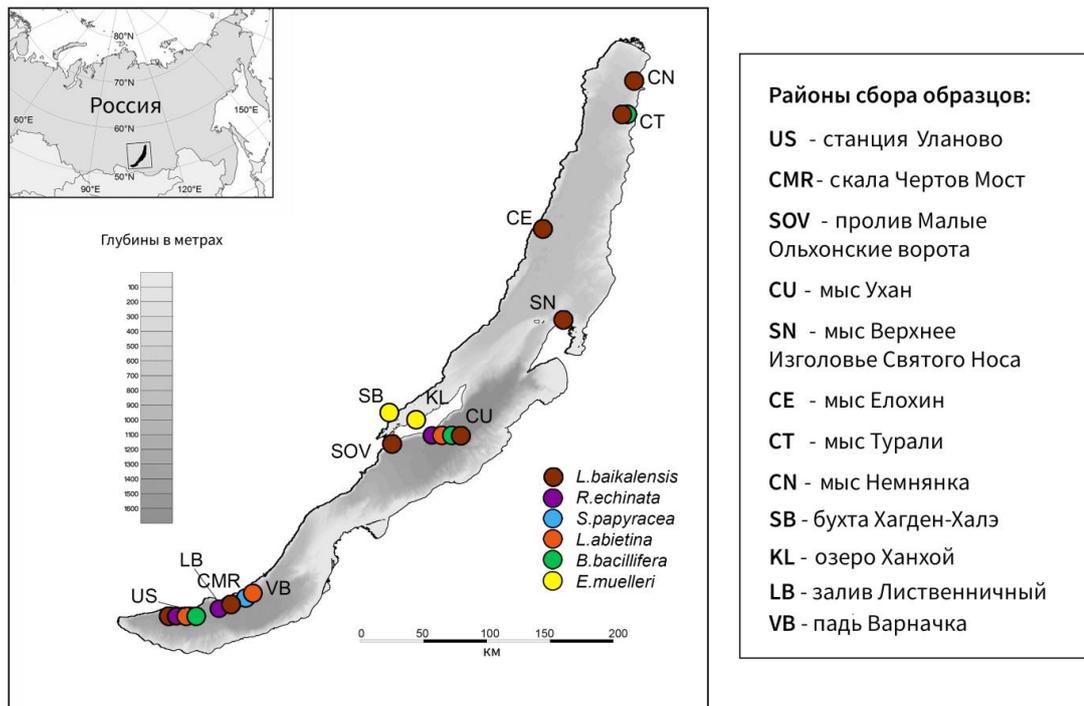


Рисунок 1. Карта-схема расположения районов отбора образцов в оз. Байкал, основанная на карте проекта INTAS 99-I 669.

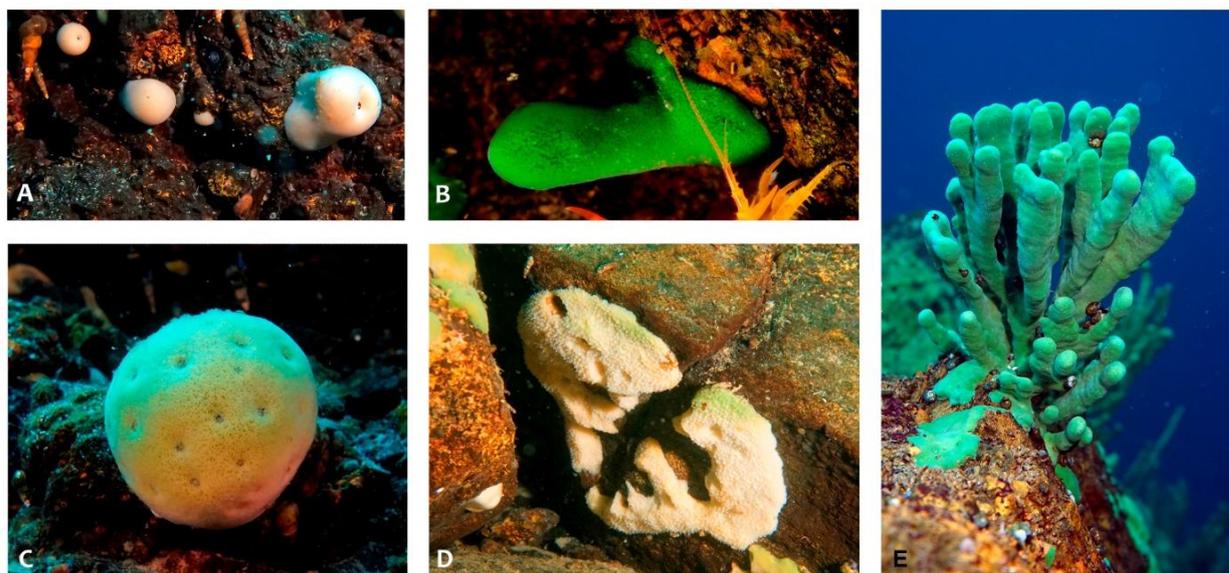


Рисунок 2. Внешний вид: А – *S. raryrusea*, В – *L. abietina*, С – *B. bacillifera*, D – *R. echinata*, Е – *L. baikalensis*, фото И. Ханаева и О. Каменской (Yakhnenko et al., 2024a,b).



Рисунок 3. Внешний вид губки рода *Ephydatia* из озера Ханхой (Yakhnenko, Itskovich, 2021).

Таблица 1. Районы сбора байкальских эндемичных и космополитных губок в озере Байкал

Вид	N	Место сбора	Код района	Координаты	Дата
<i>B. bacillifera</i>	5	Станция Уланово(<i>n</i> =1)	US	51°47'43.62"; 104°31'5.82"	01.06.2020
		Мыс Турали (<i>n</i> =1)	CT	55°17'22.51"; 109°45'27.53"	09.06.2021
		Мыс Ухан (<i>n</i> =3)	CU	53° 4'22.92"; 107°24'22.20"	10.06.2021
<i>L. abietina</i>	5	Станция Уланово(<i>n</i> =2)	US	51°47'43.62"; 104°31'5.82"	01.06.2020
		Падь Варначка (<i>n</i> =1)	VB	51°54'089"; 105°06'173"	31.05.2020
		Мыс Ухан (<i>n</i> =2)	CU	53° 4'22.92"; 107°24'22.20"	03.06.2020
<i>R. echinata</i>	5	Станция Уланово(<i>n</i> =3)	US	51°47'43.62"; 104°31'5.82"	01.06.2020
		Залив Лиственничный (<i>n</i> =1)	LB	51°51'513"; 104°50'378"	10.06.2020
		Мыс Ухан (<i>n</i> =1)	CU	53° 4'22.92"; 107°24'22.20"	03.06.2020
<i>S. papyracea</i>	5	Падь Варначка (<i>n</i> =5)	VB	51°54'089"; 105°06'173"	31.05.2020
<i>E. muelleri</i>	48	Озеро Ханхой (<i>n</i> =24)	KL	53°09'10,4"; 107°10'11.4"	04.11.2021
		Залив Малое Море (курминские озера: бухта Хагден-Халэ) (<i>n</i> =24)	SB	53°09'32.5"; 106°56'56.9"	05.11.2021
<i>L. baikalensis</i>	33	Станция Уланово	US	51°47'43.62"; 104°31'5.82"	01.06.2020
<i>L. baikalensis</i>	31	Чертов Мост	CMR	51°54'21.70"; 105°10'26.48"	07.06.2018
<i>L. baikalensis</i>	32	Пролив Ольхонские Ворота	SOV	53° 0'38.52"; 106°54'50,46"	31.05.2018
<i>L. baikalensis</i>	30	Мыс Ухан	CU	53° 4'22.92"; 107°24'22.20"	01.06.2018
<i>L. baikalensis</i>	30	Верхнее Изголовье Святого Носа	SN	53°54'42.93"; 109° 0'35.05"	07.06.2020
<i>L. baikalensis</i>	30	Мыс Елохин	CE	54°32'3.51"; 108°40'36.74"	02.06.2018
<i>L. baikalensis</i>	32	Мыс Турали	CT	55°17'22.51"; 109°45'27.53"	03.06.2018
<i>L. baikalensis</i>	33	Мыс Немнянка	CN	55°34'42.65"; 109°51'31.65"	05.06.2020

Примечание. N – количество образцов

Для определения разрешающей способности двух участков маркерного гена *COI* использовали коллекционные образцы байкальских эндемичных и космополитных губок, собранные в 2013-2017 годах (табл. 2).

Таблица 2. Места сбора космополитных и эндемичных пресноводных губок, использованных при изучении внутри- и межвидовой вариабельности гена *COI* среди губок семейств *Lubomirskiidae* и *Spongillidae*

Вид	Номер образца	Место сбора
<i>S. lacustris</i>	X1	Россия, Санкт-Петербург
<i>S. lacustris</i>	X4	Россия, Псковская область, р. Великая, участок между оз. Хвойно и оз. Черное
<i>S. lacustris</i>	X5	Россия, Псковская область, р. Великая, оз. Верято
<i>S. lacustris</i>	X6	Россия, Псковская область, р. Великая, под мостом после оз. Зверино
<i>S. lacustris</i>	X7	Россия, Московская область, Канал им. Москвы, напротив платформы 119 км
<i>S. lacustris</i>	X8	Россия, Дальний Восток, о. Сахалин, ручей, вытекающий из оз. Крестоножка
<i>S. lacustris</i>	X10	Россия, Якутия, р. Чуоналыр
<i>S. lacustris</i>	X14	Сербия, р. Савва
<i>S. alba</i>	X17	Япония, оз. Того, префектура Тоттори
<i>S. alba</i>	X18	Турция, Дальян
<i>S. alba</i>	X19	Турция, Дальян
<i>E. fluviatilis</i>	X33	Абхазия, Новый Афон
<i>L. baikalensis</i>	YA35	Россия, оз. Байкал, мыс Ухан
<i>L. baikalensis</i>	YA36	Россия, оз. Байкал, мыс Ухан
<i>L. baikalensis</i>	YA37	Россия, оз. Байкал, мыс Ухан
<i>L. baikalensis</i>	YA97	Россия, оз. Байкал, мыс Турали
<i>L. baikalensis</i>	YA98	Россия, оз. Байкал, мыс Турали
<i>L. baikalensis</i>	YA199	Россия, оз. Байкал, Чертов мост
<i>L. baikalensis</i>	YA200	Россия, оз. Байкал, Чертов мост
<i>L. baikalensis</i>	YA201	Россия, оз. Байкал, Чертов мост
<i>B. i. intermedia</i>	BS64, BS66, BS68, BS72, BS73, BS74	Россия, оз. Байкал, мыс Шунтэ-Правый
<i>B. martinsoni</i>	BS77	Россия, оз. Байкал, мыс Шунтэ- Правый
<i>B. intermedia</i>	BS105, BS103, BS117	Россия, оз. Байкал, Шумиха, в пяти милях к югу от мыса Толстый

Вид	Номер образца	Место сбора
<i>B. i. intermedia</i>	BS219	Россия, оз. Байкал, Баргузинский залив
<i>B. i. intermedia</i>	BS225	Россия, оз. Байкал, бухта Заворотная
<i>B. i. intermedia</i>	BS237	Россия, оз. Фролиха
<i>B. i. profundalis</i>	BS218	Россия, оз. Байкал, Баргузинский залив
<i>B. i. profundalis</i>	BS213	Россия, оз. Байкал, пролив Ольхонские Ворота
<i>B. i. profundalis</i>	BS223	Россия, оз. Байкал, бухта Заворотная
<i>B. i. profundalis</i>	BS82, BS86, BS89, BS83	Россия, оз. Байкал, мыс Ухан
<i>B. i. profundalis</i>	BS58	Россия, оз. Байкал, мыс Шунтэ- Правый
<i>B. martinsoni</i>	BS69	Россия, оз. Байкал, мыс Шунтэ- Правый
<i>B. martinsoni</i>	BS112, BS110	Россия, оз. Байкал, южная котловина
<i>B. martinsoni</i>	BS215	Россия, оз. Байкал, Баргузинский залив
<i>B. martinsoni</i>	BS71, BS60	Россия, оз. Байкал, мыс Шунтэ- Правый
<i>B. fungiformis</i>	BS92	Россия, оз. Байкал, мыс Ухан
<i>B. fungiformis</i>	BS120(1)	Россия, оз. Байкал, пос. Большие Коты
<i>B. fungiformis</i>	BS224	Россия, оз. Байкал, бухта Заворотная
<i>B. fungiformis</i>	BS109	Россия, оз. Байкал, Южный Байкал
<i>B. fungiformis</i>	BS63	Россия, оз. Байкал, мыс Шунтэ- Правый
<i>Sw. papyracea</i>	IK173	Россия, оз. Байкал, Ушканьи острова
<i>Sw. papyracea</i>	IK194, IK203, IK209, IK213	Россия, оз. Байкал, Верхнее изголовье п-ова Святой Нос
<i>Sw. papyracea</i>	IK406, IK407, IK408	Россия, оз. Байкал, р. Ледяная
<i>S. lacustris</i>	IK332, IK333, IK340	Россия, м. Мужинай, озеро с заболоченными участками
<i>S. lacustris</i>	IK447	Россия, оз. Байкал, мыс Арал (оз. Зама)
<i>B. bacillifera</i>	BK248	Россия, оз. Байкал, падь Варначка
<i>B. robusta</i>	BK384	Россия, оз. Байкал, ст. Клюевка

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

Амплификацию фрагментов гена *COI* и микросателлитных локусов осуществляли в амплификаторе PeltierThermalCycler (MJ Research, USA) с использованием ScreenMix-HS kit (Евроген). Амплификация микросателлитных маркеров оказалась наиболее эффективной по протоколу тачдаун ПЦР. Объем реакционной смеси для ПЦР составил 20 мкл при следующих условиях: начальная денатурация 2 мин при 94°C; следующие 11 циклов: денатурация 30 сек при 94°C, отжиг 30 сек при 65-55°C (снижение на один градус каждый цикл), элонгация 30 сек при 72°C; следующие 24 цикла: денатурация 30 сек при 94°C, отжиг 30 сек при 55°C, элонгация 30 сек при 72°C; финальная элонгация 8 мин при 72°C.

Для амплификации фрагментов гена *COI* объем реакционной смеси составил 20 мкл в следующем режиме: начальная денатурация (2 мин 94°C); 35 циклов, включающих: денатурацию ДНК (30 сек 94°C), отжиг праймеров (30 сек 50°C), элонгацию (45 сек 72°C); финальная элонгация (8 мин 72°C). Последовательности праймеров для микросателлитных маркеров указаны в таблицах 3, 7, 11, 13. Фрагменты гена *COI* амплифицировали с помощью праймеров LCO1490 и HC02198 (Folmer et al., 1994) (5'-концевой фрагмент) и праймеров CO1F4 и CO1R4 (Raleigh et al., 2007) (фрагмент *I3-M11*).

Продукты реакции анализировали с помощью горизонтального гель-электрофореза. Для микросателлитных маркеров использовали 2% агарозный гель, для двух фрагментов гена *COI* – 0,8% агарозный гель. Ампликоны окрашивали с помощью бромистого этидия и красителя SYBR Green dye. Размер полученных фрагментов оценивали с помощью маркера молекулярного веса (Евроген). Фрагменты гена *COI* вырезали из геля и очищали методом замораживания-оттаивания (Thuring et al., 1975), затем секвенировали с помощью секвенатора ABI 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Для определения точного размера фрагмента для

ампликонов микросателлитных маркеров применяли фрагментный анализ с помощью ABI 3130xl Genetic Analyzer без дополнительной очистки. В качестве размерного стандарта использовали стандарт Syntol-450 (Синтол, Москва). Секвенирование и фрагментный анализ образцов проводили на базе «Синтол» (Москва, Россия). Генотипирование по результатам фрагментного анализа осуществляли с помощью программы GenMarker 3.01 (Hulce et al., 2011). Образцы, неоднозначно генотипированные с помощью фрагментного анализа, клонировали и секвенировали. Данные секвенирования анализировали с помощью программ BioEdit 7.0 (Hall, 1999) и Mega 5.0 (Tamura et al., 2011).

2.4 Разработка микросателлитных маркеров

Поиск микросателлитных локусов в черновом варианте генома *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 хромосомного уровня *E. muelleri* (Kenny et al., 2020) осуществляли с помощью программы BLASTn из программного пакета BLAST+ (Camacho et al., 2009) со следующими настройками: -word_size 30 -gapopen 2 -evalue 0,1 -reward 1 -penalty -2 -gapextend 3. Выходные данные сохраняли в виде таблицы, которую далее анализировали с помощью стандартных средств на языке программирования R. Праймеры для микросателлитных локусов подбирали с помощью сервиса Primer BLAST NCBI (Ye et al., 2012). Все пары праймеров конструировали со следующими условиями: отклонение температуры отжига не более одного градуса от 60°C, GC состав от 40 до 60%, отсутствие совпадений с имеющимися в базах данных NCBI генами симбионтов губок. Пары праймеров синтезировали в ООО «Синтол» (Москва). Прямые праймеры снабжали флуоресцентной меткой (FAM, ROX, R6G, TAMRA). Позицию каждого локуса анализировали с помощью геномного браузера (Kenny et al., 2020). С помощью программного пакета LocalBLAST (Camacho et al., 2009) проводили 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). Выравнивание и анализ извлеченных последовательностей проводили с помощью программного обеспечения 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 с помощью программы IQ-TREE 1.6.12 (Minh et al., 2020) с применением наиболее подходящей модели НКУ+I (рис. 4). 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), с доверительным интервалом 99% и последующей коррекцией с помощью поправки Бонферрони. Анализ показателей разнообразия микросателлитных локусов (N_a (среднее), N_e (среднее), I (среднее), H_o (среднее), uNe (среднее), Fis , Fit , $Icoef$, F (среднее),

Phwe) 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. Пропорции различий наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности в каждой группе по всем локусам для *L. baikalensis* визуализировали в виде тепловой карты в пакете gplots для языка программирования R с кластеризацией строк и столбцов (евклидовы дистанции, метод кластеризации «average»).

Популяционную структуру оценивали с помощью Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), первые 250000 циклов исключали из анализа, далее использовали 1000000 повторений MCMC. Применяли модель смешения с начальным значением ALPHA = 1,0, с одинаковым ALPHA для всех популяций. С помощью 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). Оценку достоверности значений F_{ST} проводили с помощью бутстреп анализа (1000 реплик). Расчеты выполняли в программе Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier, Lischer, 2010). Иерархическую кластеризацию методом «average» проводили стандартными средствами языка программирования R на основе матрицы попарных значений F_{ST} для сравнения районов отбора образцов.

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 для оценки применимости модели

изоляции расстоянием как механизма формирования генетического разнообразия *L. baikalensis*. При анализе использовали три модели географических дистанций (рис. 15): 1) кратчайшее расстояние между точками отбора проб по прямой; 2) кратчайшее расстояние между точками по изобате глубины распространения вида вдоль берега; 3) расстояние между точками по изобате глубины распространения вида вдоль берега с учетом направления постоянных циркуляционных течений, способствующих переносу личинок. 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. При расчете P-value в AMOVA задавали 1000 пермутаций. Выделяемые кластеры считали устойчивыми при AMOVA $P\text{-value} \leq 0,05$. Анализ главных координат выполняли с помощью 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) (прил. 2). Ультраметрические филогенетические деревья для generalized skyline plot реконструировали методом UPGMA на основе матриц дистанций Бруво (Bruvo et al., 2004). Доверительный интервал для кривых истории изменения эффективного размера популяций оценивали по бутстреп методу с

помощью алгоритма: 1) средствами пакета «Poppr» 2.9.3 (Kamvar et al., 2014) создавали 5000 бутстреп реплик исходного набора микросателлитных данных; 2) для каждой бутстреп реплики рассчитывали матрицу дистанций Бруво; 3) по каждой матрице в пакете «ape» 5.7 (Paradis et al., 2004) реконструировали UPGMA филогенетическое древо и строили кривые (5000); 4) в каждый момент времени (в единицах дистанций Бруво) по бутстреп репликам кривых *generalized skyline plot* находили средние значения и границы 95% доверительного интервала для эффективной численности популяции (алгоритм визуализирован в виде блок-схемы в прил. 2). 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* (табл. 2) (Yakhnenko, Itskovich, 2020a). На древе, построенном методом ML по полученным последовательностям в отдельные клады с высокими уровнями бутстреп поддержки (>90%) распределяются образцы *S. alba* и *S. lacustris* в соответствии с видовой идентификацией по морфологическим критериям, при этом один из образцов *S. lacustris* образует отдельную ветвь. В отдельную кладу с высоким уровнем бутстреп и aLRT поддержек (>95%) группируются образцы, принадлежащие ко всем родам *Lubomirskiidae* и роду *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, древо подтверждает, 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 переменных микросателлитных маркеров.

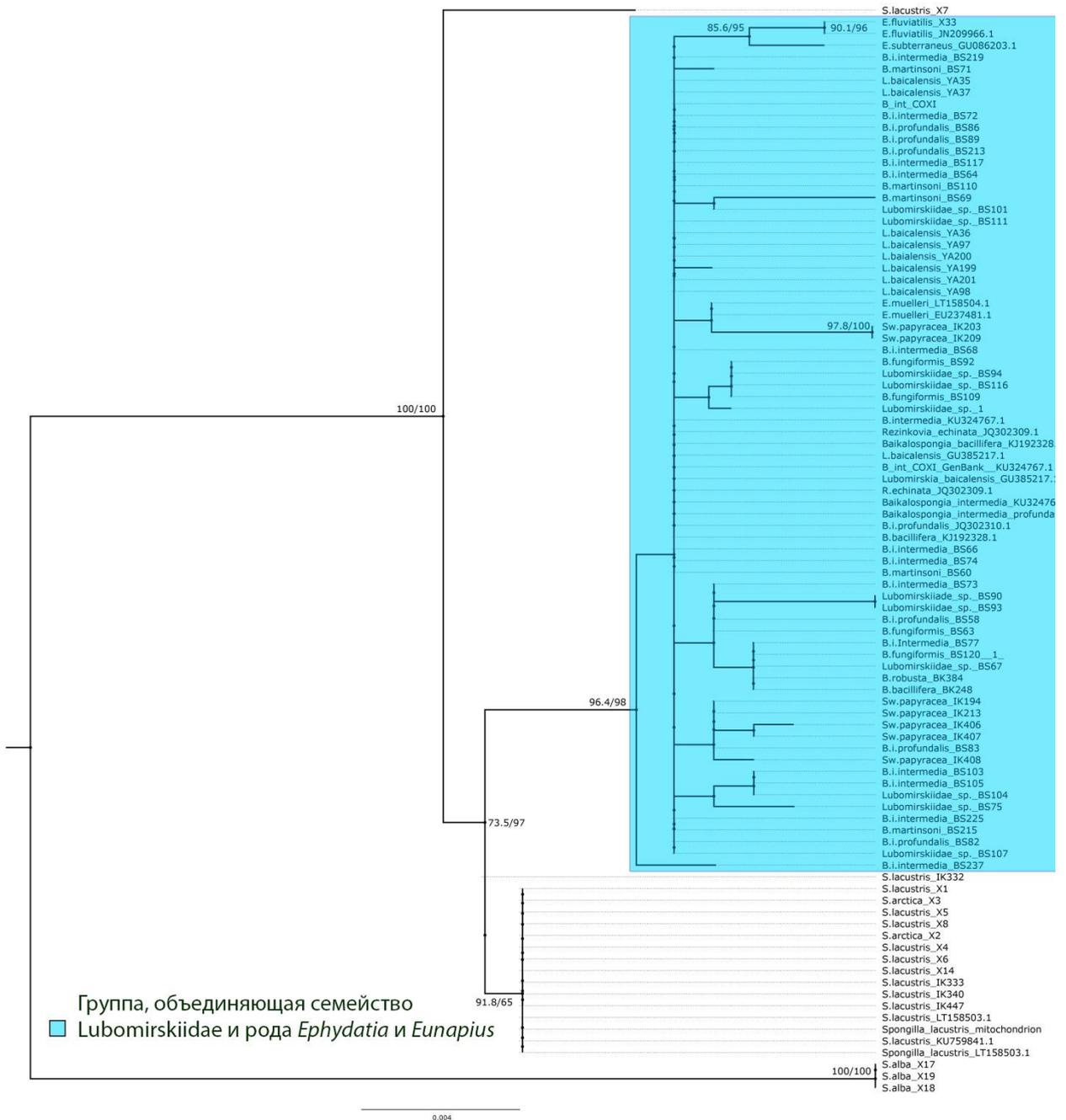


Рисунок 4. Филогенетическое древо, основанное на последовательностях, объединенных стандартного 5'-концевого фрагмента и фрагмента *I3-M11* гена *COI*, построенное методом ML. В узлах указаны бутстреп поддержки и aLRT поддержки >90 не менее, чем по одному из критериев.

3.2 Разработка наборов универсальных и видоспецифичных микросателлитных маркеров для близкородственных видов губок

Ранее для беспозвоночных животных был показан высокий уровень кросс-видовой специфичности микросателлитов (Barbará et al., 2007). Их использование дает возможность не только проводить популяционно-генетические исследования, но и сравнивать близкородственные таксоны при изучении механизмов видообразования (Noor, Feder, 2006).

3.2.1 Тестирование кросс-видовой специфичности микросателлитных маркеров

В геномах *E.muelleri* и *L.baikalensis* был выявлен ряд совпадений с фланкирующими участками микросателлитных маркеров Efl3 – Efl22, опубликованных ранее для *E.fluviatilis* (Anderson et al., 2010) (табл. 3).

Таблица 3. Флуоресцентные метки для праймеров и тип повтора для микросателлитных маркеров *E.fluviatilis* (Anderson et al., 2010)

№ доступа GenBank NCBI	Локус	Фл. метка	Тип повтора
FJ752588	Efl-3	FAM	(CA)9
GQ476799	Efl-4	R6G	(CA)22
FJ752589	Efl-5	TAMRA	(ATT)8
FJ752590	Efl-7	FAM	(TGT)5
FJ752591	Efl-9	R6G	(TATG)4 (TG)15 C(GT)11
FJ752592	Efl-10	TAMRA	[(GAAT)4 (GAA)2TT]2(GATT)5
FJ752593	Efl-12	FAM	(CA)8T(CA)3
FJ752594	Efl-14	R6G	(TG)13
FJ752595	Efl-17	TAMRA	(CA)5TGCG(CA)8TGTG(CA)6TGCG (CA)6
GQ476801	Efl-20	FAM	[(CA)2/4/6T]4CTA(CA)4A4(CA)2TCAATA(CA)3TAT(CA)3
GQ476800	Efl-22	R6G	(TG)23(AG)4 (TG)8

Для *E. muelleri* покрытие опубликованного генома в 1490 раз (Kenny et al., 2020) позволяет оценить представленность и консервативность микросателлитных маркеров Efl3-Efl22 с помощью биоинформатического анализа. Для 7 маркеров из 11 (табл. 5) были выявлены совпадения во фланкирующих участках. Из них 5 имели микросателлитные последовательности. Два маркера имели множественные совпадения в разных участках генома.

Таблица 5. Совпадения, найденные в геноме *E. muelleri* для микросателлитных маркеров Efl3 – Efl22 (Anderson et al., 2010, Yakhnenko, Itskovich, 2020b)

				Координаты последовательности в геноме <i>E. muelleri</i> [Kenny и др., 2020]		
Локус	Выравнивание во флакирующем районе	Присутствие микросателлитной последовательности	Число выявленных копий	Название скаффолда	Начало последовательности, п.н.	Окончание последовательности, п.н.
Efl-3	+	+	1	Scaffold 0005	13008353	13008032
Efl-4	+	+	1	Scaffold 0006	8489737	8489969
Efl-5	+	-	4	Scaffold 0590	24234	24672
				Scaffold 0022	739868	740297
				Scaffold 0431	21422	21075
				Scaffold 0019	333069	332719
Efl-7	Низкое качество выравнивания	-	1	Scaffold 0015	4326639	4327264
Efl-9	+	+	1	Scaffold 0014	6568680	6568945
Efl-10	+	+	1	Scaffold 110	11587	11767
Efl-12	-	-	-	-	-	-
Efl-14	-	-	-	-	-	-
Efl-17	+	+	2	Scaffold 0366	10252	10568
				Scaffold 0006	12667029	12667346
Efl-20	-	-	-	-	-	-
Efl-22	-	-	-	-	-	-

Для *L. baikalensis* опубликованный геном (Kenny et al., 2019) собран на уровне контигов, в связи с чем, биоинформатический анализ кросс-видовой специфичности набора микросателлитных маркеров для *E. fluviatilis*, был дополнен стандартными лабораторными методами (амплификация маркеров с образцами *L. baikalensis*, проверка успешности амплификации с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, фрагментный анализ и генотипирование). При анализе генома *L. baikalensis* совпадения были выявлены для 7 маркеров (табл. 4), для двух из них - множественные совпадения в разных участках генома. Амплификацию проводили на трех

образцах *L. baikalensis* со всеми 11 маркерами. Специфичные продукты амплификации были получены только для маркеров Efl7 и Efl20 (табл. 4). Также был проведен анализ совпадений праймерных последовательностей *E. fluviatilis* с аналогичными участками в геномах *L. baikalensis* и *E. muelleri* (табл. 6). По результатам анализа выявлено, что пары праймеров, опубликованные для микросателлитных маркеров для *E. fluviatilis* (Efl3-Efl22) не подходят для специфической амплификации маркеров для видов *L. baikalensis* и *E. muelleri*, так как участки генома, содержащие праймерные последовательности, содержат большое количество замен (табл. 6).

На уровне генома кросс-специфичными по отношению к *L. baikalensis* являются маркеры Efl3, Efl4, Efl9, Efl17, Efl20 – 45,5% от общего числа протестированных маркеров и для *E. muelleri* – Efl3, Efl4, Efl9, Efl10, Efl17 – 45,5%. Полученные значения на 10% ниже среднего значения кросс-специфичных полиморфных микросателлитных маркеров для беспозвоночных (Barbará et al., 2007). Несмотря на наличие микросателлитов и совпадений во фланкирующих районах указанных локусов, все они требуют разработки новых специфичных пар праймеров (табл. 6). В геномах *E. muelleri* и *L. baikalensis* выявлены значительные отличия фланкирующих участков маркеров Efl3 и Efl4. Маркеры Efl9, Efl10, Efl17 и Efl20 содержат несовершенные повторы, что может вести к ошибочному определению аллелей.

Таким образом, набор микросателлитных маркеров, специфичный для *E. fluviatilis* (Lucentini et al., 2013; Li, et al., 2018), не подходит для популяционно-генетических исследований *E. muelleri* и *L. baikalensis*. Поэтому, более перспективной является разработка микросателлитных маркеров *de novo* на основе геномных данных этих видов.

3.2.2 Разработка наборов микросателлитных маркеров *de novo* для представителей Spongillidae и Lubomirskiidae

В анализ были взяты две единственные полногеномные сборки для Lubomirskiidae и Spongillidae (Kenny et al., 2019, 2020). С помощью сервисов SSRome (Mokhtar, Atia, 2019) и The Galaxy platform (Afgan et al., 2018) в геноме *L. baikalensis* (Kenny et al., 2019) выявили 75109 микросателлитных локусов. Совершенные микросателлиты с длиной повтора от 2 до 5 п.н. и количеством повторов от 9 до 17 были отфильтрованы для последующего анализа в количестве 6900. Учитывая присутствие последовательностей эукариотических эндосимбионтов губок в геноме *L. baikalensis*, подтверждение принадлежности отобранных локусов именно губке осуществляли с помощью поиска совпадений с геномом близкородственной *E. muelleri*. Для этого микросателлитные последовательности с фланкирующими районами длиной по 200 нуклеотидов с каждой стороны были выравнены на геном *E. muelleri*, не содержащий симбиотических последовательностей. В дальнейший анализ были взяты 47 последовательностей, имеющих совпадения с геномом *E. muelleri*.

3.2.2.1 Тестирование двух подходов для наиболее эффективной разработки микросателлитных маркеров для *Lubomirskia baikalensis*

В первом случае, из последовательностей, имевших совпадения в геноме *E. muelleri*, случайным образом были выбраны 19, для которых были разработаны пары праймеров с помощью Primer BLAST. Во втором случае, из локусов, имевших длину выравнивания более 300 нуклеотидов с геномом *E. muelleri*, и имевших микросателлитные последовательности в обоих геномах, были выбраны 28 локусов, для которых также были подобраны праймеры. Таким образом, всего протестировали 47 микросателлитных локусов 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, дающих стабильную амплификацию для популяционно-генетических исследований *L. baikalensis* (табл. 7, 8).

Таблица 7. Пары праймеров для набора микросателлитных локусов для *L. baikalensis* (Yakhnenko et al., 2024a)

Локус	Прямой праймер 3' - 5'	Обратный праймер 3' - 5'	Метка	Tm (°C)
<i>Lba_23</i>	tcctgcaataccttcaagttgc	aaggaggtgcatccggttg	R6G	59,9
<i>Lba_em_76</i>	atcctcatggcctctgaagc	atgcagatgcaggtgggtg	Fam	59,9
<i>Lba_em_200</i>	aggacttggcagtagcattgagag	ctccaatcaggataaccacacctac	Tamra	60,3
<i>Lba_em_217</i>	gtgtcatggaagaccaatgagc	ccttcaggcaggacatcaatact	Fam	59,9
<i>Lba_em_19</i>	cggagatatgcactggacatga	caaaggaatgctatctgagcgtc	Rox	59,8
<i>Lba_17</i>	tcctctccacgcgacattc	tgtgctggaggagagatgtg	Fam	59,9
<i>Lba_em_280</i>	tttctggctcaccaggtac	gacaggatagatgtgcgttggga	R6G	60,2
<i>Lba_em_367</i>	ccactgttcttgccagaca	ccagagggtgtcaggattgag	Rox	59,9
<i>Lba_em_158</i>	cacatgggagcatacgtcga	atacggtgtcctccggtg	R6G	59,5
<i>Lba_19</i>	aatagctggaggcagtggtc	gctggagttgctaacagtgaag	R6G	59,8

251 образец *L. baikalensis* из 8 районов озера Байкал был проанализирован по 10 микросателлитным локусам. Определены характеристики набора микросателлитных локусов (табл. 8, 9). Среди 10 локусов наиболее полиморфным оказался локус *Lba_17* – N_a mean (10,38), N_e (5,86), H_e (0,83), а наименее полиморфными – локусы *Lba_em158* – N_a mean (3,17), N_e (1,48), H_e (0,33), *Lba_em200* N_a (2,88), N_e (2,04), H_e (0,50).

Таблица 8. Координаты и описание набора микросателлитных локусов для *L. baikalensis* (Yakhnenko et al., 2024a)

Локус	Тип повтора	Вариабельность длины	Na***	Координаты локуса в геноме <i>L.baikalensis</i> (Kenny et al., 2019)	Начало*	Конец**
<i>Lba_17</i>	(GT)10	316-354	19	NODE_522_length_18357_cov_22.1729	10537	10864
<i>Lba_19</i>	(AC)16	358-374	9	NODE_6513_length_4794_cov_17.297	1801	2165
<i>Lba_em_217</i>	(AC)9	372-380	5	NODE_2402_length_8566_cov_17.7514	6613	6985
<i>Lba_23</i>	(TG)11(AG)3	271-293	11	NODE_8491_length_4024_cov_19.7451	989	1269
<i>Lba_em_158</i>	(GT)10	279-291	6	NODE_1277_length_11900_cov_71.522	9075	9358
<i>Lba_em_19</i>	(GT)13	236-268	17	NODE_74_length_42891_cov_24.7432	14005	14259
<i>Lba_em_200</i>	(CA)9	226-236	6	NODE_74698_length_781_cov_12.9787	291	517
<i>Lba_em_280</i>	(TG)10	371-397	13	NODE_1378_length_11483_cov_16.6858	2292	2667
<i>Lba_em_367</i>	(AC)14	281-321	14	NODE_3939_length_6447_cov_21.6218	2840	3141
<i>Lba_em_76</i>	(AC)11	240-250	5	NODE_9404_length_3766_cov_15.5544	2730	2977

Примечание. *Начало – начало последовательности микросателлитного локуса вместе с фланкирующими районами в геноме *L. baikalensis*; **Конец – конец последовательности микросателлитного локуса вместе с фланкирующими районами в геноме *L. baikalensis*; ***Na – число аллелей, выявленное при анализе 251 образца *L. baikalensis*.

Таблица 9. Основные параметры генетического разнообразия микросателлитных локусов для *L. baikalensis* (Yakhnenko et al., 2024a)

Локус	Na (mean)	Ne (mean)	I (mean)	Ho (mean)	He (mean)	Fis	Phwe
<i>Lba_17</i>	10,38	5,86	1,96	0,81	0,83	0,01	0,39
<i>Lba_em_19</i>	7,13	4,12	1,58	0,74	0,76	0,01	0,20
<i>Lba_19</i>	4,25	2,57	1,08	0,51	0,59	0,12	0,33
<i>Lba_23</i>	7,13	4,31	1,62	0,76	0,77	-0,01	0,51
<i>Lba_em_76</i>	3,88	2,47	0,99	0,60	0,54	-0,12	0,48
<i>Lba_em_158</i>	3,17	1,48	0,45	0,30	0,33	0,07	0,50
<i>Lba_em_200</i>	2,88	2,04	0,78	0,49	0,50	0,00	0,63
<i>Lba_em_217</i>	3,63	2,40	0,96	0,54	0,54	0,00	0,63
<i>Lba_em_280</i>	5,13	2,15	0,92	0,44	0,47	0,06	0,66
<i>Lba_em_367</i>	5,88	2,64	1,15	0,54	0,57	0,04	0,60

Примечание. Na – число аллелей, Ne – число эффективных аллелей, I – информационный индекс Шеннона, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, Fis – коэффициент инбридинга среди особей, Phwe – значение P-value для теста на равновесие Харди-Вайнберга.

Тест на сцепленность оказался положительным для ряда локусов. Для определения наличия физических причин полученных результатов фланкирующие районы всех 10 микросателлитных локусов были выравнены на геном *E. muelleri* – близкого родственного вида Spongillidae (Kenny et al., 2020). Основываясь на высококачественной геномной сборке *E. muelleri* на уровне хромосом, можно предположить, что все локусы, кроме *Lba_17* и *Lba_em_217* находятся в разных хромосомах, поскольку геном *L. baikalensis* на данный момент опубликован только в виде контигов, за основу можно взять только геном родственного вида *E. muelleri*. Так как локусы оказались предположительно не связаны друг с другом физически, наличие сцепленности не повлияет на анализ генетического разнообразия (Winans et al., 2018).

Ранее были опубликованы только наборы для нескольких видов космополитных пресноводных (Anderson et al., 2010; Yakhnenko, Itskovich, 2021) и морских губок (Duran et al., 2002; Blanquer et al., 2005; Noyer et al., 2009; Giles et al., 2013; Taboada et al., 2015). Набор из 10 микросателлитных локусов стал первым для представителей эндемичного семейства

Lubomirskiidae. С его помощью изучена пространственно-генетическая структура популяций *L. baikalensis*, а именно, равновесие Харди-Вайнберга, генетическая дифференциация, демографическая история и паттерны миграции. Разработанный набор микросателлитных маркеров является достаточно информативным и может быть использован для дальнейших популяционно-генетических исследований эндемичных губок озера Байкал.

3.2.2.2 Разработка микросателлитных маркеров для *Ephydatia muelleri*

Для выбора микросателлитных локусов, подходящих для популяционно-генетического анализа *E. muelleri*, 28 кандидатных локусов, найденных в геномах *L. baikalensis* и *E. muelleri*, были амплифицированы на пяти образцах *E. muelleri*. Среди выбранных локусов 11 из 28 имели стабильную специфичную амплификацию, интерпретируемые пики на электрофореграмме и были вариабельны. Они были протестированы на дополнительных 48 образцах *E. muelleri* из двух районов озера Байкал. Четыре локуса были исключены из набора в связи с большим числом нуль-аллелей, частичной неспецифичной амплификацией или мономорфностью в большинстве образцов ДНК. Таким образом, был составлен набор из 7 локусов для популяционно-генетического анализа *E. muelleri* (табл. 10, 11).

Таблица 10. Координаты и описание набора микросателлитных локусов для *E. muelleri* (Yakhnenko, Itskovich, 2021)

Локус	Но скаффолда*	Начало**	Конец***	Длина последовательности	Тип повтора
<i>Emu_187</i>	scaffold_0016	868299	867998	302	(CA)18
<i>Emu_217</i>	scaffold_0018	7273471	7273864	394	(AC)9
<i>Emu_249</i>	scaffold_0019	1810514	1810717	204	(CA)13
<i>Emu_266</i>	scaffold_0019	6087901	6087619	283	(TGG)7
<i>Emu_291</i>	scaffold_0020	6431917	6432205	289	(TG)9
<i>Emu_367</i>	scaffold_0023	2188522	2188841	320	(AC)23
<i>Emu_369</i>	scaffold_0023	541061	540749	313	(GT)27

Примечание. *В геноме *E. muelleri* (Kenny et al., 2020); **Начало – начало последовательности микросателлитного локуса вместе с фланкирующими районами в геноме *L. baikalensis*; ***Конец – конец последовательности микросателлитного локуса вместе с фланкирующими районами в геноме *L. baikalensis*.

Таблица 11. Пары праймеров для набора микросателлитных маркеров для *E. muelleri* (Yakhnenko, Itskovich, 2021)

Локус	Прямой праймер 3' - 5'	Обратный праймер 3' - 5'	Tm (°C)	Метка
<i>Emu_187</i>	agcacagcatagcaacgattg	atgtggacttcaggcacctg	59-61	Fam
<i>Emu_217</i>	gtgtcatggaagaccaatgagc	ccttcaggcaggacatcaatact	59-61	Fam
<i>Emu_249</i>	catctctggtgaagtacacaggtg	cagagtgtccagctgct	59-61	Fam
<i>Emu_266</i>	gcctgtggtgtaaacagtgg	ccaagcgtcccagctaagag	59-61	Fam
<i>Emu_291</i>	acgtacctcaaacaccgtagtac	cccggctgtctgtaagtcac	59-61	Tamra
<i>Emu_367</i>	ccactgttccttgccagaca	ccagagggtgtcaggattgag	59-61	Rox
<i>Emu_369</i>	acaagggtagttaggaggcag	gagtactaggaggatgaaccagtg	59-61	Rox

Для *E. muelleri* количество аллелей на локус варьирует от трех до 8. Среди 7 локусов наиболее полиморфным оказался *Lba_em369* – Na(8), Ne(4,722), He(0,788), а наименее – *Lba_em291* – Na(3), Ne(2,799), He(0,643), *Lba_em266* – Na(3), Ne(2,416), He(0,586). Все исследованные локусы находятся в равновесии Харди-Вайнберга (табл. 12).

Таблица 12. Основные параметры вариабельности микросателлитных маркеров внутри *Ephydatia muelleri* (n=24)

Локус	N	Na	Ne	I	Ho	He	F	G-W	Диапазон аллелей	Phwe
<i>Lba_em187</i>	15	4	2,143	0,972	0,556	0,601	0,125	0,267	14	ns
<i>Lba_em217</i>	22	3	2,156	0,976	0,25	0,236	0,152	0,2	14	ns
<i>Lba_em249</i>	24	5	3,646	1,451	0,692	0,646	0,081	0,238	20	ns
<i>Lba_em291</i>	23	3	2,799	1,061	0,75	0,649	-0,082	0,231	12	ns
<i>Lba_em367</i>	21	5	2,864	1,399	0,364	0,407	0,049	0,122	40	ns
<i>Lba_em369</i>	22	8	4,722	1,751	0,909	0,844	-0,038	0,163	48	ns
<i>Lba_em266</i>	23	3	2,416	0,986	0,538	0,526	-0,113	0,429	6	ns
Mean	21,429	5,143	2,963	1,228	0,580	0,558	0,025	0,236	22	ns

Примечание. N – число образцов, Na – число аллелей, Ne – число эффективных аллелей, I – информационный индекс Шеннона, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации, G-W – индекс Гарза-Вильямсона, Phwe – значение P-value для теста на равновесие Харди-Вайнберга.

Значение индекса Гарза-Вильямсона (G-W) менее 0,68, что указывает на сокращение эффективного размера популяций в недавнем прошлом. Расположение локусов определяли в аннотированном геноме *E. muelleri* (Kenny et al., 2020). Все 7 локусов частично или полностью находятся в кодирующих участках генома. Микросателлиты, имеющие такое

расположение, оказались более перспективными при разработке универсальных маркеров для представителей разных семейств.

3.2.2.3 Определение уровня межвидовой специфичности микросателлитных маркеров внутри семейства Lubomirskiidae

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*). Успешно амплифицированы 24 локуса из 28 для всех 20 образцов. По результатам фрагментного анализа были выбраны наборы маркеров для каждого вида, которые имели интерпретируемые пики на электрофореграмме и были переменными. Были составлены наборы универсальных маркеров для всех четырех видов байкальских эндемичных губок и для сравнительного анализа представителей Lubomirskiidae и Spongillidae (табл. 13). Набор универсальных локусов для анализа межвидовых взаимоотношений Lubomirskiidae содержит 10 локусов (табл. 13), 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* (табл. 13). Расположение микросателлитных локусов, вошедших в наборы маркеров для анализа межвидовых взаимодействий, в геноме *E. muelleri* (табл. 14) охватывает 11 скаффолдов, что соответствует 11 хромосомам.

Таблица 13. Последовательность праймеров и основные параметры микросателлитных локусов, состав наборов микросателлитных маркеров для разных видов

Локус	Последовательность праймеров	Tm	Длина последовательности	Тип повтора	Виды, для которых подходят локусы		
					Четыре вида Lubomirskiidae	<i>E.muelleri</i>	<i>E.muelleri</i> , <i>L.abietina</i> , <i>R.echinata</i>
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>10_lba_em</i>	Fw 5'-gtgtctcgaacggatctgagt Rev 5'-gctatatctggcgatgtacga	59-61	362	(TGG)7	+	-	-
<i>19_lba_em</i>	Fw 5'-cggagatatgactggacatga* Rev 5'-caaaggaatgctatctgagcgtc	59,8	261	(TG)13	-	-	-
<i>75_lba_em</i>	Fw 5'-catccaattgcacgatctcgag Rev 5'-aaccaagcatggagtgggtgac	59-61	255	(TG)13	-	-	-
<i>76_lba_em</i>	Fw 5'-atcctcatggcctctgaagc* Rev 5'-atgcagatgcaggtgggtg	59,9	257	(AC)9	+	-	-
<i>124_lba_em</i>	Fw 5'-actgcactcaggctcaag** Rev 5'-ttatcctcagcgagaacgtagtc	59-61	197	(ACC)5	+	+	-
<i>158_lba_em</i>	Fw 5'-cacatgggagcatacgtcga* Rev 5'-atcgggtgtcctccggtg	59,5	301	(AC)13	+	-	-
<i>187_lba_em</i>	Fw 5'-agcacagcatagcaacgattg** Rev 5'-atgtggacttcaggcacctg	59-61	302	(TG)18	-	+	+
<i>217_lba_em</i>	Fw 5'-gtgtcatggaagaccaatgagc* Rev 5'-ccttcaggcaggacatcaatact	59,9	394	(AC)9	+	+	+
<i>222_lba_em</i>	Fw 5'-ttgtatgactagcgtcgaacc Rev 5'-tctcactgggcctgaagttg	59-61	204	(TG)11	-	-	-

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8
241_lba_em	Fw 5'-gctcactactccaacccgac** Rev 5'-caaagcatggcgtgtgtgt	59-61	318	(CT)14	-	-	-
249_lba_em	Fw 5'-catctctggggaagtacacaggtg** Rev 5'-cagagtgtccagctgct	59-61	204	(AC)13	-	+	+
257_lba_em	Fw 5'-gagtccgtcctcctgttcac** Rev 5'-tgccagcagaggatagcattc	59-61	295	(CG)6(CA))21	+	-	-
260_lba_em	Fw 5'-ccttctccacaatggctt** Rev 5'-accttgaccagattactccaac	59-61	278	(AC)28	+	-	-
266_lba_em	Fw 5'-gcctgtggtgtaaacagtgg** Rev 5'-ccaagcgtcccagctaagag	59-61	283	(CCA)7	-	+	-
280_lba_em	Fw 5'-tttgctggctcaccaggtac* Rev 5'-gacaggatagatgtgcgttgga	60,2	395	(GT)16	-	-	-
291_lba_em	Fw 5'-acgtacctcaaacaccgtagtac** Rev 5'-cccggctgtctgtaagtcatt	59-61	289	(TG)9	+	+	+
315_lba_em	Fw 5'-cctaggaccagggccactat Rev 5'-gacagcaagatccgagtgagg	59-61	246	(CCT)10	+	-	-
367_lba_em	Fw 5'-cactgttcttgccagaca* Rev 5'-ccagagggtgtcaggattgag	59,9	320	(AC)23	-	+	+
369_lba_em	Fw 5'-acaagggtagttaggaggcag Rev 5'- gagtactaggaggatgaaccagtg	59-61	313	(AC)27	-	+	+
414_lba_em	Fw 5'-agagggtgcacgagtatcca Rev 5'-gcattcttattagagcccacttgg	59-61	271	(TG)11	+	-	-

Таблица 14. Положение изучаемых микросателлитных маркеров в геноме *E. muelleri*

Локус	Координаты в геноме <i>E. muelleri</i> (Kenny et al., 2020)		
	№ скаффолда	Начало последовательности	Конец последовательности
<i>10_lba_em</i>	scaffold_0001	11468831	11469193
<i>19_lba_em</i>	scaffold_0003	12128856	12129117
<i>75_lba_em</i>	scaffold_0009	9547070	9547325
<i>76_lba_em</i>	scaffold_0009	10499031	10499288
<i>124_lba_em</i>	scaffold_0012	8003132	8003329
<i>158_lba_em</i>	scaffold_0015	312801	313102
<i>187_lba_em</i>	scaffold_0016	867998	868300
<i>217_lba_em</i>	scaffold_0018	7273471	7273865
<i>222_lba_em</i>	scaffold_0018	1045639	1045843
<i>241_lba_em</i>	scaffold_0019	1357021	1357339
<i>249_lba_em</i>	scaffold_0019	1810514	1810718
<i>257_lba_em</i>	scaffold_0019	1386901	1387196
<i>260_lba_em</i>	scaffold_0019	1043658	1043936
<i>266_lba_em</i>	scaffold_0019	6087619	6087902
<i>280_lba_em</i>	scaffold_0020	465176	465571
<i>291_lba_em</i>	scaffold_0020	6431917	6432206
<i>315_lba_em</i>	scaffold_0021	7369384	7369630
<i>367_lba_em</i>	scaffold_0023	2188522	2188842
<i>369_lba_em</i>	scaffold_0023	540749	541062
<i>414_lba_em</i>	scaffold_0006	10819147	10819418

Локусы *280_lba_em* и *75_lba_em* оказались специфичными и вариабельными для всех четырех видов, однако не вошли в набор для анализа межвидовых взаимодействий Lubomirskiidae, поскольку длина фрагментов между некоторыми видами отличается на нечетное число нуклеотидов, что может быть связано с вставкой или делецией нечетного количества нуклеотидов во фланкирующем регионе (табл. 15). Для *E. muelleri*, *R. echinata* и *L. abietina* шесть локусов оказались универсальными и были использованы для изучения межвидовых взаимоотношений пресноводных губок на уровне семейств Lubomirskiidae и Spongillidae с помощью микросателлитных маркеров.

Таблица 15. Значения наименьших длин ампликонов исследуемых микросателлитных локусов внутри *Lubomirskiidae*

Локус	<i>R. echinata</i>		<i>S. papyracea</i>		<i>L. abietina</i>		<i>B. bacillifera</i>	
	Число аллелей	Наименьшая длина фрагмента	Число аллелей	Наименьшая длина фрагмента	Число аллелей	Наименьшая длина фрагмента	Число аллелей	Наименьшая длина фрагмента
<i>291_lba_em</i>	1	285	1	293	1	285	1	285
<i>217_lba_em</i>	5	375	2	375	4	355	3	373
<i>10_lba_em</i>	1	379	3	382	2	379	2	379
<i>124_lba_em</i>	1	206	1	203	2	203	1	203
<i>76_lba_em</i>	2	240	4	242	5	240	1	246
<i>158_lba_em</i>	2	284	4	286	3	280	5	282
<i>414_lba_em</i>	3	270	4	292	2	272	2	266
<i>257_lba_em</i>	4	266	5	262	9	260	8	260
<i>260_lba_em</i>	4	269	4	257	7	265	4	263
<i>315_lba_em</i>	3	231	3	228	3	237	5	231
<i>187_lba_em</i>	2	288	-	-	7	292	-	-
<i>249_lba_em</i>	3	204	-	-	7	204	6	191
<i>367_lba_em</i>	5	298	3	302	6	294	-	-
<i>369_lba_em</i>	6	276	4	304	4	294	7	285
<i>280_lba_em</i>	3	376	5	379	5	373	6	377
<i>75_lba_em</i>	5	261	5	284	7	259	7	257
<i>241_lba_em</i>	5	288	6	294	3	298	3	302
<i>222_lba_em</i>	6	186	-	-	6	180	-	-
<i>19_lba_em</i>	-	-	2	246	4	246	3	234

3.2.3 Анализ геномных и транскриптомных данных

L. baikalensis и *E. muelleri*

Для оценки перспективности использования транскриптомов при разработке универсальных микросателлитных маркеров был проведен поиск 24 исследуемых микросателлитных локусов с фланкирующими районами, дающих стабильную амплификацию с образцами *L. abietina*, *S. papyracea*, *B. bacillifera* и *R. echinata*, в транскриптомных сборках *L. baikalensis*, *L. abietina*, *S. papyracea*, *B. bacillifera* (Kenny et al., 2019; Kenny, Itskovich, 2021). Все совпадающие последовательности были выравнены на референсную последовательность генома *L. baikalensis* (Kenny et al., 2019). Также был проведен анализ расположения исследуемых микросателлитных локусов в аннотированном геноме *E. muelleri* (Kenny et al., 2020).

Все 24 исследуемых микросателлитных локуса находятся в транскрибируемых участках генома *E. muelleri*. Один локус – в кодирующей области, 10 в области интронов, остальные 13 – в транскриптах, для которых не найдено совпадений в базах данных. Все микросателлитные локусы были обнаружены в транскриптах *L. baikalensis*, *L. abietina*, *S. papyracea*, *B. bacillifera*, за исключением локуса *19_lba_em*, для которого в транскриптоме *S. papyracea* не найдено совпадений. Однако, только семь из них содержали и фланкирующие участки, и микросателлитную последовательность во всех четырех транскриптах. Еще для трех локусов микросателлитные последовательности были выявлены не для всех видов. Стоит отметить, что в транскриптоме *L. baikalensis* транскрипты, содержащие и микросателлитные последовательности и фланкирующие районы, были найдены только для 9 из 24 локусов. Геном и транскриптом *L. baikalensis* был прочитан с одного образца, что исключает влияние внутривидовой вариабельности на результаты анализа.

Длины фланкирующих районов *L. abietina*, *S. papyracea* и *B. bacillifera* в транскриптах, в большинстве случаев совпадали по длине с транскриптами *L. baikalensis*. Для локуса *241_lba_em* была выявлена делеция одного

нуклеотида у *L. abietina*, *S. papyracea* и *B. bacillifera* по сравнению с транскриптомной последовательностью *L. baikalensis*. По результатам фрагментного анализа часть образцов имела аллели с шагом в один нуклеотид, что может быть связано именно с этой делецией. Поскольку аллелей с нечетным шагом было большое количество, этот локус не был включен в набор универсальных маркеров для межвидовых исследований, однако он может быть использован в дальнейшем при условии секвенирования всех вариантов аллелей с нечетным шагом. Также для локуса *249_lba_em* в транскриптах *S. papyracea* была выявлена вставка трех нуклеотидов, однако для четырех образцов *S. papyracea* из пяти не удалось получить ПЦР продукты по этому локусу. Для локуса *291_lba_em* в транскриптах *S. papyracea* была выявлена вставка одного нуклеотида во фланкирующем районе по сравнению с транскриптами и геномом *L. baikalensis*, однако по результатам фрагментного анализа аллелей, имеющих нечетный шаг, выявлено не было. Это может быть связано с низкой частотой аллелей с вставкой в популяции. Совпадение длин фланкирующих районов разных видов *Lubomirskiidae*, за исключением описанных выше случаев, позволяет сравнивать виды между собой по подобранному набору локусов.

Стоит отметить, что между последовательностями генома и транскриптома *L. baikalensis*, прочитанных из одного и того же образца, были выявлены различия в последовательностях фланкирующих районов в локусах *118_lba_em*, *124_lba_em*, *187_lba_em*, *217_lba_em*, *367_lba_em*, *76_lba_em*. Все различия являлись заменами, без делеций или вставок, что может быть обусловлено ограниченной точностью секвенирования на платформе Illumina. Выявленное отсутствие микросателлитной последовательности и соседствующего с ней небольшого участка фланкирующих районов в 15 из 24 проанализированных локусов, по всей видимости, обусловлено тем, что анализируемые микросателлитные последовательности попадают в область интронов и вырезаются в ходе процессинга, а в транскриптомную сборку попали последовательности РНК после процессинга. Таким образом,

использование транскриптомов для разработки универсальных микросателлитных маркеров не целесообразно. Наиболее эффективно использование данных полногеномного секвенирования. Согласно аннотированному геному *E. muelleri*, среди универсальных микросателлитных локусов, один локус находится в кодирующей области, два – в области интронов, 8 – в транскриптах, не имеющих совпадений в базах данных. Показано, что разработанные наборы микросателлитных маркеров позволяют корректно проводить популяционно-генетические исследования и изучать межвидовые взаимоотношения четырех видов байкальских эндемичных губок.

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

3.3.1 Изучение межвидовых взаимоотношений Lubomirskiidae

На примере четырех видов байкальских эндемичных губок с помощью микросателлитных маркеров проанализированы межвидовые взаимоотношения Lubomirskiidae. Для *L. abietina*, *R. echinata*, *S. papyracea* и *V. bacillifera* (каждого вида по 5 экз.) получены данные микросателлитных генотипов по 10 локусам (прил. 5). Результаты анализа межвидовой вариабельности внутри Lubomirskiidae с помощью микросателлитных маркеров приведены в таблице (табл. 13). По F_{ST} (табл. 16) 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 *V. bacillifera* и *L. abietina* (0,11). В связи с малой выборкой ($n=5$) для каждого вида, полученные значения могут быть несколько завышены, как было показано 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.

Таблица 16. Попарные дистанции F_{ST} между разными видами Lubomirskiidae (Yakhnenko et al., 2024b)

Вид	<i>R.echinata</i>	<i>S.papyracea</i>	<i>L.abietina</i>	<i>B.bacillifera</i>
<i>R.echinata</i>	-			
<i>S.papyracea</i>	0,51164**	-		
<i>L.abietina</i>	0,22528**	0,30936**	-	
<i>B.bacillifera</i>	0,4652***	0,35459***	0,11052*	-

Примечание. Значения F_{ST} были посчитаны с помощью Arlequin, по 7 локусам, так как остальные содержали >10% отсутствующих данных. Доверительный интервал P-value<0,05*, P-value<0,01**, P-value<0,001***.

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 внутри родов Lubomirskiidae. На рисунке 5 приведена дендрограмма, построенная методом UPGMA. Дендрограмма, построенная методом NJ, имела аналогичное распределение образцов на кластеры и значения P-value AMOVA и поэтому в данной работе не приводится. Распределение по кластерам в соответствии с морфологически определенной видовой принадлежностью отмечено для 19 из 20 образцов.

Стоит отметить, что все виды, использованные в дендрограмме, 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 кладу 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 (рис. 6), и низкие значения F_{ST} между видами *L. abietina* и *R. echinata* (0,22), соответствующие уровню внутривидовой вариабельности для

L. baikalensis. Вопрос межвидовой гибридизации Lubomirskiidae остается открытым и требует дальнейшего изучения на больших выборках.

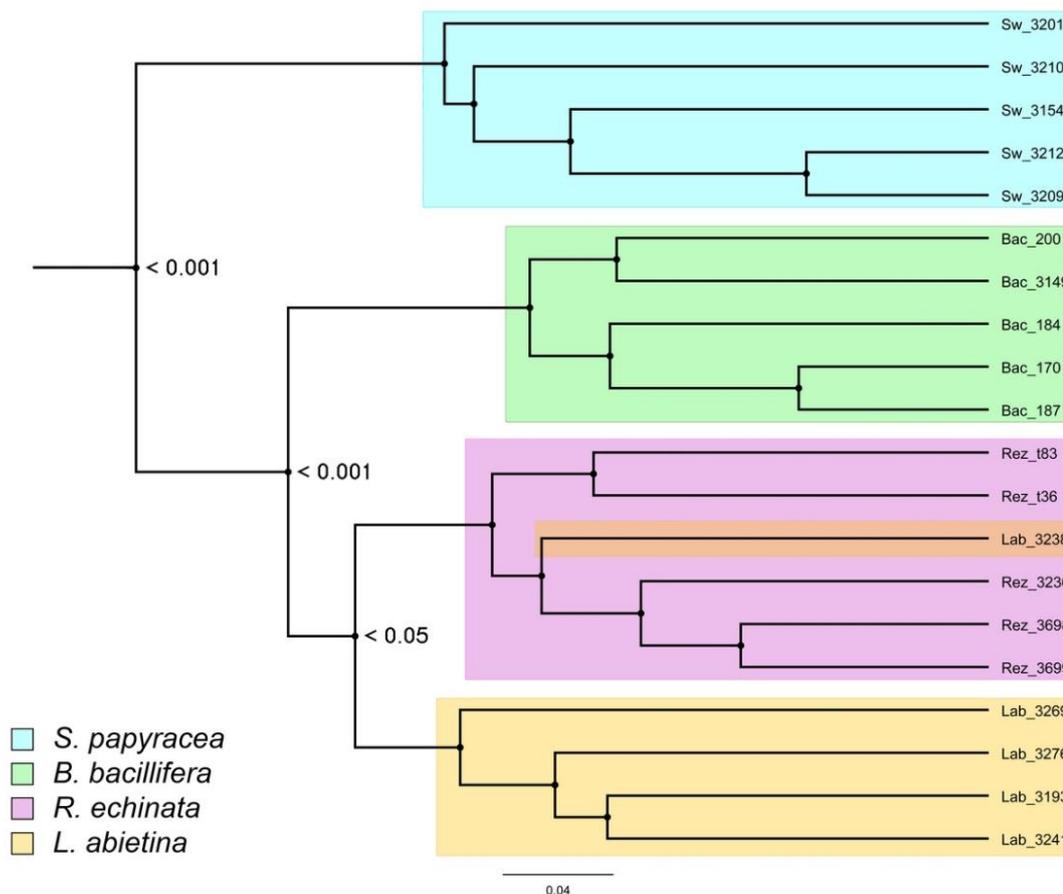


Рисунок 5. Дендрограмма, основанная на дистанциях Бруво, рассчитанных по 10 микросателлитным локусам, для четырех видов Lubomirskiidae, построенная по методу UPGMA. В узлах находятся значения P-value теста AMOVA, указывающие уровень достоверности разделения на клады (Yakhnenko et al., 2024b).

Кластерный анализ методом ΔK , несмотря на небольшую выборку, показал наличие с наибольшей вероятностью двух групп, и с меньшей – трех, в соответствии с видовой принадлежностью, определенной по морфологии (рис. 6), что свидетельствует о значительной генетической дифференциации между видами (Reiner et al., 2019). Виды *L. abietina* и *B. bacillifera* объединяются в один кластер в обоих случаях, что соответствует результатам, полученным на большой выборке для *L. baikalensis*, где в разные кластеры попадали популяции, имевшие значение $F_{ST} > 0,2$. *R. echinata* в обоих случаях выделяется в отдельный кластер, тогда как *S. papyracea* только в случае с меньшей поддержкой, что может быть связано с малой

выборкой. Для *L. abietina* один из образцов более чем на 50% кластеризуется с образцами *R. echinata*, также, как и на дендрограмме (рис. 5).

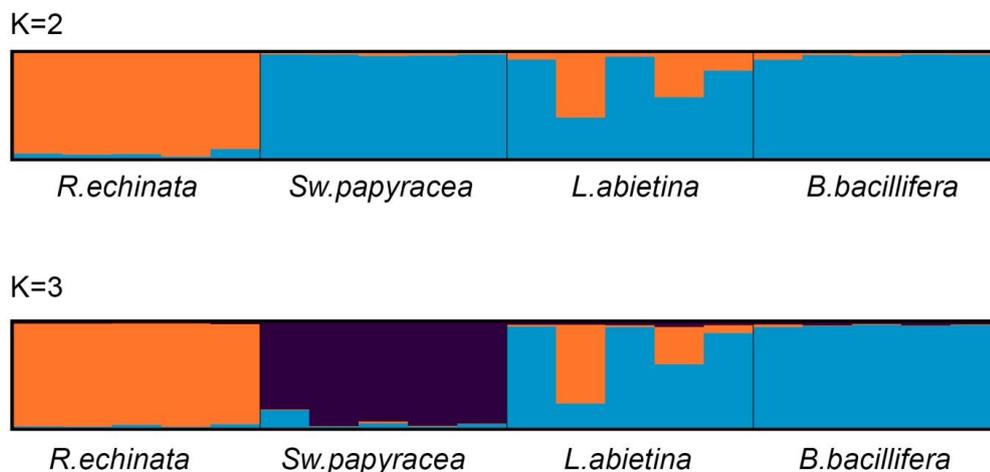


Рисунок 6. Кластерный анализ четырех видов Lubomirskiidae на основе 10 микросателлитных локусов (Yakhnenko et al., 2024b).

Анализ главных координат представлен на рисунке 7, где на первые две оси приходится $>56\%$ разнообразия. Образцы группируются согласно четырем морфологически определенным видам, что согласуется с результатами остальных тестов и кластеризацией на дендрогамме. Наиболее четко выделяется *S. papyracea*.

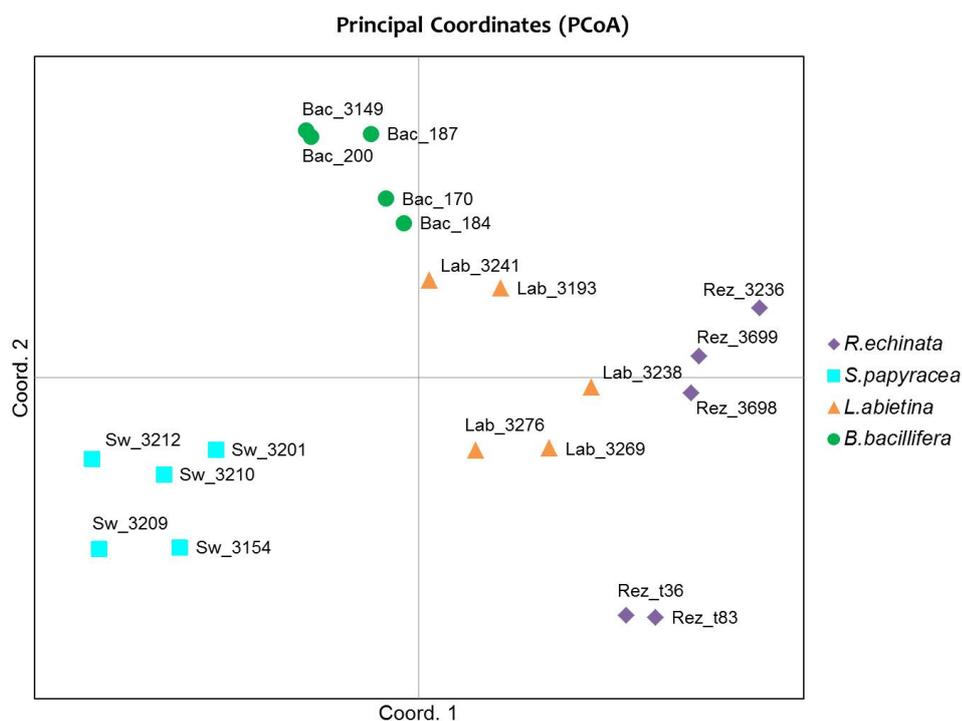


Рисунок 7. Анализ главных координат для четырех видов Lubomirskiidae по 10 микросателлитным локусам (Yakhnenko et al., 2024b).

Образцы *R. echinata* из разных районов, разделяются на группы, что может свидетельствовать о наличии внутривидовой дифференциации и требует более детального изучения на большей выборке. Расположение на графике группы образцов *L. abietina* между группами *B. bacillifera* и *R. echinata* соответствует попарным значениям F_{ST} (табл. 16). Таким образом, с помощью микросателлитных маркеров впервые продемонстрирована возможность разделения на кластеры образцов эндемичных байкальских губок, принадлежащих к разным родам и видам. Полученные результаты подтверждают возможность использования микросателлитов для изучения межвидовых взаимоотношений близкородственных таксонов, показанную ранее для растений (Ning et al., 2023) и рыб (Груздева и др., 2020).

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) (табл. 13). Попарные генетические дистанции F_{ST} были посчитаны по 5 локусам из 6, так как один имел большую долю недостающих данных. *R. echinata* и *E. muelleri* $F_{ST}=0,249$ (P-value < 0,001), *L. abietina* и *E. muelleri* $F_{ST}=0,157$ (P-value < 0,001), между видами *L. abietina* и *R. echinata* достоверные различия по пяти микросателлитным локусам не выявлены. Полученные данные демонстрируют возможность дифференциации пресноводных губок на уровне семейств по пяти микросателлитным локусам, однако на уровне близкородственных видов достоверных различий, которые определяются по 10 локусам, не выявлено.

Дендрограмма, построенная методом UPGMA на основе генетических дистанций Бруво по 6 микросателлитным локусам, показывает, что образцы, принадлежащие семействам Lubomirskiidae и Spongillidae, находятся в разных кластерах (P-value < 0,001) (рис. 8).

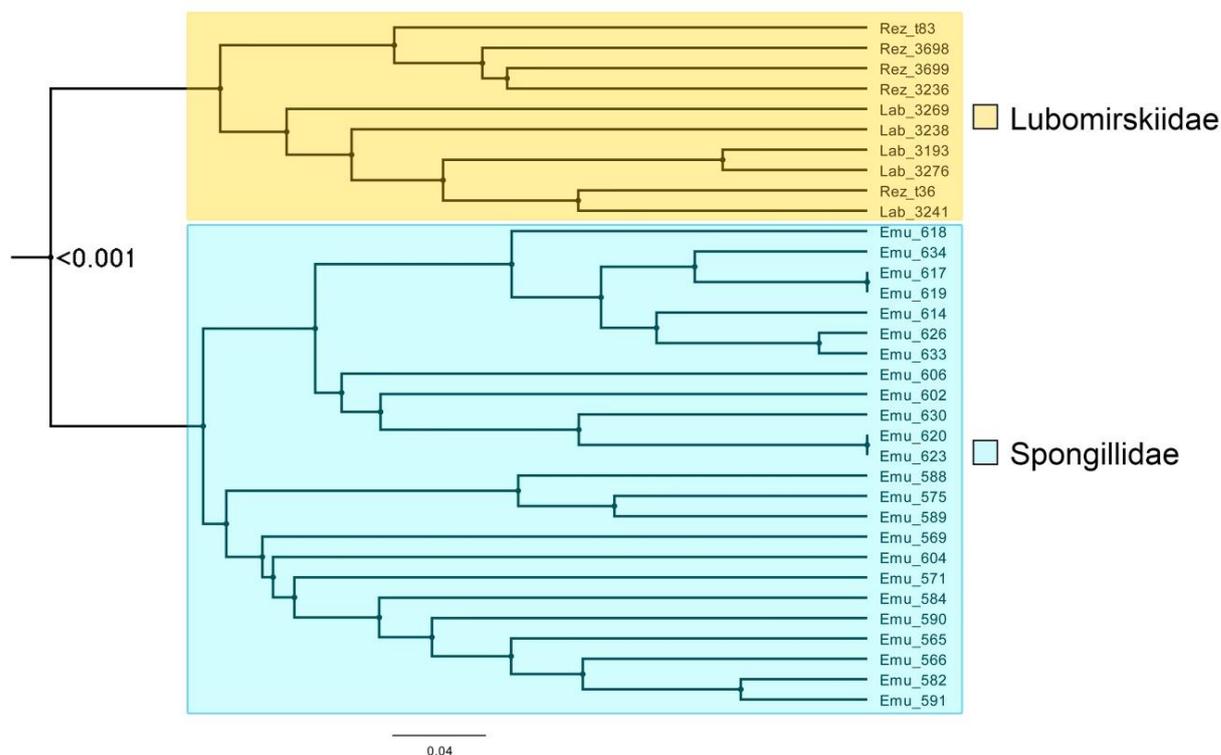


Рисунок 8. Дендрограмма, основанная на дистанциях Бруво, рассчитанных по 6 микросателлитным локусам, для *L. abietina*, *R. echinata* и *E. muelleri*, построенное по методу UPGMA (Yakhnenko et al., 2024b).

Стоит отметить, что для Spongillidae в разные кластеры вошли образцы из разных районов, за исключением образца Emu 604, который кластеризуется с образцами с другого места сбора. На том же наборе данных была построена дендрограмма методом NJ, топология которой в целом соответствовала полученной методом UPGMA, однако, образец Emu_604 кластеризовался с образцами из того же места отбора проб. Для представителей Lubomirskiidae два вида делятся на разные кластеры, за исключением одного образца Rezt36, ($P\text{-value}=0,057$), тогда как на дендрограмме, построенной по 10 локусам, образец *L. abietina* кластеризовался вместе с образцами *R. echinata* ($P\text{-value}<0,05$). Таким образом, разрешающая способность шести локусов позволяет достоверно разделить семейства, но не виды и популяции.

Кластерный анализ методом ΔK (рис. 9) показал наличие двух кластеров, соответствующих Lubomirskiidae и Spongillidae, что согласуется с данными, полученным при построении дерева и расчете F_{ST} . Для разделения

пресноводных губок на уровне семейств с помощью кластерного анализа достаточно 6 маркеров.

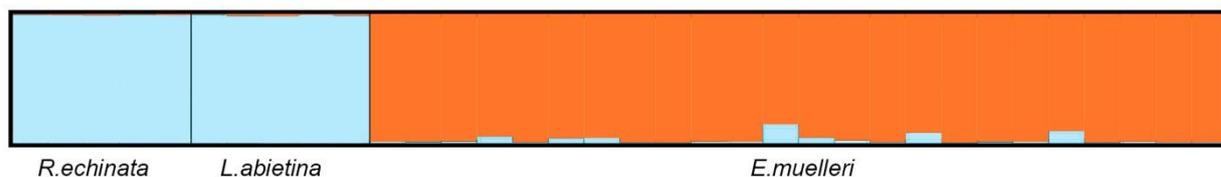


Рисунок 9. Кластерный анализ *L. abietina*, *R. echinata* и *E. muelleri* на основе 6 микросателлитных локусов (Yakhnenko et al., 2024b).

Согласно анализу главных координат (рис. 10), на первые две оси приходится >46% разнообразия. Показано, что представители разных семейств формируют две отдельные группы, а *L. abietina* и *R. echinata* хотя и формируют две группы, имеют некоторое пересечение.

Таким образом, показана возможность разделения Lubomirskiidae и Spongillidae помощью микросателлитных локусов. Только 6 микросателлитных локусов (табл. 13) оказались пригодными для изучения взаимоотношений между семействами. Результаты расчета попарных значений генетических дистанций (F_{ST}), кластерного анализа, анализа главных координат и кластеризация на дендрограмме согласуются друг с другом и подтверждают, что разрешающая способность 6 локусов 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.

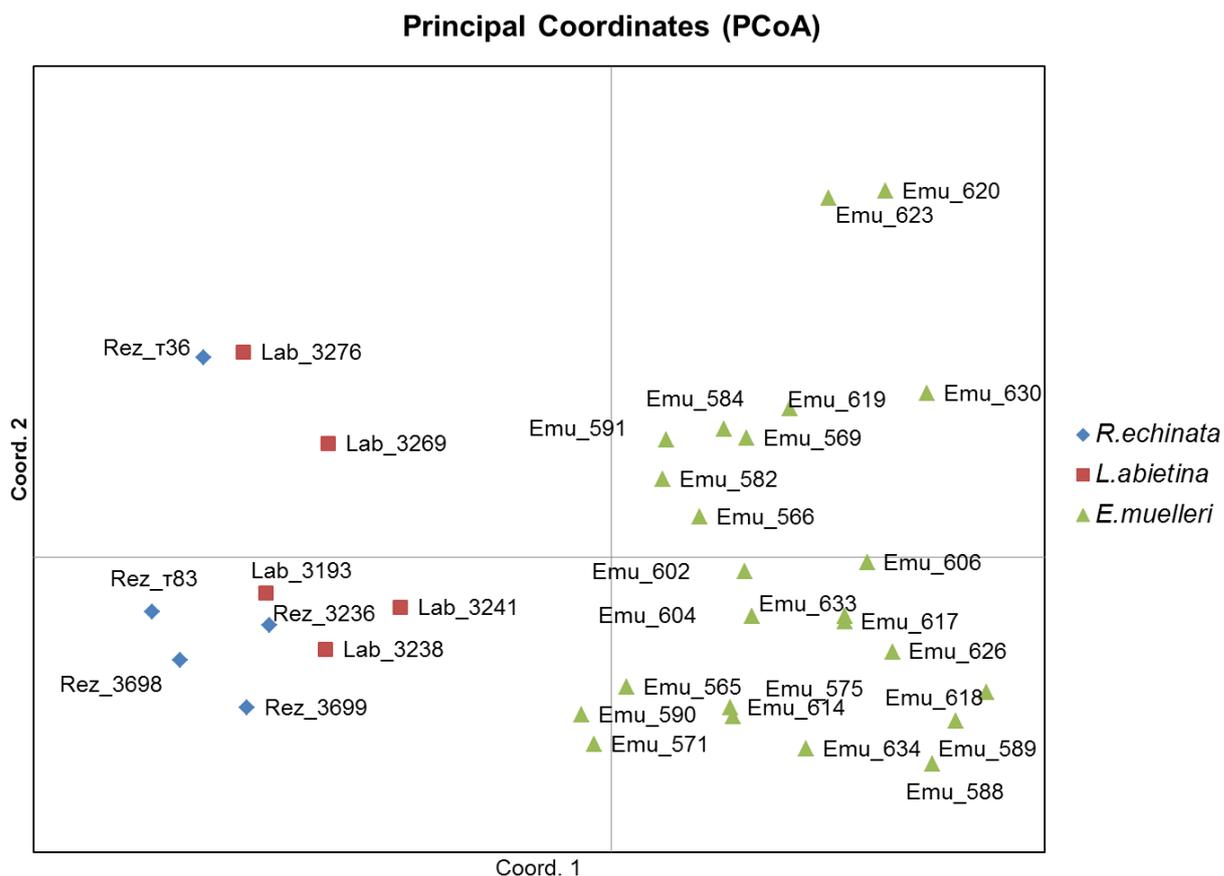


Рисунок 10. Анализ главных координат для *L. abietina*, *R. echinata* и *E. muelleri* на основе 6 микросателлитных локусов (Yakhnenko et al., 2024b).

3.3.3 Анализ популяционно-генетической структуры *L. baikalensis*

В ходе работ были получены данные длин аллелей 10 микросателлитных локусов (табл. 7) для 251 образца *L. baikalensis*, отобранных в 8 районах озера Байкал (табл. 1, рис. 1, 2) (не менее чем по 30 образцов из каждого района) (прил. 3).

3.3.3.1 Тест на равновесие Харди-Вайнберга

Проверка на нуль аллели и ошибки генотипирования с помощью Microchecker 2.2.3 показала отсутствие нуль аллелей, ошибок и проскальзывания полимеразы при 99% доверительном интервале. Однако, анализ с поправкой Бонферрони показал потенциальное наличие нуль-аллелей и проскальзывания полимеразы в локусе *Lba_19* для района Чертов Мост, возможное наличие нуль-аллелей в локусе *Lba_em158* для пролива Малые Ольхонские Ворота, потенциальное наличие нуль-аллелей и проскальзывания полимеразы в локусе *Lba_em19* для района мыса Елохин.

По результатам анализа с помощью Arlequin 3.5 ни один из локусов не показал значимого отклонения от равновесия Харди-Вайнберга (HWE) ($P\text{-value} < 0,05$) (табл. 9, рис. 11) в среднем по всем районам. Для отдельных популяций наблюдались отклонения в районе мыса Верхнее изголовье Святого Носа – для локуса *Lba_23*, в районе пролива Малые Ольхонские ворота для *Lba_em76*, в районе мыса Немнянка для *Lba_em217*, *Lba_17*, *Lba_19*, в районах мыса Турали и станции Уланово для *Lba_em_19*, в районе скалы Чертов Мост для *Lba_19* (рис. 11). В большинстве случаев (7/9) наблюдается недостаток гетерозигот, и только в двух – избыток (рис. 11).

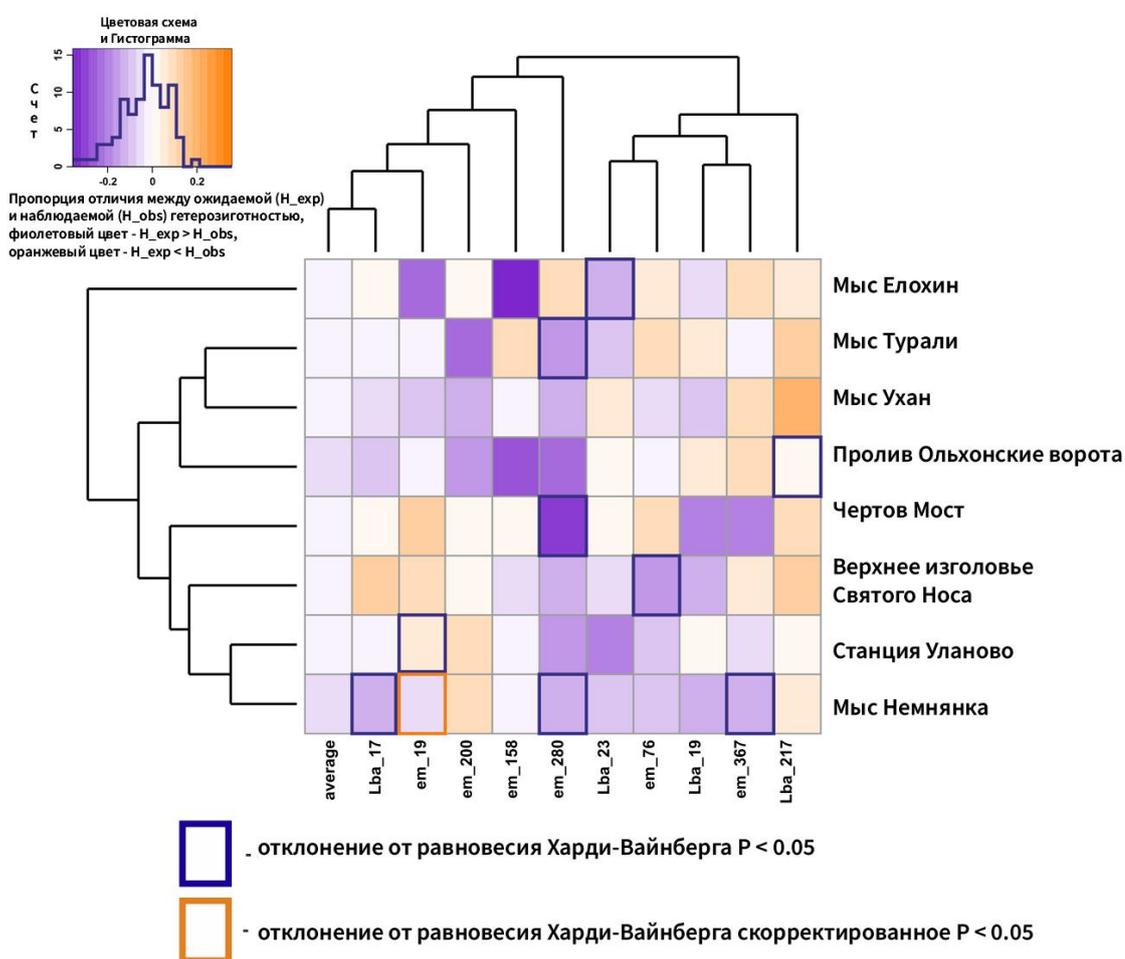


Рисунок 11. Визуализация случаев отклонения от равновесия Харди-Вайнберга по всем локусам и популяциям (Yakhnenko et al., 2024a).

В среднем по популяциям отклонение от равновесия Харди-Вайнберга не наблюдалось, согласно значениям как стандартного HWE $P\text{-value}$, так и HWE $P\text{-value}$ с поправкой Бенжамини-Ходжберга (табл. 17).

Среднее значение H_e составило 0,598, что попадает в интервал от 0,4 до 0,9, характерный для морских (Duran et al., 2004; Blanquer, Uriz, 2010; Dailianis et al., 2011; Pérez-Portela et al., 2015; Riesgo et al., 2016, 2019) и пресноводных (Li et al., 2018) видов губок. Во всех районах наблюдался незначительный недостаток гетерозигот. Среди причин, которые могли бы поспособствовать этому, есть присутствие нуль-аллелей, инбридинг, эффект Валунда (Freeland et al., 2011), недавнее прохождение через бутылочное горлышко, большой приток мигрантов. Отсутствие нуль аллелей, ошибок и проскальзывания полимераза показано при 99% доверительном интервале, что не могло существенно повлиять на соотношение ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности.

Инбридинг, вероятно, мог повлиять на частоту гетерозигот, поскольку губки являются сидячими организмами и расселение происходит на личиночной стадии, плавающей короткое время (Manconi, Pronzato, 2008), а также плавающими сперматозоидами, соответственно, район расселения за один жизненный цикл довольно ограничен и ведет к высокой вероятности скрещивания с родственными особями. Такая ситуация характерна также и для морских губок (Riesgo et al., 2019), где недостаток гетерозигот проявляется сильнее и вызывает отклонение от равновесия Харди-Вайнберга более чем в половине исследованных популяций. Анализ популяционной структуры не выявил подразделенности внутри районов отбора проб, таким образом, эффект Валунда не мог оказать влияния на частоту гетерозигот.

3.3.3.2 Генетическое разнообразие между популяциями

Данные генетического разнообразия всех 8 популяций *L. baikalensis*, представлены в Таблице 17. Наибольшее среднее число аллелей на локус ($\text{mean } N_a$) выявлено в популяциях пролива Малые Ольхонские ворота (6,2), а наименьшее в популяции района мыса Немнянка (4,8). При этом, среднее значение эффективных аллелей (N_e) было наибольшим в популяции мыса Ухан (3,88), а наименьшим в районе станции Уланово и мыса Немнянка (2,7). Тест на наличие клонов с помощью GenAlex показал наличие пяти

клонированных генотипов (по две копии на генотип). Одинаковые клоны всегда встречались в одной и той же популяции. Один потенциально клональный генотип из популяции мыса Турали (образцы YA115, YA104), один в популяции Верхнее Изголовье Святого Носа (YA397, YA394), три из района мыса Ухан (YA48, YA40), (YA62, YA41), (YA58, YA54). Наибольшее генетическое разнообразие наблюдалось из районов мысов Ухан ($H_e=0,64$), а наименьшее в районе скалы Чертов Мост ($H_e=0,537$) (табл. 17). Среднее значение генетического разнообразия для всех 8 популяций составило $H_e=0,598$ (табл. 17). Коэффициент инбридинга (F_{is}) был около нуля для всех популяций, что свидетельствует о близости к идеальному равновесию Харди-Вайнберга. Наибольшее значение F_{is} (0,065) было в районе мыса Немнянка. Положительные значения F_{is} для всех популяций показывают, что особи в этих районах имеют несколько более высокий уровень родства, чем ожидалось бы при случайном скрещивании.

Значение Theta (Θ) посчитали для всех 8 районов, что позволило оценить соотношения значений эффективной численности в разных популяциях. Значение Theta (Θ) оказалось наибольшим в районе мыса Ухан (12,24), а наименьшим в районе мыса Верхнее Изголовье Святого Носа (4,11), что в полтора раза отличается от среднего значения по всем популяциям, равного 6,117. Диапазон аллелей был наименьшим (5,6) в районе мыса Елохин, а наибольшим (8,4) в районе пролива Малые Ольхонские ворота, что говорит о том, что ближайший общий предок для особей из района пролива Малые Ольхонские ворота был наиболее древним среди всех исследованных районов, либо не подвергался вымиранию.

Таблица 17. Основные параметры генетического разнообразия *L. baikalensis* из разных районов оз. Байкал (Yakhnenko et al., 2024a)

Популяция	Код района	Na	Ne	H obs.	H exp.	HWE P-value	HWE P-value скорректированное	Theta (H)	Диапазон аллелей	G-W	Fis	LD
Станция Уланово	US	5,11	2,71	0,59	0,61	0,52	0,62	4,63	6,89	0,73	0,03	1
Скала Чертов Мост	CMR	5,50	2,78	0,52	0,54	0,51	0,62	5,14	6,80	0,77	0,03	4
Пролив Малые Ольхонские ворота	SOV	6,20	3,13	0,59	0,61	0,49	0,62	6,25	8,40	0,69	0,04	1
Мыс Ухан	CU	6,10	3,88	0,62	0,64	0,55	0,62	12,24	7,50	0,75	0,03	1
Мыс Верхнее Изголовье Святого Носа	SN	5,00	2,80	0,62	0,62	0,62	0,62	4,11	6,50	0,76	0,01	3
Мыс Елохин	CE	5,00	2,83	0,55	0,57	0,37	0,62	4,64	5,60	0,80	0,02	7
Мыс Турали	CT	5,40	3,18	0,59	0,59	0,53	0,62	7,22	6,50	0,74	0,01	3
Мыс Немнянка	CN	4,78	2,72	0,56	0,60	0,34	0,62	5,12	5,78	0,72	0,07	2

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

Значение показателя Гарза-Вильямсона (G-W) для всех локусов всех популяций больше 0,68, что указывает на отсутствие резкого снижения эффективного размера популяций за последние 100 поколений. Доля клонов среди образцов была крайне мала. Всего обнаружено пять идентичных многолокусных генотипов, каждый из которых был выявлен у двух образцов. В каждом случае образцы с одинаковым генотипом были собраны в одном районе. Поскольку байкальские эндемичные губки не размножаются при помощи геммул бесполом путем, наиболее вероятно, что клоны образовались при травмировании одного организма и прикреплении его фрагментов к субстрату. Случаи прикрепления травмированных ветвей байкальских эндемичных губок к субстрату неоднократно наблюдались в ходе водолазных работ Ханаевым И.В. (личное сообщение).

Кластерный анализ, проведенный с помощью Structure методом ΔK , показал наибольшие значения $K=3$. Популяции попадают в кластеры по котловинам (рис. 12а) (первый кластер – станция Уланово и скала Чертов Мост, второй кластер – мыс Ухан и пролив Малые Ольхонские ворота, третий кластер – мыс Елохин, мыс Немнянка, мыс Турали, мыс Верхнее Изголовье Святого Носа). Суммарно 8 образцов имели высокий уровень смешения. В районе Скалы Чертов Мост четыре образца имели смешанный с представителями из центральной котловины озера генотип, уровень смешения составил 0,350-0,495. Еще четыре образца, имевших уровень смешения больше 0,3 были выявлены для популяции из района мыса Верхнее Изголовье Святого Носа (северная котловина). Из этих четырех образцов один имел уровень смешения $>0,3$ с особями из средней и южной котловин. Еще два образца имели уровень смешения 0,418-0,593 с особями из центральной котловины. Один образец имел уровень смешения 0,302 с особями из южной котловины. Согласно результатам AMOVA, 18,91% вариабельности было выявлено между популяциями ($P<0,001$). Расчитаны попарные значения индекса фиксации Райта (F_{ST}) (табл. 18).

Достоверные различия наблюдались между всеми популяциями. Значения F_{ST} 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 значения F_{ST} составили 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 18. Попарные значения F_{ST} между популяциями ($P\text{-value}<0,05$) (Yakhnenko et al., 2024a)

Популяция	US	CMR	SOV	CU	SN	CE	CT
CMR	0,10						
SOV	0,22	0,20					
CU	0,21	0,18	0,04				
SN	0,21	0,17	0,15	0,15			
CE	0,29	0,30	0,26	0,24	0,15		
CT	0,25	0,23	0,19	0,16	0,09	0,10	
CN	0,29	0,27	0,24	0,19	0,13	0,08	0,02

Визуализация многомерного шкалирования на основе генетических дистанций Бруво также демонстрирует деление образцов на три группы, в соответствии с местообитанием особей (рис. 12в). Такой же результат показывает дополнительная визуализация с помощью дендрограммы, построенной методом UPGMA по значениям F_{ST} (рис. 12б). Три основных кластера, включающих 8 популяций, сформированы в соответствии с обитанием в разных котловинах озера, что соответствует результатам, полученным с помощью Structure (рис. 12а).

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.

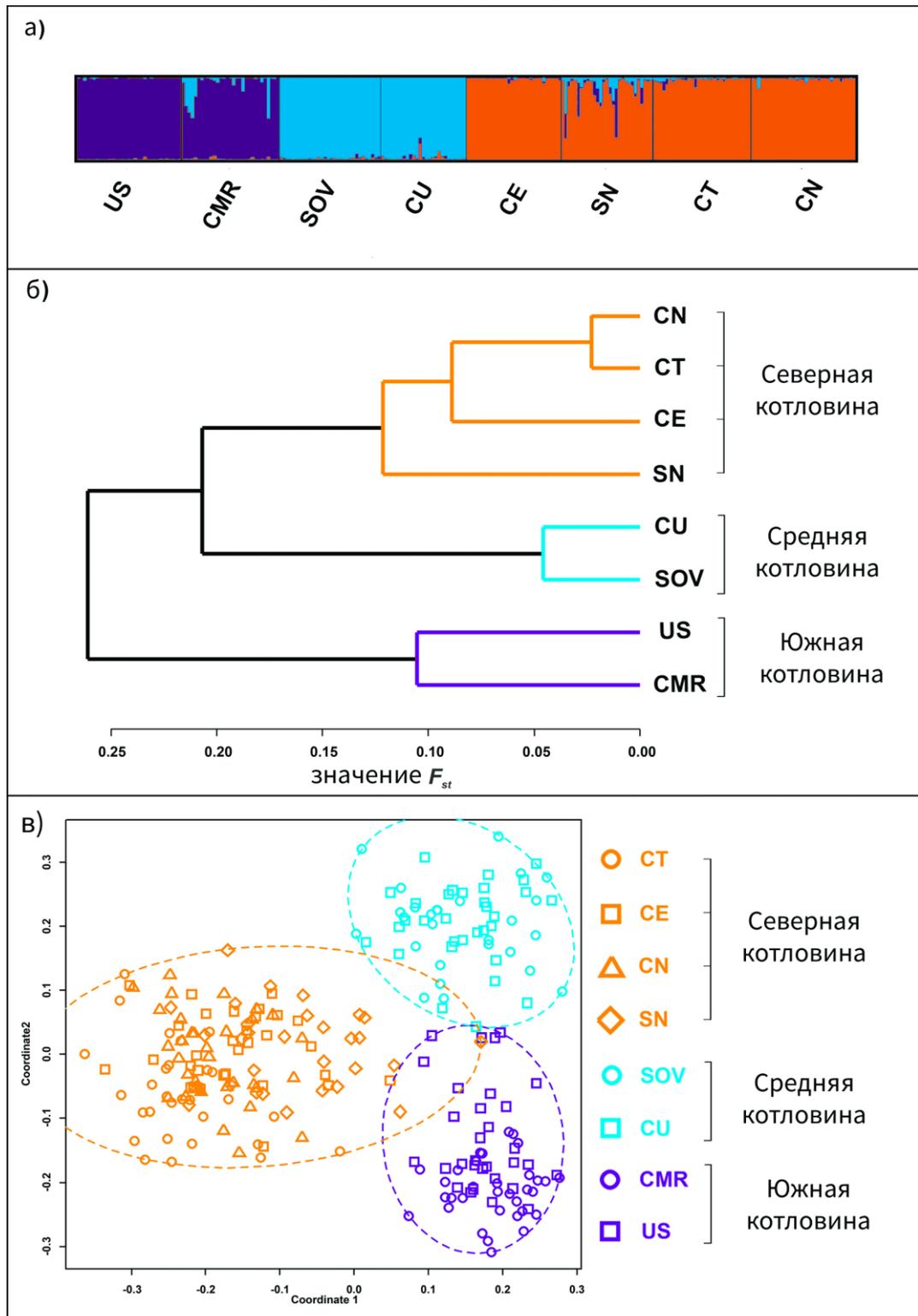


Рисунок 12. Визуализация сходства-различия между популяциями *L. baikalensis*: а – наиболее вероятное деление на генетические кластеры, полученное с помощью дельта K по методу Эванно; б – иерархический кластерный анализ точек отбора проб на основе значений F_{st} ; в – многомерное шкалирование на основе генетических дистанций Бруво, рассчитанных с помощью микросателлитных маркеров (Yakhnenko et al., 2024a).

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).

Таким образом, уровень генетической подразделенности байкальских эндемичных губок в целом соответствует уровням, наблюдаемым у морских губок, но, 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 космополитных пресноводных губок имеющиеся данные относятся только к видам, обитающим в различных водоемах и реках, а также в системе рек с течением, что вероятно и привело к наличию значительной дифференциации на столь незначительных расстояниях, несмотря на способность к расселению с помощью геммул.

Интересно, что все полученные значения F_{ST} , независимо от величины и географического расстояния между районами, являются значимыми (P -value < 0,05). Эта особенность также наблюдается и для морских видов губок (Dailianis et al., 2011; Riesgo et al., 2016; Padua et al., 2018). Полученные результаты, вероятно, связаны с низкой способностью личинок к распространению, что способствует самовоспроизводству популяций, локальному удержанию личинок и увеличению генетического расхождения популяций в пространстве (Pérez-Portela, Riesgo, 2018). Наличие выраженной популяционной структуры было зафиксировано с помощью расчетов попарных F_{ST} и кластеризации методом дельта К. Визуализация

многомерного шкалирования, основанная на генетических дистанциях Бруво также продемонстрировала наличие подразделенности на три группы.

3.3.3.3 Паттерны миграции

Для 8 популяций *L. baikalensis* были вычислены уровни миграции (рис. 13, табл. 19). 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.

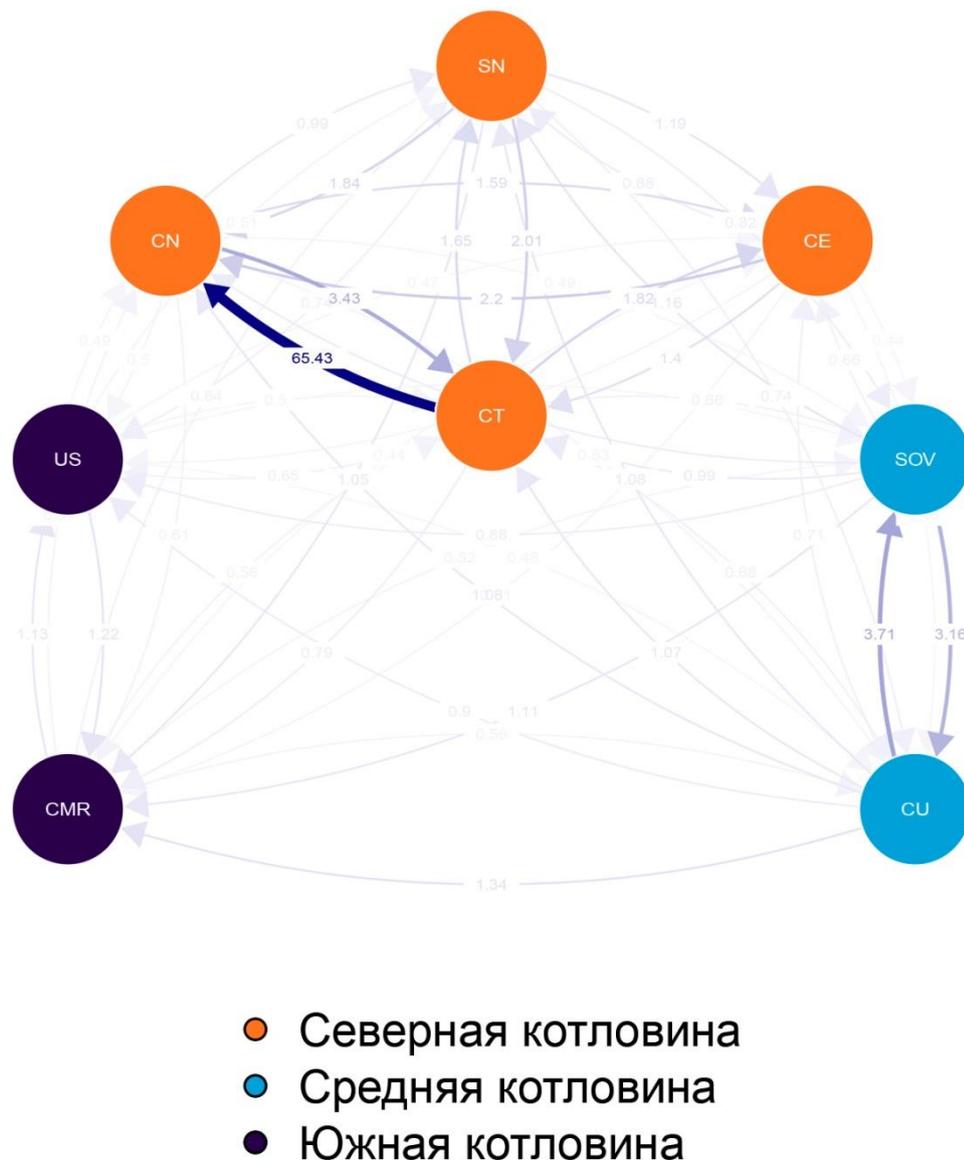


Рисунок 13. Визуализация миграционных потоков между всеми исследованными районами. Районы отбора проб отмечены цветными кругами. Цвет круга соответствует одному из трех выявленных генетических кластеров. Стрелки указывают направление миграции, яркость и толщина стрелки соответствует уровню миграции (Yakhnenko et al., 2024a).

Для популяций из районов скала Чертов Мост, мыс Елохин, станция Уланово, мыс Немнянка суммарный приток мигрантов был больше, чем отток. Для остальных популяций – наоборот.

Таблица 19. Ассиметричная матрица скоростей миграции M между районами (Yakhnenko et al., 2024a).

Популяция	US	CMR	SOV	CU	SN	CE	CT	CN
US	-	1,22	0,47	0,46	0,51	0,47	0,49	0,49
CMR	1,13	-	0,52	0,60	0,64	0,44	0,56	0,57
SOV	0,89	1,11	-	3,16	1,16	0,66	0,99	0,90
CU	0,90	1,34	3,7	-	1,08	0,71	1,07	1,080
SN	0,74	1,05	0,82	0,74	-	1,19	2,01	1,84
CE	0,54	0,51	0,44	0,45	0,89	-	1,40	2,20
CT	0,65	0,79	0,67	0,68	1,65	1,82	-	65,43
CN	0,50	0,61	0,49	0,53	0,99	1,59	3,43	-

Примечание. Значения коэффициентов миграции из мест, указанных в столбце, в места, указанные в строке.

Согласно результатам регрессионного анализа (рис. 14), наибольшая отрицательная корреляция наблюдается между уровнями миграции и географическими дистанциями между популяциями, измеренными в диапазоне глубин обитания *L. baikalensis* ($R=0,46$, $P\text{-value}<0,0001$). Также более слабая отрицательная корреляция наблюдается между уровнями миграции и наименьшими географическими дистанциями между популяциями ($R=0,14$, $P=0,004$). Анализ взаимосвязи между уровнем миграции и расстоянием между популяциями с учетом течений не выявил корреляции ($R=0,0057$, $P=0,57$) (рис. 14, 15).

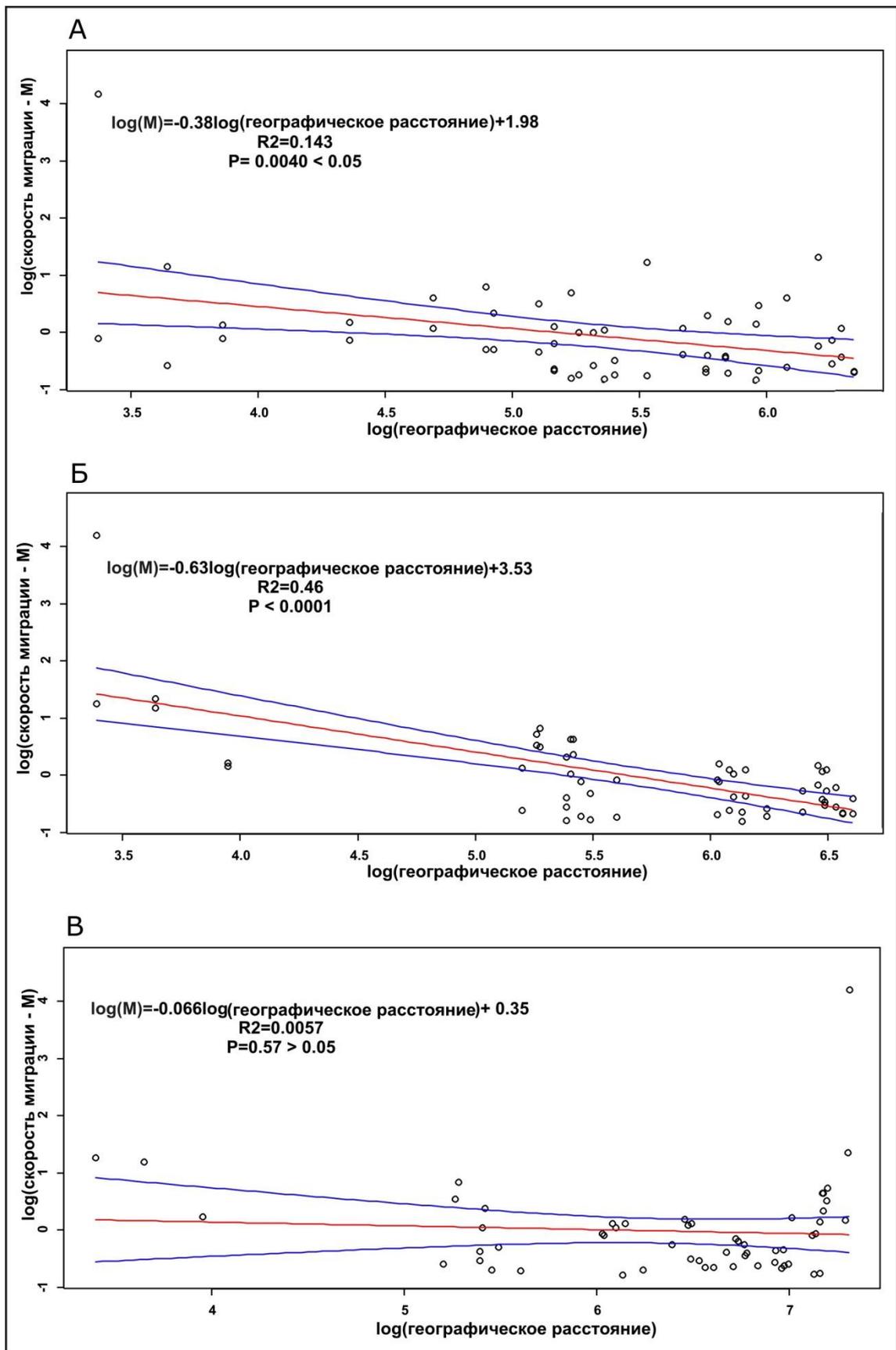


Рисунок 14. Регрессионный анализ миграционных потоков и наименьших расстояний между районами: А – по воде, Б – по изобате глубин обитания *L. baikalensis* и В – по изобате глубин обитания с учетом циркуляционных течений (Yakhnenko et al., 2024a).

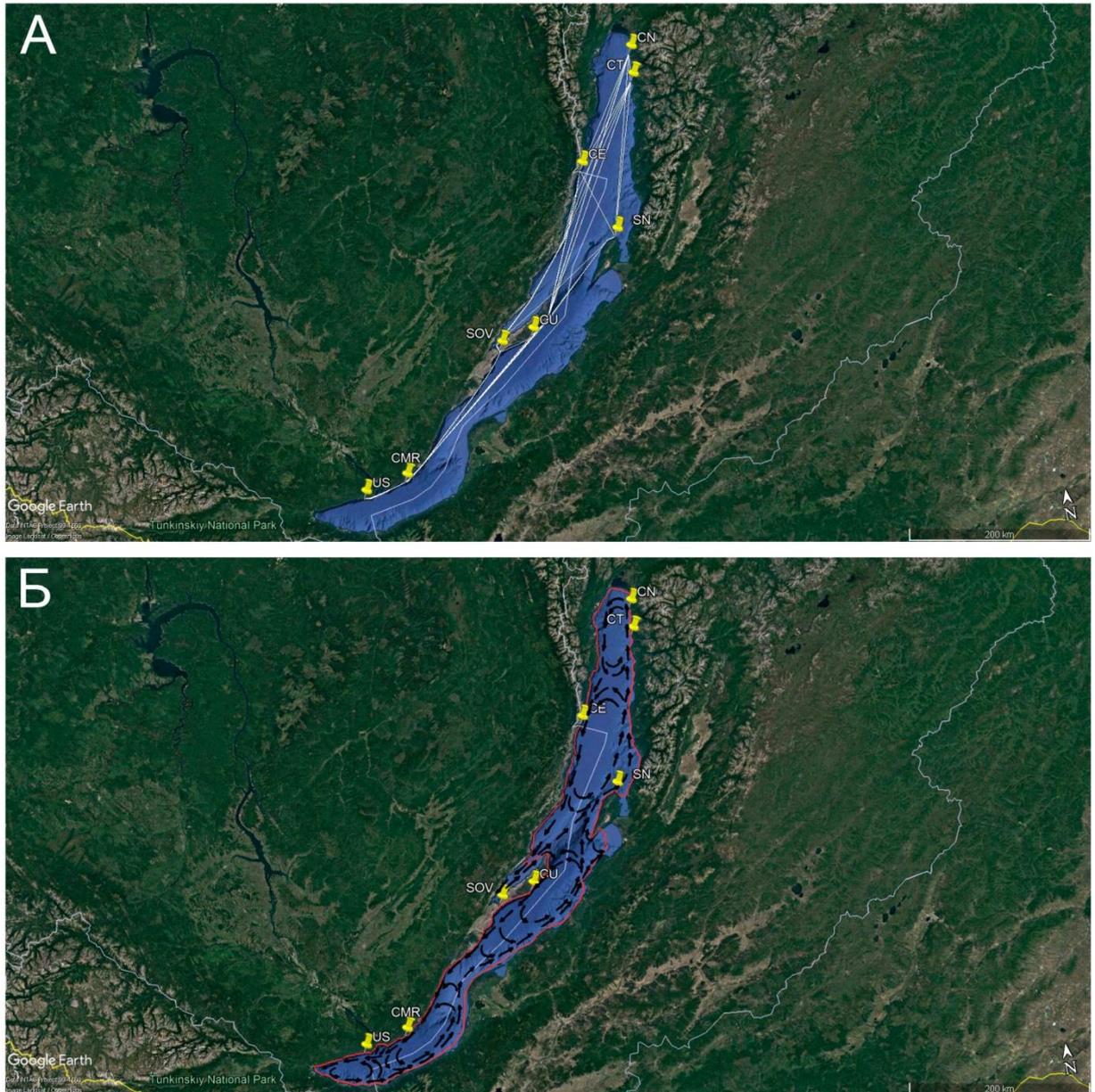


Рисунок 15. А. Измерения кратчайших расстояний между районами отбора проб по воде отмечены белыми линиями. Б. Измерение расстояния между районами отбора проб в диапазоне глубин обитания вида (до 120 м) отмечено красной линией. Течения указаны в соответствии с Атласом Байкала 1993 г. (Galaziy, 1993). Основано на карте INTAS project 99-1669 (Yakhnenko et al., 2024a).

Миграции вдоль береговой линии, по всей видимости, обусловлены резким увеличением глубины вблизи берега. Вероятно, личинки, плавающие лишь короткое время (Manconi, Pronzato, 2008), в большинстве случаев, не успевают пересечь непригодные для заселения участки акватории и расселение идет вдоль диапазона глубин обитания. Для морских прикрепленных организмов помимо дистанции, важными причинами

генетической дивергенции являются океанографические фронты (Pérez-Portela, Riesgo, 2018), отсутствующие в озере Байкал, а также локальные особенности окружающей среды (Giles et al., 2015). Тогда как течения препятствуют миграции морских губок (DeBiasse et al., 2016), для байкальских эндемичных губок влияния течений на уровни миграции обнаружено не было (рис. 14). Однако, стоит отметить, что районы отбора образцов в южной и средней котловинах располагались только по западному берегу озера, поэтому оценить влияние течений на генетическую дифференциацию не удалось в полной мере. Этот вопрос требует более тщательного изучения, что является задачей последующих исследований.

3.3.3.4 Демографическая история

Все 8 популяций имели значение коэффициента $G-W > 0,68$ (табл. 17), что свидетельствует об отсутствии сигнала резкого снижения 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. 16). 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 – среднее значение по двум кернам (ST2GC и STX3GC) 269 спикул/грамм осадка в период 11-24 тыс. лет назад и среднее значение по двум кернам 7775 спикул/грамм в период 0-11 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).

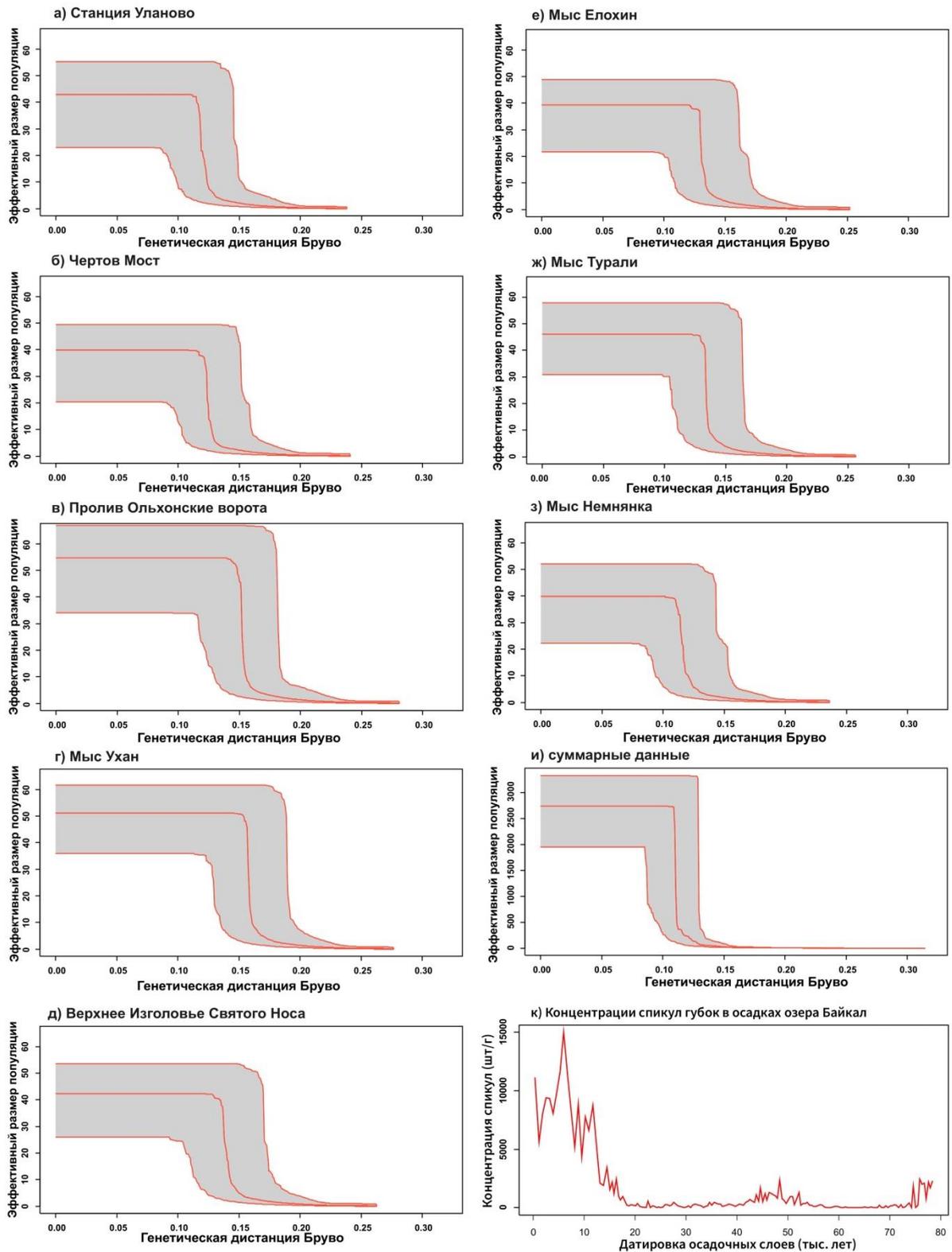


Рисунок 16. Реконструкция изменения эффективной численности популяций *L.baikalensis* во времени, от настоящего времени в прошлое слева направо, полученная методом generalized skyline plot (а-и); к- полученная согласно данным изменения концентраций спикул во времени, определенной с помощью анализа кернов (Вейнберг, 2005), (Yakhnenko et al., 2024a).

Ранговые тесты Вилкоксона при двух моделях (SMM и TPM) в программе BOTTLENECK не показали достоверного прохождения через

бутылочное горлышко ни для одной из популяций. Вероятно, мощности теста недостаточно для выявления демографических событий, происходивших несколько десятков тысяч лет назад. Изменения эффективной численности популяций во времени, соответствующие изменениям концентрации спикул в кернах, позволяют предположить, что основным фактором, повлиявшим на численность, был последний ледниковый максимум (24 тыс. лет назад). Помимо этого, в период завершения ледникового периода 11,8-13,4 тыс. лет назад, предположительно, произошло катастрофическое изменение уровня озера Байкал (Arzhannikov et al., 2018), что также могло внести вклад в снижение численности губок. Значения потока генов оказались достаточно низкими для всех популяций, кроме одного – из района мыса Турали в район мыса Немнянка (65.4), где он превышает в десятки раз значения для других точек (табл. 19). Несмотря на высокий уровень миграции, для популяции из района мыса Немнянка не было зафиксировано отклонения от равновесия Харди-Вайнберга.

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.

Для морских губок также наблюдаются случаи массовых заболеваний и гибели. Для некоторых видов удалось зафиксировать влияние этих событий на структуру популяций (Riesgo et al., 2019; Griffiths et al., 2021). Вероятнее

всего, события массовой гибели и заболеваний губок на Байкале начались позже и еще не успели нанести урон, который можно зафиксировать с помощью микросателлитных маркеров. Для пресноводных космополитных губок событий массовой гибели и заболеваний описано не было.

3.3.4 Анализ популяционно-генетической структуры *E. muelleri*

Из 48 образцов *E. muelleri* из двух районов зал. Малое Море озера Байкал (рис. 1, табл. 1) была выделена тотальная ДНК, получены ампликоны по 7 разработанным микросателлитным локусам (табл. 10) и проведен фрагментный анализ. Успешно генотипирован 41 образец, среди которых выявлено 24 уникальных гаплотипа, что, вероятно, связано с высоким уровнем клональности за счет расселения с помощью геммул, характерного для пресноводных губок. После удаления клонов набор данных состоял из 11 гаплотипов для оз. Ханхой и 13 – для бухты Хагден-Халэ (прил. 4). По результатам анализа с помощью Генероп 4.7 среди попарных сравнений на неравновесное сцепление во всех популяциях по 7 локусам, выявили три пары локусов, демонстрирующих неравновесное сцепление ($P\text{-value} < 0,05$) – *Lba_em367* и *Lba_em249*; *Lba_em367* и *Lba_em266*; *Lba_em249* и *Lba_em266*. Согласно анализу геномных данных *E. muelleri*, локусы *Lba_em249* и *Lba_em266* находятся в одной хромосоме (Scaffold 19), однако располагаются на расстоянии 4,8 млн п.н. друг от друга. Лocus *Lba_em367* располагается в другой хромосоме (Scaffold 19) (табл. 10). В связи с таким расположением локусов, $P\text{-value} < 0,05$ для неравновесного сцепления не повлияет на результаты анализа генетического разнообразия (Winans и др., 2018).

Показатели генетического разнообразия двух популяций *E. muelleri* представлены в Таблице 20, Наибольшее среднее число аллелей на locus (N_a) выявлено в популяции бухты Хагден-Халэ (4,57), тогда как среднее число эффективных аллелей (N_e) было немного выше в популяции оз. Ханхой (2,82). Наибольшее генетическое разнообразие наблюдалось в оз. Ханхой ($H_e = 0,627$). В обоих районах отмечен незначительный избыток гетерозигот. Полученные значения находятся в интервале от 0,4 до 0,9,

характерном для морских (Duran et al., 2004; Blanquer, Uriz, 2010; Dailianis et al., 2011; Pérez-Portela et al., 2015; Riesgo et al., 2016, 2019) и пресноводных (Li et al., 2018) видов. Значение Theta (H) незначительно отличается для обеих популяций $H=1,73$ для оз. Ханхой и $H=1,53$ для бухты Хагден-Халэ, что свидетельствует о схожих размерах эффективной численности двух популяций. Наибольшее значение диапазона аллелей зафиксировано для особей из бухты Хагден-Халэ (22), что может свидетельствовать о том, 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 говорит о снижении эффективной численности в недавнем прошлом. Значения Fis оказались крайне низкими и отрицательными для обеих популяций (Fis=-0,038 для оз. Ханхой и Fis=0,046 для бухты Хагден-Халэ).

Таблица 20. Основные параметры генетического разнообразия по двум популяциям *E. muelleri*

Популяция	N	Na	Ne	H obs.	H exp.	HWE P-value	Theta (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

Примечание. 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.

В каждом районе отбора образцов присутствуют частные аллели, что свидетельствует о наличии некоторой генетической изоляции между районами. Согласно результатам теста на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, обе популяции находятся в равновесии по всем локусам (табл. 12, 20). Значение F_{ST} посчитали по 6 локусам из 7, т.к. один из локусов имел >20% недостающих данных, и составило 0,152 (P-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 таком небольшом расстоянии в озере Байкал в целом соответствует уровням генетической дифференциации, оцененной для спонгилид, обитающих в системе рек (Li et al., 2018), где на расстоянии до 20 км было выявлено значение $F_{ST}=0,178$ между двумя популяциями. Кластерный анализ, проведенный с помощью программ Structure и Structure Selector, показал принадлежность всех гаплотипов к одному кластеру, что соотносится с результатами, ранее полученными для *L. baikalensis*, где образцы из районов, F_{ST} между которыми составляло $<0,2$ попадали в один кластер, а $>0,2$ – в разные. Полученные данные согласуются с литературными, где было показано, что для определения основных параметров структуры популяций необходимо использовать от 7 до 12 микросателлитных локусов (Blanquer, Uriz, 2010; González-Ramos et al, 2015). Разработанные микросателлитные маркеры могут быть с успехом использованы для проведения популяционно-генетических исследований космополитной губки *E. muelleri*.

Дендрограммы строили методами UPGMA и NJ (рис. 17) на основе генетических дистанций Бруво, рассчитанных по 7 микросателлитным маркерам. Обе дендрограммы имели схожую кластеризацию. Образцы, собранные в разных районах (бухта Хагден-Халэ и оз. Ханхой) делятся на два кластера, за исключением образцов E_{mu}_604 и E_{mu}_584, попавших в кластеры с образцами из соседнего района. Кластеризация на дендрограмме, как и полученные значения F_{ST} , свидетельствуют о наличии пространственно-генетической структуры *E. muelleri* в районе залива Малое Море. Кластерный анализ методом ΔK не выявил наличия нескольких групп среди образцов *E. muelleri*, что согласуется полученными данными для *L. baikalensis* и для межвидового анализа четырех видов Lubomirskiidae, где в один кластер стабильно попадали образцы из разных районов, если значение F_{ST} между ними не превышало 0,2.

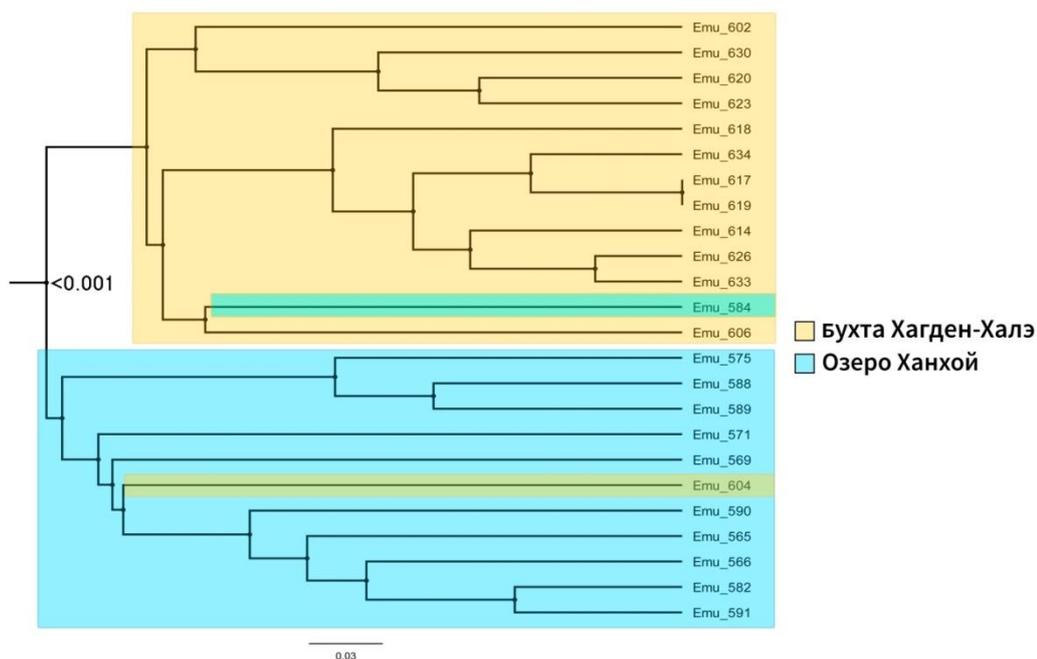


Рисунок 17. Дендрограмма, основанная на дистанциях Бруво, рассчитанных по 7 микросателлитным локусам для двух популяций *E. muelleri*, построенная по методу UPGMA.

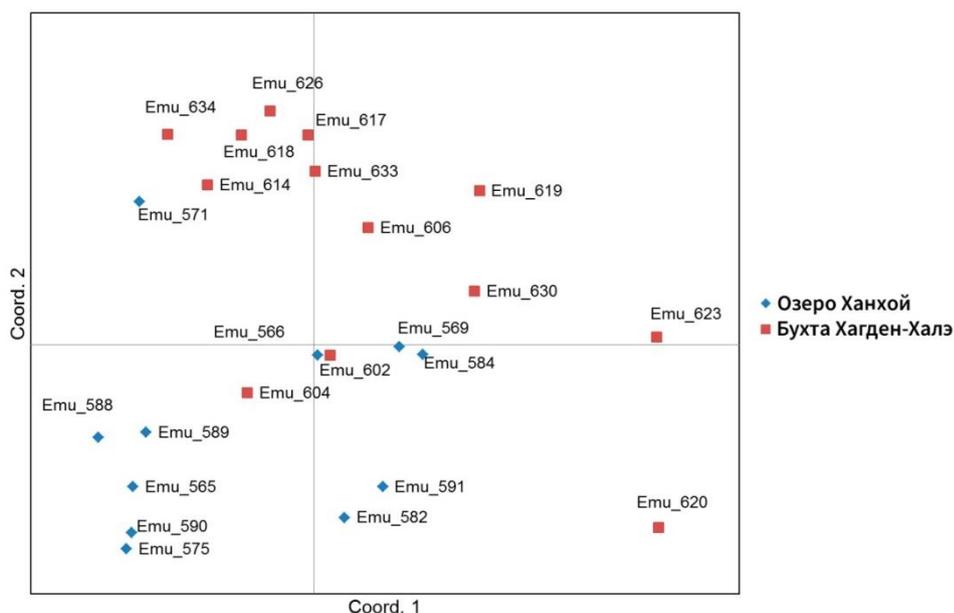


Рисунок 18. Анализ главных координат для двух популяций *E. muelleri* по 7 микросателлитным локусам.

Анализ главных координат представлен на рисунке 18, где на первые две оси приходится $>47\%$ разнообразия. На графике видно, что популяции группируются в отдельные кластеры, однако кластеры частично пересекаются. Таким образом, с помощью микросателлитных маркеров была изучена популяционно-генетическая структура *E. muelleri*. Было показано наличие генетической подразделенности вида *E. muelleri* 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 родственным 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 *Swartchewskaia*.

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 таргетных 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 ЛИТЕРАТУРЫ

Алексеева Н.П. Организация паренхимулы эндемичной байкальской губки *Swartchewsikia papyracea* (Dyb.) // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1980. Т. 79. № 12. С. 74–80.

Байкал (атлас) / ред. Г. И. Галазий. – М.: Изд-во Федеральной службы геодезии и картографии России, 1993.

Бормотов А.Е. Что случилось с байкальскими губками? // Наука из первых рук. 2011. № 5. С. 20–23.

Вейнберг Е.В. Спонгиофауна плиоцен-четвертичных отложений Байкала. Санкт-Петербургский Государственный Университет, 2005. 255 с.

Гладких А.С., Калюжная О.В., Белых О.И., Ан Т.С., Парфенова В.В. Анализ бактериального сообщества двух эндемичных видов губок из озера Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. № 6. С. 682–693.

Груздева М.А., Семенова А.В., Кузищин К.В., Пономарева Е.В., Волков А.А., Павлов Д.С. Генетическая изменчивость мальмы (*Salvelinus malma*), кунджи (*S. leucomaenis*) и межвидовых гибридов из реки Утхолок (Северо-Западная Камчатка) // Генетика. 2020. Т. 56. № 1. С. 78–88.

Деникина Н.Н., Дзюба Е.В., Белькова Н.Л., Ханаев И.В., Феранчук С.И., Макаров М.М., Гранин Н.Г., Беликов С.И. Первый случай заболевания губки *Lubomirskia baicalensis*: исследование микробиома // Известия Российской Академии Наук. Серия биологическая. 2016. Т. 43, № 3. С. 263–270.

Ефремова С.М. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна / ред. О.А. Тимошкин, Т.Я. Ситникова, О.Т. Русинек и др. – Новосибирск: Наука, 2001. Т. 1: Озеро Байкал, кн. 1. 832 с.

Ефремова С.М. Новый род и новые виды губок сем. *Lubomirskiidae* Rezvoj, 1936 // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна / Под ред. Тимошкина О.А. и др. Новосибирск: Наука, 2004. Т. 1. Кн. 2. С. 1261–1278.

Животовский Л.А., Шайхаев Е.Г., Шитова М.В. Идентификация лососевых рыб по микросателлитным маркерам с использованием

идентичного набора ПЦР-праймеров // Биология моря. 2013. Т. 39, № 6. С. 459–466.

Калюжная О.В., Ицкович В.Б. Влияние обесцвечивания байкальской губки на таксономический состав симбиотических микроорганизмов // Генетика. 2015. Т. 51, № 11. С. 1335–1340.

Калюжная О.В., Кривич А.А., Ицкович В.Б. Разнообразие генов 16S рРНК в метагеномном сообществе пресноводной губки *Lubomirskia baicalensis* // Генетика. 2012. Т. 48, № 8. С. 1003–1006.

Кожов М.М. Биология озера Байкал. – М.: АН СССР, 1962. 317 с.

Майкова О., Щербаков Д. Особенности эволюции митохондриальной днк байкальских эндемичных губок. I. Митохондриальный геном *Swartschewskia khanaevi* // Генетика. 2023. Т. 59, № 2. С. 170–175.

Мальник В.В., Штыкова Ю.Р., Сутурин А.Н., Тимошкин О.А. Влияние населенных пунктов на санитарно-микробиологическое состояние малых притоков и прибрежных вод на примере залива Лиственничный (Южный Байкал) // География и природные ресурсы. 2019. № 4. С. 84–92.

Мац В.Д., Уфимцев Г.Ф., Мандельбаум М.М., Алакшин А.М., Поспеев А.В., Шимараев М.Н., Хлыстов О.М. Кайнозой Байкальской рифтовой впадины: Строение и геологическая история. Новосибирск: Наука, 2001. 252 с.

Парфенова В.В., Теркина И.А., Косторнова Т.Я., Никулина И.Г., Черных В.И., Максимова Э.А. Микробное сообщество пресноводных губок озера Байкал // Известия РАН. Серия биология. 2008. № 4. С. 435–441.

Рундина Л.А. Зигнемовые водоросли России (Chlorophyta: Zygnematomphuseae, Zygnematales) // Санкт-Петербург: Наука, 1998. 351 с.

Семитуркина Н.А., Ефремова С.М., Тимошкин О.А. Новые сведения о биологии спонгиллид (Spongia: Spongillidae) открытого Байкала // Известия Иркутского Государственного Университета. Серия: Биология. Экология. 2011. Т. 4, № 1. С. 73–80.

Талиев С.Д., Кожова О.М., Моложавая О.А. Углеродородокисляющие микроорганизмы в биоценозах некоторых районов озера Байкал. Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ // Новосибирск: Наука, 1985. С. 64–74.

Тимошкин О.А. Сложившиеся тенденции и современный уровень решения проблемы; наиболее интересные открытия в области биоразнообразия Байкала за последние годы // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна / ред. Тимошкин О.А., В.И. Провиз, Т.Я. Ситникова и др. – Новосибирск: Наука, 2010-2011. – Т. 2: Водоемы и водотоки юга Восточной Сибири и Северной Монголии, кн. 2. – 1668 с.

Тимошкин О.А., Сакирко М., Анненков В., Чебыкин Е. и др. Байкал:экология. О чрезвычайной ситуации в районе Северобайкальска //Аргументы недели. От 13.03.2014. 2014. С. 16–17.

Шимараев М. Н., Троицкая Е. С., Гнатовский Р. Ю. Современные изменения климата и температура глубинных вод озера Байкал // Доклады Академии наук. 2009. Т. 426, № 5. С. 685–689.

Afgan E., Baker D., Batut B., Beek M. Van Den, Bouvier D., Ech M., Chilton J., Clements D., Coraor N., Grüning B.A., Guerler A., Hillman-Jackson J., Hiltmann S., Jalili V., Rasche H., Soranzo N., Goecks J., Taylor J., Nekrutenko A., Blankenberg D. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update // Nucleic Acids Research. 2018. Vol. 46, № 1. P. 537–544.

Aguirre-Liguori J.A., Luna-Sánchez J.A., Gasca-Pineda J., Eguiarte L.E. Evaluation of the minimum sampling design for population genomic and microsatellite studies: an analysis based on Wild Maize // Frontiers in Genetics. 2020. Vol. 11, № 9. P. 1–16.

Anderson C.M. Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 December 2009-31 January 2010 // Molecular Ecology Resources. 2010. Vol. 10, № 3. P. 576–579.

Arzhannikov S.G., Ivanov A.V., Arzhannikova A.V., Demonterova E.I., Jansen J.D., Preusser F., Kamenetsky V.S., Kamenetsky M.B. Catastrophic events in the Quaternary outflow history of Lake Baikal // *Earth-Science Reviews*. 2018. Vol. 177. P. 76–113.

Arzhannikov S., Arzhannikova A., Ivanov A., Demonterova E., Yakhnenko A., Gorovoy V. Jansen J. Lake Baikal highstand during MIS 3 recorded by palaeo-shorelines on Bolshoi Ushkanii Island // *Boreas*. 2020. Vol. 50. P. 101–113.

Barbará T., Palma-Silva C., Paggi G.M., Bered F., Fay M.F., Lexer C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations // *Molecular Ecology*. 2007. Vol. 16, № 18. P. 3759–3767.

BDP-99 Baikal Drilling Project Members, 2005. A new Quaternary record of regional tectonic, sedimentation and paleoclimate changes from drill core BDP-99 at Posolskaya Banka // *Quaternary International*. Vol. 136. P. 105–121.

Belikov S., Belkova N., Butina T., Chernogor L., Kley A.M. Van, Nalian A., Rorex C., Khanaev I., Maikova O., Feranchuk S. Diversity and shifts of the bacterial community associated with Baikal sponge mass mortalities // *PLoS ONE*. 2019. Vol. 14, № 3. e0213926.

Bell J.J., Barnes D.K.A., Turner J.R. The importance of micro and macro morphological variation in the adaptation of a sublittoral demosponge to current extremes // *Marine Biology*. 2002. Vol. 140. P. 75–81.

Bilton D.T., Freeland Jr., Okamura B. Dispersal in freshwater invertebrates // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2001. Vol. 32. P. 159–181.

Blanquer A., Uriz M.J. Population genetics at three spatial scales of a rare sponge living in fragmented habitats // *BMC Evolutionary Biology*. 2010. Vol. 10, № 13. P. 1–9.

Blanquer A., Uriz M.J., Caujapé-Castells J. Small-scale spatial genetic structure In *Scopalina lophyropoda*, an encrusting sponge with philopatric larval dispersal and frequent fission and fusion events // *Marine Ecology Progress Series*. 2009. Vol. 380. P. 95–102.

Blanquer A., Uriz M.J., Pascual M. Polymorphic microsatellite loci isolated from the marine sponge *Scopalina lophyropoda* (Demospongiae: Halichondrida) // Molecular Ecology Notes. 2005. Vol. 5, № 3. P. 466–468.

Bruvo R., Michiels N.K., D'Souza T.G., Schulenburg H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level // Molecular Ecology. 2004. Vol. 13, № 7. P. 2101–2106.

Bukshuk N.A., Maikova O.O. A new species of Baikal endemic sponges (Porifera, Demospongiae, Spongillida, Lubomirskiidae) // ZooKeys. 2020. Vol. 906. P. 113–130.

Calcabrini C, Catanzaro E, Bishayee A, Turrini E, Fimognari C. Marine sponge natural products with anticancer potential: an updated review // Marine Drugs. 2017. Vol. 15, № 10. P. 310.

Calderón I., Ortega N., Duran S., Becerro M., Pascual M., Turon X. Finding the relevant scale: Clonality and genetic structure in a marine invertebrate (*Crambe crambe*, Porifera) // Molecular Ecology. 2007. Vol. 16, № 9. P. 1799–1810.

Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications // BMC Bioinformatics. 2009. Vol. 10, № 421. P. 1–9.

Cárdenas P., Xavier J., Tendal O.S., Schander C., Rapp H.T. Redescription and resurrection of *Pachymatisma normani* (Demospongiae: Geodiidae), with remarks on the genus *Pachymatisma* // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 2007. Vol. 87. P. 1511–1525.

Cervino J.M., Winiarski-Cervino K., Poison S.W., Goreau T., Smith G.W. Identification of bacteria associated with a disease affecting the marine sponge *Ianthella basta* in New Britain, Papua New Guinea // Marine Ecology Progress Series. 2006. Vol. 324. P. 139–150.

Chebykin E.P., Edgington D.N., Goldberg E.L., Phedorin M.A., Kulikova N.S., Zheleznyakova T.O., Vorobyova S.S., Khlystov O.M., Levina O.V., Ziborova G.A., Grachev M.A. Uranium-series isotopes as proxies of Late

Pleistocene climate and geochronometers in bottom sediments of Lake Baikal // Russian Geology and Geophysics. 2004. Vol. 45, № 5. P. 539–556.

Dailianis T., Tsigenopoulos C.S., Dounas C., Voultziadou E. Genetic diversity of the imperilled bath sponge *Spongia officinalis* Linnaeus, 1759 across the Mediterranean Sea: patterns of population differentiation and implications for taxonomy and conservation // Molecular Ecology. 2011. Vol. 20, № 18. P. 3757–3772.

DeBiasse M.B., Richards V.P., Shivji M.S., Hellberg M.E. Shared phylogeographical breaks in a Caribbean coral reef sponge and its invertebrate commensals // Journal of Biogeography. 2016. Vol. 43, № 11. P. 2136–2146.

Denikina N.N., Dzyuba E.V., Belkova N.L., Khanaev I.V., Feranchuk S.I., Makarov M.M., Granin N.G., Belikov S.I., The First Case of Disease of the Sponge *Lubomirskia baicalensis*: Investigation of Its Microbiome // Izvestiya Akademii Nauk, Seriya Biologicheskaya. 2016. Vol. 3. P. 315–322.

Duran S., Pascual M., Estoup A., Turon X. Polymorphic microsatellite loci in the sponge *Crambe crambe* (Porifera: Poecilosclerida) and their variation in two distant populations // Molecular Ecology Notes. 2002. Vol. 2, № 4. P. 478–480.

Duran S., Pascual M., Estoup A., Turon X. Strong population structure in the marine sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) as revealed by microsatellite markers // Molecular Ecology. 2004. Vol. 13, № 3. P. 511–522.

Duran S., Pascual M., Turon X. Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) // Marine Biology. 2004. Vol. 144, № 1. P. 31–35.

Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genetics Resources. 2012. Vol. 4, № 2. P. 359–361.

Ekins M., Erpenbeck D., Wörheide G., Hooper J.N.A. A new species of lithistid sponge hiding within the *Isabella mirabilis* species complex (Porifera:

Demospongiae: Tetractinellida) from seamounts of the Norfolk Ridge // *Zootaxa*. 2016. Vol. 4136, № 3. P. 433–460.

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // *Molecular Ecology*. 2005. Vol. 14, № 8. P. 2611–2620.

Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Molecular Ecology Resources*. 2010. Vol. 10, № 3. P. 564–567.

Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // *Genetics*. 1992. Vol. 131, № 2. P. 479–491.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. Vol. 3, № 5. P. 294–299.

Freeland J., Kirk H., Petersen S. *Molecular genetics in ecology*. Molecular Ecology. Wiley–Blackwell, 2011. 464 p.

Frost T.M., de Nagy G.S., Gilbert J.J. Population dynamics and standing biomass of the freshwater sponge *Spongilla lacustris* // *Ecology*. 1982. Vol. 63, № 5. P. 1203–1210.

Galazii G.I. Le lac Baikal en sursis // *La recherche*. 1990. Vol. 221, № 21. P. 628–637.

Garza J., Williamson E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci // *Molecular Ecology*. 2001. Vol. 10. P. 305–318.

Gemayel R., Cho J., Boeynaems S., Verstrepen K.J. Beyond Junk-Variable Tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences // *Genes*. 2012. Vol. 3. P. 461–480.

Giles E.C., Saenz-Agudelo P., Berumen M.L., Ravasi T. Novel polymorphic microsatellite markers developed for a common reef sponge, *Stylissa carteri* // *Marine Biodiversity*. 2013. Vol. 43, № 3. P. 237–241.

Giles E.C., Saenz-Agudelo P., Hussey N.E., Ravasi T., Berumen M.L. Exploring seascape genetics and kinship in the reef sponge *Stylissa carteri* in the Red Sea // Ecology and Evolution. 2015. Vol. 5, № 13. P. 2487–2502.

Girard E.B., Fuchs A., Kaliwoda M., Lasut M., Ploetz E., Schmahl W.W., Wörheide G. Sponges as bioindicators for microparticulate pollutants? // Environmental Pollution. 2021. Vol. 268. P. 115851.

González-Ramos J., Agell G., Uriz M.J. Microsatellites from sponge genomes: The number necessary for detecting genetic structure in *Hemimycale columella* populations // Aquatic Biology. 2015. Vol. 24, № 1. P. 25–34.

Grachev M.A., Vorobyova S.S., Likhoshway Y.V., Goldberg E.L., Ziborova G.A., Levina O.V., Khlystov O.M. A high-resolution diatom record of the paleoclimate of East Siberia for the last 2.5 My from Lake Baikal // Quaternary Science Reviews. 1998. Vol. 17. P. 1101–1106.

Griffiths S.M., Butler M.J., Behringer D.C., Pérez T., Preziosi R.F. Oceanographic features and limited dispersal shape the population genetic structure of the vase sponge *Ircinia campana* in the Greater Caribbean // Heredity. 2021. Vol. 126, № 1. P. 63–76.

Gui J.F., Zhou L. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio* // Science China Life Sciences. 2010. Vol. 53. P. 409–415.

Gustincich S., Manfioletti G., Sal G. Del, Schneider C., Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood // BioTechniques. 1991. Vol. 11, № 3. P. 298–300.

Hale M.L., Burg T.M., Steeves T.E. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 Individuals per population is Enough to accurately estimate allele frequencies // PLoS ONE. 2012. Vol. 7, № 9. P. e45170.

Hall T.A. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT // Nucleic Acids Symposium Series. 1999. Vol. 41. P. 95–98.

Hentschel U., Usher K.M., Taylor M.W. Marine sponges as microbial fermenters // FEMS Microbiology and Ecology. 2006. Vol. 55. P. 167–177.

Hu J., Gao L., Xu Y., Li Q., Zhu H., Yang L., Li J., Sun S., Shavrukov Y. Microsatellite markers reveal genetic diversity and relationships within a Melon Collection mainly comprising Asian Cultivated and Wild Germplasms // BioMed Research International. 2019. Article ID 7495609. P. 1–11.

Hulce D., Li X., Snyder-Leiby T., Liu C.S. GeneMarker® Genotyping software: tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis // Journal of Biomolecular Techniques. 2011. Vol. 22. P. 35–36.

Hutchinson D.R., Golmshtok A.J., Zonenshain L.P., Moore T.C., Scholz C.A., Klitgort K.D. Depositional and tectonic framework of the rift basins of Lake Baikal from multichannel seismic data // Geology. 1992. Vol. 20. P. 589–592.

Itskovich V. Intragenomic variation of rDNA internal transcribed spacers in the endemic Baikal sponge *Lubomirskia baikalensis* (Pallas, 1776) (Spongillida, Lubomirskiidae): Implications for Porifera barcoding // J. Great Lakes Research 2020. Vol. 46, № 1. P. 62–66.

Itskovich V., Belikov S. I., Efremova S.M., Masuda Y., Pérez T., Alivon E., Borchiellini C., Boury-Esnault N. Phylogenetic relationships between freshwater and marine Haplosclerida (Porifera, Demospongiae) based on the full length 18S rRNA and partial COXI gene sequences // In: Porifera research: Biodiversity, innovation and sustainability. Rio de Janeiro. 2007. P. 383–391.

Itskovich V., Gontcharov A., Masuda Y., Nohno T., Belikov S., Efremova S., Meixner M., Janussen D. Ribosomal ITS sequences allow resolution of freshwater sponge phylogeny with alignments guided by secondary structure prediction // Journal of Molecular Evolution. 2008. Vol. 67, № 6. P. 608–620.

Itskovich V., Kaluzhnaya O., Glyzina O. The Utility of 28S rDNA for Barcoding of Freshwater Sponges (Porifera, Spongillida) // Diversity. 2022. Vol. 14, № 12. P. 1–9.

Itskovich V., Kaluzhnaya O., Ostrovsky I., McCormack G. The number of endemic species of freshwater sponges (Malawispongiidae; Spongillina; Porifera)

from Lake Kinneret is overestimated // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2013. Vol. 51, № 3. P. 252–257.

Itskovich V.B., Belikov S.I., Efremova S.M. Masuda Y., Krasko A., Schroeder H.C., Mueller W.E. Monophyletic origin of freshwater sponges in ancient lakes based on partial structures of COXI gene // *Hydrobiologia*. 2006. Vol. 568 (Suppl. 1). P. 155–159.

Itskovich V.B., Kaluzhnaya O.V., Veynberg E., Erpenbeck D. Endemic Lake Baikal sponges from deep water. 1: Potential cryptic speciation and discovery of living species known only from fossils // *Zootaxa*. 2015. Vol. 3990, № 1. P. 123–137.

Itskovich V.B., Kaluzhnaya O.V., Veynberg E., Erpenbeck D. Endemic Lake Baikal sponges from deep water. 2: Taxonomy and bathymetric distribution // *Zootaxa*. 2017. Vol. 4236, № 2. P. 335–342.

Itskovich V.B., Shigarova A.M., Glyzina O.Y., Kaluzhnaya O. V., Borovskii G.B. Heat shock protein 70 (Hsp70) response to elevated temperatures in the endemic Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* // *Ecological Indicators*. 2018. Vol. 88. P. 1–7.

Itskovich V.B., Shigarova A.M., Glyzina O.Y., Kaluzhnaya O.V., Borovskii G.B., Selvin J. Sponges Lubomirskiidae as bioindicators of the state of Lake Baikal // *Limnology and Freshwater Biology*. 2019, № 1. P. 172–176.

Jaguś A., Rzętała M.A., Rzętała M. Water storage possibilities in Lake Baikal and in reservoirs impounded by the dams of the Angara River cascade // *Environmental Earth Sciences*. 2015. Vol. 73, № 2. P. 621–628.

Kalyaanamoorthy S., Minh B., Wong T., Haeseler A., Lars S Jermin L. S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nature Methods*. 2017. Vol 14. P. 587–589.

Kamaltynov R.M., Chernykh V.I., Slugina Z.V., Karabanov E.B. The conorcium of the sponge *Lubomirskia baicalensis* in Lake Baikal, East Siberia // *Hydrobiologia*. 1993. Vol. 271. P. 179–189.

Kamvar Z.N., Tabima J.F., Grünwald N.J. Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction // PeerJ. 2014. Vol. 2014, № 1. P. 1-14.

Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // Briefings in Bioinformatics. 2018. Vol. 20, № 4. P. 1160-1166.

Keller-Costa T., Jousset A., van Overbeek L., van Elsas J.D., Costa R. The freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* Harbours diverse *Pseudomonas* species (Gammaproteobacteria, Pseudomonadales) with broad-spectrum antimicrobial activity // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 2. e88429.

Kenny N.J., Francis W.R., Rivera-Vicéns R.E., Juravel K., Mendoza A. de, Díez-Vives C., Lister R., Bezares-Calderón L.A., Grombacher L., Roller M., Barlow L.D., Camilli S., Ryan J.F., Wörheide G., Hill A.L., Riesgo A., Leys S.P. Tracing animal genomic evolution with the chromosomal-level assembly of the freshwater sponge *Ephydatia muelleri* // Nature Communications. 2020. Vol. 11, № 1. P. 3676.

Kenny N.J., Itskovich V.B. Phylogenomic inference of the interrelationships of Lake Baikal sponges // Systematics and Biodiversity. 2021. Vol. 19, № 2. P. 209–217.

Kenny N.J., Plese B., Riesgo A., Itskovich V.B. Symbiosis, selection, and novelty: freshwater adaptation in the unique sponges of Lake Baikal // Molecular Biology and Evolution. 2019. Vol. 36, № 11. P. 2462–2480.

Khanaev I.V., Kravtsova L.S., Maikova O.O., Bukshuk N.A., Sakirko M.V., Kulakova N.V., Butina T.V., Nebesnykh I.A., Belikov S.I. Current state of the sponge fauna (Porifera: Lubomirskiidae) of Lake Baikal: Sponge disease and the problem of conservation of diversity // Journal of Great Lakes Research. 2018. Vol. 44, № 1. P. 77–85.

Khlystov O.M, Poort J., Mazzini A., Akhmanov G.G., Minami H., Hachikubo A., Khabuev A.V., Kazakov A.V., De Batist M., Naudts L., Chensky

A.G., Vorobeva S.S. Shallow-rooted mud volcanism in Lake Baikal // *Marine and Petroleum Geology*. 2019. Vol. 102. P. 580–589.

Khodzher T.V., Domysheva V.M., Sorokovikova L.M., Sakirko M.V., Tomberg I.V. Current chemical composition of Lake Baikal water // *Inland Waters*. 2017. Vol. 7, № 3. P. 250–258.

Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V., Pomazkina G.V., Rodionova E.V., Domysheva V.M., Sakirko M.V., Tomberg I.V., Kostornova T.Ya., Kravchenko O.S., Kupchinsky A.B. Nearshore benthic blooms of filamentous green algae in Lake Baikal // *Journal of Great Lakes Research*. 2014. Vol. 40. P. 441–448.

Kulakova N.V., Sakirko M.V., Adelshin R.V., Khanaev I.V., Nebesnykh I.A., Pérez T. Brown Rot Syndrome and changes in the bacterial community of the Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* // *Microbial Ecology*. 2018. Vol. 75, № 4. P. 1024–1034.

Kulikova N.N., Saibatalova E. V., Boiko SM, Bukshuk N., Belozeroва O. Y., Mekhonoshin A. S., Timoshkin O. A., Suturin A. N. Biogeochemistry of encrusting sponges of the family Lubomirskiidae in Southern Lake Baikal // *Geochemistry International*. 2013. Vol. 51, № 4. P. 326–337.

Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 2002. Vol. 11. P. 2453–2465.

Li C.W., Chen J.Y., Hua T.E. Precambrian sponges with cellular structures // *Science*. 1998. Vol. 249. P. 879–882.

Li R., Nitsche F., Arndt H. Mesoscale investigations based on microsatellite analysis of the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* in the River-Sieg system (Germany) reveal a genetic divergence // *Conservation Genetics*. 2018. Vol. 19. P. 959–968.

Li Y.-L., Liu J.-X. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods // *Molecular Ecology Resources*. 2018. Vol. 18. P. 176–177.

López-Legentil S., Pawlik J.R. Genetic structure of the Caribbean giant barrel sponge *Xestospongia muta* using the I3-M11 partition of COI // Coral Reefs. 2009. Vol. 28. P. 157–165.

López-Legentil S., Erwin P.M., Pawlik J.R., Song B. Effects of sponge bleaching on ammonia-oxidizing Archaea: distribution and relative expression of ammonia monooxygenase genes associated with the barrel sponge *Xestospongia muta* // Microbial Ecology. 2010. Vol. 60 № 3. P. 561–571.

Loska K., Wiechula D. Application of principal component analysis for the estimation of source of heavy metal contamination in surface sediments from the Rybnik Reservoir // Chemosphere. 2003. Vol. 51 № 8. P. 723–33.

Lucentini L., Gigliarelli L., Puletti M.E., Palomba A., Caldelli A., Fontaneto D., Panara F. Spatially explicit genetic structure in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* (Linnaeus, 1759) within the framework of the monopolisation hypothesis // Journal of Limnology. 2013. Vol. 72, № 1. P. 172–181.

Maikova O., Khanaev I., Belikov S., Sherbakov D. Two hypotheses of the evolution of endemic sponges in Lake Baikal (Lubomirskiidae) // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. 2015. Vol. 53, № 2. P. 175–179.

Maldonado M., Riesgo A., Reproduction in the Phylum Porifera: a synoptic overview // Treballs de la Societat Catalana de Biologia. 2008. Vol. 59. P. 29–49.

Manconi R., Pronzato R. Phylum Porifera // Keys to Palearctic fauna: Thorp and Covich's freshwater invertebrates / eds.: Damborenea C., Rogers D.C., Thorp J.H. Elsevier, 2019. Vol. 4–4. P. 43–92.

Manconi R., Pronzato R. Global diversity of sponges (Porifera: Spongillina) in freshwater // Hydrobiologia 2008. Vol. 595. P. 27–33.

Masuda Y. Studies on the Taxonomy and Distribution of Freshwater Sponges in Lake Baikal // Biosilica in Evolution, Morphogenesis, and Nanobiotechnology. Progress in Molecular and Subcellular Biology / eds.: Müller W.E.G., Grachev M.A. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. Vol 47. P. 81–110.

Meixner M.J., Lüter C., Eckert C., Itskovich V., Janussen D., Rintelen T. von, Bohne A.V., Meixner J.M., Hess W.R. Phylogenetic analysis of freshwater sponges provide evidence for endemism and radiation in ancient lakes // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007. Vol. 45, № 3. P. 875–886.

Minh Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M.D., Haeseler A., Lanfear R. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era // *Molecular Biology and Evolution*. 2020. Vol. 37. P. 1530–1534.

Mokhtar M.M., Atia M.A.M. SSRome: An integrated database and pipelines for exploring microsatellites in all organisms // *Nucleic Acids Research*. 2019. Vol. 47, № 1. P. 244–252.

Morais S.R., K C, Jeyabalan S, Wong LS, Sekar M, Chidambaram K., Gan S.H., Begum M.Y., Izzati Mat Rani N.N., Subramaniyan V., Fuloria S., Fuloria N.K., Safi S.Z., Sathasivam K.V., Selvaraj S., Sharma V.K. Anticancer potential of *Spirastrella pachyspira* (marine sponge) against SK-BR-3 human breast cancer cell line and in silico analysis of its bioactive molecule sphingosine // *Frontiers in Marine Science*. 2022. Vol. 9. P. 950880.

Ning H.J., Gui F.F., Tian E.W., Yang L.Y. The novel developed microsatellite markers revealed potential hybridization among *Cymbidium* species and the interspecies sub-division of *C. goeringii* and *C. ensifolium* // *BMC Plant Biology*. 2023. Vol. 23, № 1. P. 492.

Noor M.A.F., Feder J.L. Speciation genetics: evolving approaches // *Nature Reviews Genetics*. 2006. Vol. 7, № 11. P. 851–861.

Noyer C. Agell G. Pascual M. Becerro M. Isolation and characterization of microsatellite loci from the endangered Mediterranean sponge *Spongia agaricina* (Demospongiae: Dictyoceratida) // *Conservation Genetics*. 2009. Vol. 10, № 6. P. 1895–1898.

O'Donnell W.T., Warren S.T. A decade of molecular studies of fragile X syndrome // *Neurosciences*. 2002. Vol. 25. P. 315–338.

Oosterhout C. Van, Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // *Molecular Ecology Notes*. 2004. Vol. 4, № 3. P. 535–538.

Osipov E.Y., Khlystov O.M. Glaciers and meltwater flux to Lake Baikal during the Last Glacial Maximum // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2010. Vol. 294, № 1–2. P. 4–15.

Padua A., Cunha H.A., Klautau M. Gene flow and differentiation in a native calcareous sponge (Porifera) with unknown dispersal phase: population structure of *C. aurea* // *Marine Biodiversity*. 2018. Vol. 48, № 4. P. 2125–2135.

Palumbi S.R. How body plans limit acclimation: responses of a demosponge to wave force // *Ecology*. 1986. Vol. 67, № 1. P. 208–214.

Paradis E. Pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach // *Bioinformatics*. 2010. Vol. 26, № 3. P. 419–420.

Paradis E., Claude J., Strimmer K. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language // *Bioinformatics*. 2004. Vol. 20, № 2. P. 289–290.

Peakall R., Gilmore S., Keys W., Morgante M., Rafalski A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants // *Mol. Biol. Evol.* 1998. Vol. 15. P. 1275–1287.

Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. 2006. Vol. 6, № 1. P. 288–295.

Pérez-Jiménez M., Besnard G., Dorado G., Hernandez P. Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, № 8. e70507.

Pérez-Portela R., Noyer C., Becerro M.A. Genetic structure and diversity of the endangered bath sponge *Spongia lamella* // *Aquatic Conservation*. 2015. Vol. 25, № 3. P. 365–379.

Pérez-Portela R., Riesgo A. Population Genomics of Early-Splitting Lineages of Metazoans // Population genomics: marine organisms / eds.: Oleksiak M., Rajora O. Population Genomics. Springer, 2018. № 2. P. 103–137.

Phumichai C., Phumichai T., Wongkaew A. Novel chloroplast microsatellite (cpSSR) markers for genetic diversity assessment of cultivated and wild *Hevea rubber* // Plant Molecular Biology Reporter. 2015. Vol. 33. P. 1486–1498.

Pile A.J., Patterson M.R., Savarese M., Chernykh V.I., Fialkov V.A. Trophic effects of sponge feeding within Lake Baikal's littoral zone. 2. Sponge abundance, diet, feeding efficiency, and carbon flux // Limnology and Oceanography. 1997. Vol. 42, № 1. P. 178–184.

Pile A. J., Patterson M. R., Witman J. D. In situ grazing on plankton <10 mkm by the boreal sponge *Mycale Lingua* // VIMS Articles. 1996. Vol. 204, № 141. P. 95–102.

Piry S., Luikart G., Cornuet J.M. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data // Journal of Heredity. 1999. Vol. 90, № 4. P. 502–503.

Pöppe J., Sutcliffe P., Hooper J.N.A., Wörheide G., Erpenbeck D. CO I barcoding reveals new clades and radiation patterns of indo-pacific sponges of the family irciniidae (Demospongiae: Dictyoceratida) // PLoS ONE. 2010. Vol. 5, № 4. e9950.

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. Vol. 155, № 2. P. 945–959.

Raleigh J., Redmond N.E., Delahan E., Torpey S., Soest R.W.M. Van, Kelly M., McCormack G.P. Mitochondrial Cytochrome oxidase 1 phylogeny supports alternative taxonomic scheme for the marine Haplosclerida // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 2007. Vol. 87, № 6. P. 1577–1584.

Raymond M., Rousset F. Genepop (V.1.2). A population software for exact tests and ecumenicism // Journal of Heredity. 1995. Vol. 86, № 3. P. 248–249.

Reiner G., Lang M., Willems H. Impact of different panels of microsatellite loci, different numbers of loci, sample sizes, and gender ratios on population

genetic results in red deer // *European Journal of Wildlife Research*. 2019. Vol. 65, № 25.

Reiswig H.M., Frost T.M. Porifera. In: *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates* // Elsevier. 2010. P. 97–172.

Rico C., Rico I., Hewitt G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1996. Vol. 263. P. 549–557.

Riesgo A., Pérez-Portela R., Pita L., Blasco G., Erwin P.M., López-Legentil S. Population structure and connectivity in the Mediterranean sponge *Ircinia fasciculata* are affected by mass mortalities and hybridization // *Heredity*. 2016. Vol. 117. P. 427–439.

Riesgo A., Taboada S., Pérez-Portela R., Melis P., Xavier J., Blasco G., López-Legentil S. Genetic diversity, connectivity and gene flow along the distribution of the emblematic Atlanto-Mediterranean sponge *Petrosia ficiformis* (Haplosclerida, Demospongiae) // *BMC Evolutionary Biology*. 2019. Vol. 19, № 24. P. 1–18.

Roberts S.L., Swann G.E.A., McGowan S., Panizzo V.N., Vologina E.G., Sturm M., Mackay A.W. Diatom evidence of 20th century ecosystem change in Lake Baikal, Siberia // *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13, № 12. P. 3–6.

Rousset F. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux // *Molecular Ecology Resources*. 2008. Vol. 8, № 1. P. 103–106.

Schliep K.P. Phangorn: phylogenetic analysis in R // *Bioinformatics*. 2011. Vol. 27, № 4. P. 592–593.

Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA // *Chromosoma*, 2000. Vol. 109. 365–371.

Schuster A., Vargas S., Knapp I.S., Pomponi S.A., Toonen R.J., Erpenbeck D., Wörheide G. Divergence times in demosponges // *BMC Evolutionary Biology*. 2018. Vol. 18. P. 114.

Senan S., Kizhakayil D., Sasikumar B., Sheeja T.E. Methods for development of microsatellite markers: an overview // *Notulae Scientia Biologicae*. 2014. Vol. 6, № 1. P. 1–13.

Slatkin M. Inbreeding coefficients and coalescence times // *Genetics Resources*. 1991. Vol. 58. P. 167–175.

Slatkin M. Isolation by distance in the equilibrium and non-equilibrium populations // *Evolution*. 1993. Vol. 47, № 1. P. 264–279.

Strimmer K., Pybus O.G. Exploring the demographic history of DNA sequences using the generalized skyline plot // *Molecular Biology and Evolution*. 2001. Vol. 18, № 12. P. 2298–2305.

Suslova M.Yu., Shtykova Yu.R., Sukhanova E.V., Podlesnaya G.V., Kostornova T.Ya., Grebenshchikova V.I., Belykh O.I. The use of microbiological monitoring to assess the impact of the anthropogenic influence on the ecosystem of Lake Baikal // *IOP Conference Series-Earth and Environmental Science*. 2019. Vol. 381, № Art. 012088.

Swierts T., Peijnenburg K.T.C.A., Leeuw C. de, Cleary D.F.R., Hörnlein C., Setiawan E., Wörheide G., Erpenbeck D., Voogd N.J. de. Lock, stock and two different barrels: comparing the genetic composition of morphotypes of the Indo-Pacific sponge *Xestospongia testudinaria* // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, № 9. e74396.

Swierts T., Peijnenburg K.T.C.A., Leeuw C.A. de, Breeuwer J.A.J., Cleary D.F.R., Voogd N.J. de. Globally intertwined evolutionary history of giant barrel sponges // *Coral Reefs*. 2017. Vol. 36. P. 933-945.

Taboada S., Riesgo A., Blasco G., Solà J., Xavier J.R., López-Legentil S. Development of 10 microsatellite markers for the Atlanto-Mediterranean sponge *Petrosia ficiformis* // *Conservation Genetics Resources*. 2015. Vol. 7, № 4. P. 895-897.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

distance, and maximum parsimony methods // *Molecular Biology and Evolution*. 2011. Vol. 28, № 10. P. 2731-2739.

Thuring R.W.J., Sanders J.P.M., Borst P. A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels // *Analytical Biochemistry*. 1975. Vol. 66, № 1. P. 213-220.

Timoshkin, O.A., Bondarenko, N.A., Volkova, E.A., Tomberg, I.V., Vishnyakov, V.S., and Mal'nik, V.V., Mass development of green filamentous algae of *Spirogyra* Link and *Stigeoclonium* Kutz. (CHLOROPHYTA) genera in the coastal zone of Southern Baikal // *Gidrobiol. Zhurn.* 2014, № 5. P. 15–26.

Timoshkin O., Samsonov D., Yamamuro M., Moore M., Belykh O., Malnik V., Sakirko M., Shirokaya A., Bondarenko N., Domysheva V., Fedorova G., Kochetkov A., Kuzmin A., Lukhnev A., Medvezhonkova O., Nepokrytykh A., Pasyukova E., Poberezhnaya A., Potapskaya N., Rozhkova N., Sheveleva N., Tikhonova I., Timoshkina E., Tomberg I., Volkova E., Zaitseva E., Zvereva Y., Kupchinsky A., Bukshuk N. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? // *Journal of Great Lakes Research*. 2016. Vol. 42, № 3. P. 487–497.

Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*. 2000. Vol. 10. P. 967– 981.

Turon X., Tarjuelo I., Uriz M.J. Growth dynamics and mortality of the encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) in contrasting habitats: correlation with population structure and investment in defence. // *Functional Ecology*. 1998. Vol. 12. P. 631–639.

Van Soest R.W.M., Boury-Esnault N., Vacelet J., Dohrmann M., Erpenbeck D., Voogd N.J.D., Santodomingo N., Vanhoorne B., Kelly M., Hooper J.N.A. Global Diversity of Sponges (Porifera) // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7 № 4. e35105.

Varijakzhan D., Loh J.Y., Yap W.S., Yusoff K., Seboussi R., Lim S.E., Lai K.S., Chong C.M. Bioactive compounds from marine sponges: fundamentals and applications // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19(5). P. 246.

Vieira M.L.C. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful // *Genetics and Molecular Biology*. 2016. Vol. 39, № 3. P. 312-328.

Webster, N.S., Xavier, J.R., Freckelton, M., et al., Shifts in microbial and chemical patterns within the marine sponge *Aplysina aerophoba* during a disease outbreak // *Environmental Microbiology*. 2008a. Vol. 10, №. 12, P. 3366–3376.

Webster, N.S., Cobb, R.E., and Negri, A.P., Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge, *ISME Journal*. 2008b, Vol. 2. P. 830–842.

Webster N.S., Blackall L.L. What do we really know about sponge-microbial symbioses // *ISME Journal*. 2009. Vol. 3. P. 1-3.

Weinberg I., Glyzina O., Weinberg E., Kravtsova L., Rozhkova N., Sheveleva N., Natyaganova A., Bonse D., Janussen D. Types of interactions in consortia of Baikalian sponges // *Bollettino dei Musei e degli Istituti biologici dell'Università di Genova*. 2004, № 68. P. 655–663.

Weiss R., Carmack Carmack E., Koropalov V. Deep-water renewal and biological production in Lake Baikal // *Nature*. 1991. Vol. 349. P. 665–669.

Winans G.A., Brady Allen M., Baker J., Lesko E., Shrier F., Strobel B., Myers J. Dam trout: genetic variability in *Oncorhynchus mykiss* above and below barriers in three columbia river systems prior to restoring migrational access // *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13, № 5. P. 1–28.

Wörheide G. Low variation in partial cytochrome oxidase subunit I (COI) mitochondrial sequences in the coralline demosponge *Astrosclera willeyana* across the Indo-Pacific // *Marine Biology*. 2006. Vol. 148. P. 907–912.

Wright J.M., Bentzen P. Microsatellites: Genetic markers of the future // *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 1994. Vol. 4. P. 384–388.

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*. 2024a. Vol. 69. P. 1454–1467.

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. 2024b. Vol. 86. Article no. 85.

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

Yakhnenko A.S., Itskovich V.B. Study of microsatellite cross-species specificity in freshwater sponge families Lubomirskiidae and Spongillidae // Limnology and Freshwater Biology. 2020b. Vol. 3, № 6. P. 1084–1089.

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. 4, № 6. P. 1199–1204.

Yakhnenko A., Yushin N., Nebesnykh I., Khanaev I., Zinicovscaia I., Kravchenko E. Molecular markers development for studying of the heavy metal response gene expression levels in endemic sponges of Lake Baikal // AIP Conference Proceedings. 2021. Vol. 2377, № 1. P. 050006.

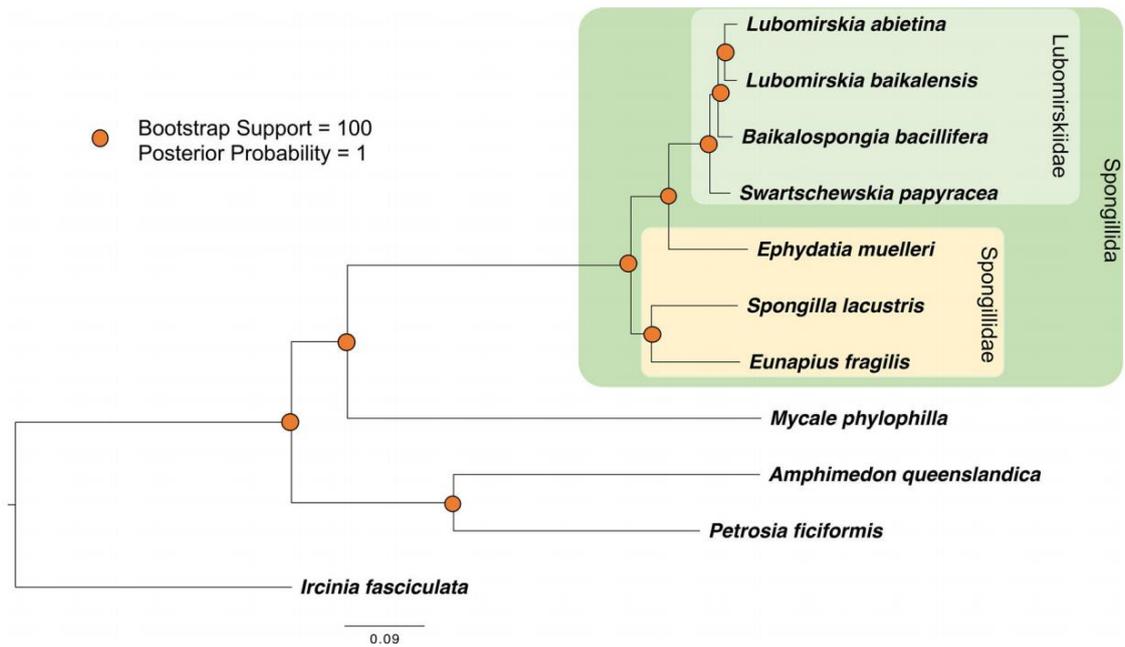
Yakhnenko A., Zinicovscaia I., Yushin N., Chaligava O., Nebesnykh I., Grozdov D., Khanaev I., Duliu O.G., Maikova O., Kravchenko E. Endemic sponge *Lubomirskia baikalensis* as a bioindicator of chemical elements pollution in Lake Baikal // Marine Pollution Bulletin. 2022. Vol. 182. P. 114025.

Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC Bioinformatics. 2012. Vol. 13, № 134. P. 1–11.

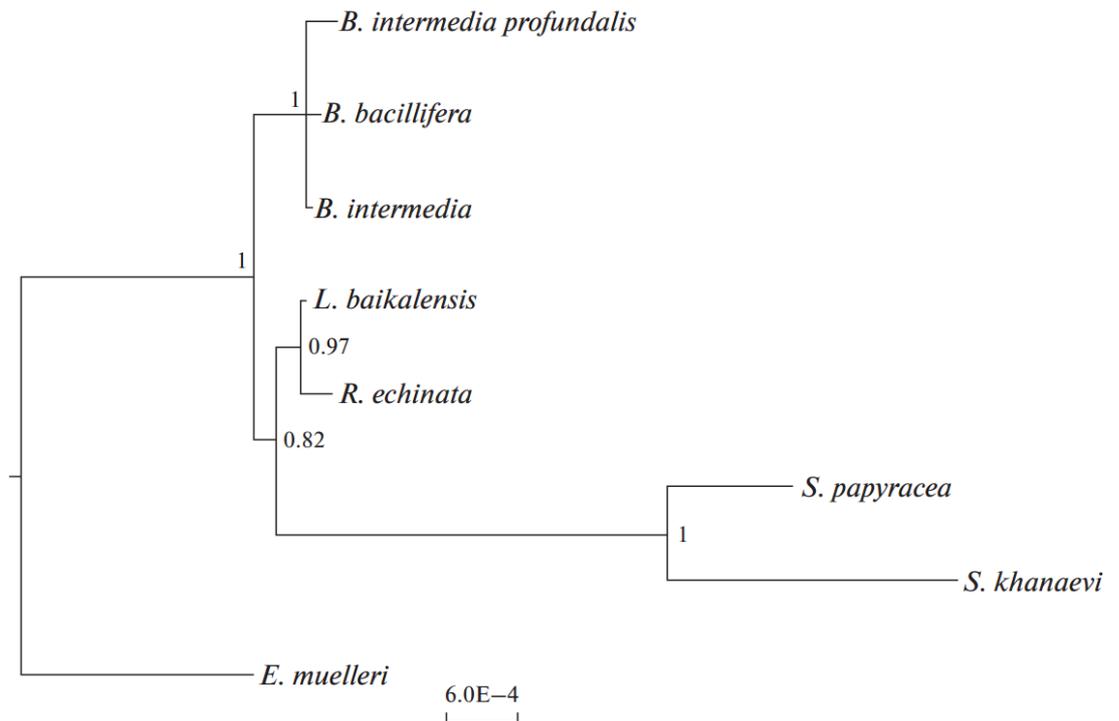
Yu J.N., Kim S.K., Sagong J., Ryu S.H., Chae B. Identification of microsatellite markers and their application in yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco* Richardson, 1846) population genetics of Korea // Journal of Genetics. 2019. Vol. 98, № 2. P. 1–6.

Zhao Y., Zhu X., Li Z., Xu W., Dong J., Wei H., Li Y., Li X. Genetic diversity and structure of Chinese grass shrimp, *Palaemonetes sinensis*, inferred from transcriptome-derived microsatellite markers // BMC Genetics. 2019. Vol. 20, № 75. P. 1–9.

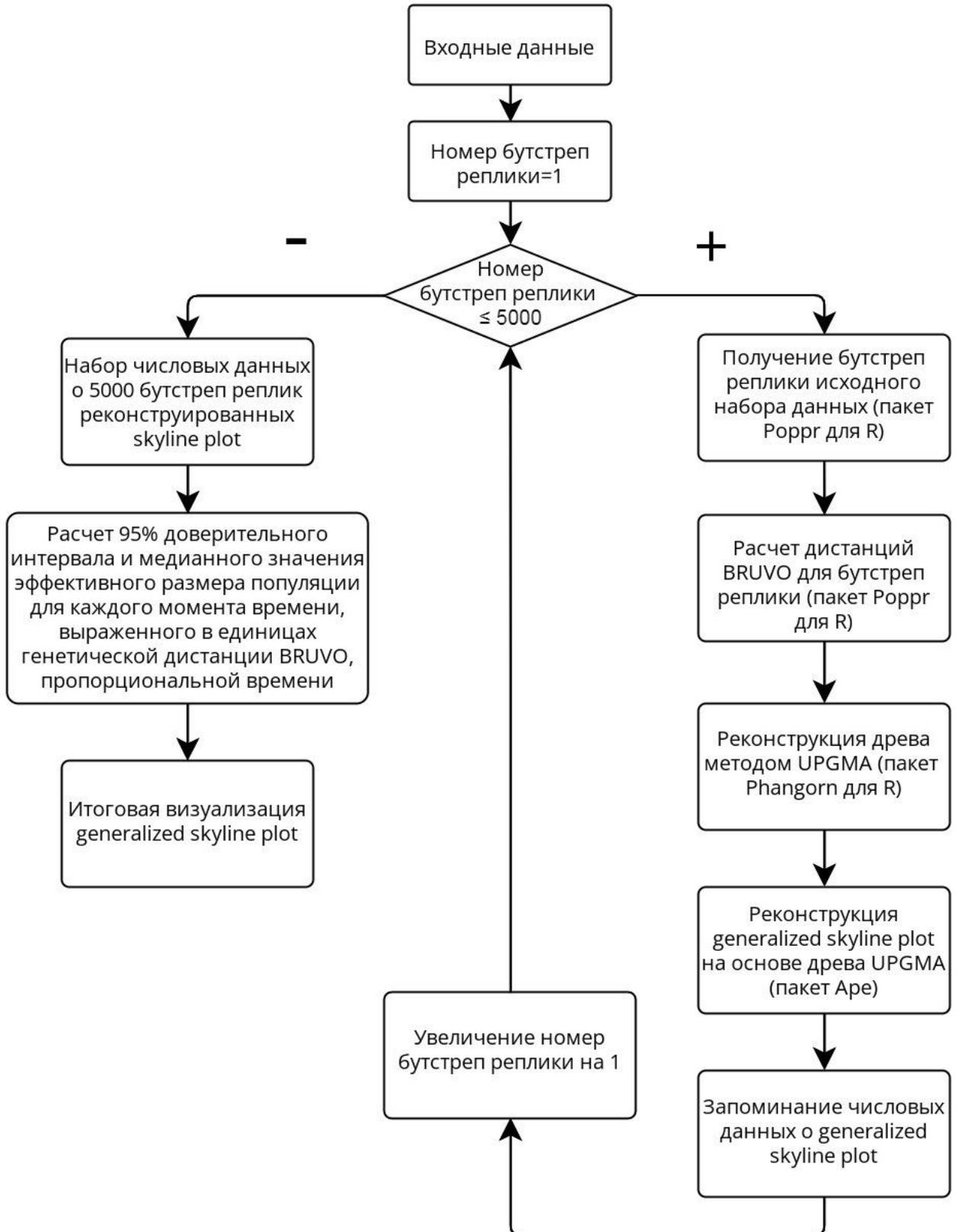
а)



б)



Филогенетические деревья, опубликованные ранее, описывающие межвидовые взаимоотношения байкальских эндемичных губок, построенные а) по транскриптомным данным (Kenny, Itskovich, 2020) и б) по 14 белок кодирующим генам митохондриальной ДНК (Майкова, Щербаков, 2023).



Блок-схема, иллюстрирующая методику реконструкции истории изменения эффективной численности популяций во времени

Приложение III

Точные длины микросателлитных локусов с фланкирующими районами, полученные с помощью фрагментного анализа для *L. baikalensis*

Образец	Поп.	Локус																			
		<i>Lba_23</i>		<i>Lba_Em 76</i>		<i>Lba_Em 200</i>		<i>Lba_em_217</i>		<i>Lba_em 19</i>		<i>Lba_17</i>		<i>Lba_em 280</i>		<i>Lba_Em 367</i>		<i>Lba_em_158</i>		<i>Lba_19</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
94	1	281	283	244	246	226	232	376	378	246	258	320	326	385	385	301	301	287	287	362	364
95	1	279	283	246	248	226	226	374	376	250	258	320	330	379	385	301	301	287	287	362	364
96	1	279	283	240	246	226	232	374	376	242	250	332	350	379	379	301	301	287	287	362	362
97	1	281	283	246	248	226	226	376	376	258	266	332	344	379	387	301	301	287	287	362	364
98	1	279	281	246	248	226	226	376	376	248	250	336	336	379	379	293	293	285	287	362	362
99	1	279	285	240	244	232	232	376	376	248	256	326	344	379	379	293	301	287	287	360	360
100	1	283	285	246	246	226	226	376	376	250	258	324	340	379	385	293	301	285	287	362	362
101	1	283	285	244	244	226	232	372	376	238	258	332	336	379	385	281	301	287	287	360	362
102	1	281	283	246	248	226	232	374	376	248	250	332	334	379	385	297	301	287	287	358	362
103	1	275	275	244	248	226	226	372	372	250	258	328	336	385	385	293	301	285	287	360	360
104	1	279	283	246	248	226	226	374	374	250	256	330	334	379	385	293	301	287	287	362	362
105	1	281	283	246	246	226	226	376	376	254	256	330	346	379	379	293	301	287	287	360	360
106	1	283	287	246	248	226	226	374	376	254	256	330	344	385	385	301	301	287	287	360	362
107	1	279	285	244	246	226	226	376	376	244	244	332	332	379	385	301	301	287	287	358	362
108	1	283	285	244	246	226	226	372	376	254	256	332	336	379	387	293	301	287	287	358	362
109	1	275	285	246	248	226	226	372	376	248	258	336	350	379	379	301	301	287	287	360	362
110	1	281	281	244	246	226	226	374	376	250	254	320	330	379	379	301	301	287	287	362	362
111	1	275	283	244	246	226	226	372	374	250	256	326	336	379	379	293	293	287	287	358	358
112	1	283	283	246	246	232	232	374	376	254	256	332	344	379	385	293	301	285	287	358	358
113	1	279	281	246	246	226	226	372	376	254	256	332	344	379	385	293	301	287	287	360	360
114	1	281	283	246	248	226	226	372	376	250	256	326	336	379	379	293	301	287	291	362	362

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
115	1	279	283	246	248	226	226	374	374	250	256	330	334	379	385	293	301	287	287	362	362
116	1	279	285	244	246	232	232	376	376	250	256	332	336	379	379	293	301	287	287	358	362
117	1	275	279	246	248	226	232	374	376	250	258	336	344	379	379	301	301	285	287	360	362
118	1	281	287	246	246	226	226	374	374	256	256	320	330	379	379	301	301	287	287	358	362
119	1	279	281	246	246	226	232	376	376	258	258	322	336	385	385	293	301	287	287	358	362
120	1	275	281	246	248	226	232	376	376	250	256	336	336	379	379	301	301	287	287	358	362
121	1	275	279	240	244	226	226	374	376	256	256	330	344	379	379	293	301	287	291	358	362
122	1	279	285	246	246	226	232	374	376	256	256	330	344	379	387	301	301	287	287	360	362
123	1	275	283	246	248	226	232	374	376	250	250	336	344	379	385	301	301	287	287	360	360
124	1	281	285	244	246	226	226	376	376	248	258	330	330	379	385	293	301	287	287	358	360
125	1	275	287	246	246	226	226	372	374	248	260	330	330	379	385	301	301	287	287	358	360
190	2	283	283	248	250	226	226	374	374	256	256	320	346	379	379	303	303	279	285	362	362
191	2	277	283	240	246	226	226	372	374	256	264	316	324	379	381	293	293	285	285	364	364
192	2	277	279	246	246	226	230	376	376	256	256	324	334	379	379	299	299	285	285	364	368
193	2	275	279	246	250	226	226	376	380	256	256	316	324	379	379	293	303	285	285	364	364
194	2	281	287	240	246	226	232	372	372	256	256	320	322	377	379	299	309	279	285	360	360
195	2	277	287	240	246	226	232	374	374	256	256	320	324	379	379	303	303	285	285	360	360
196	2	277	279	240	246	226	226	374	376	256	264	324	328	379	379	303	303	285	285	362	362
197	2	279	279	248	248	226	232	372	374	254	256	334	336	379	379	299	303	285	285	362	362
198	2	277	279	240	248	226	226	372	374	256	256	334	336	379	379	303	303	285	285	362	362
199	2	277	279	248	248	226	226	372	374	236	258	328	346	379	379	293	299	285	285	358	362
200	2	279	289	240	244	226	226	372	374	254	256	320	328	379	379	293	303	285	285	358	362
201	2	279	283	248	248	226	232	374	374	254	256	328	334	379	379	301	303	285	285	362	364
202	2	279	289	244	248	226	226	372	374	256	256	324	334	379	379	293	303	285	285	362	362
203	2	277	279	244	248	226	226	372	374	256	256	320	320	379	379	293	293	285	285	360	362
204	2	279	289	246	248	226	232	374	374	244	256	320	334	379	379	299	303	285	285	360	362
205	2	279	287	240	246	226	228	372	374	254	256	324	328	379	379	293	293	285	285	362	362

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
206	2	279	283	246	248	226	232	372	376	254	256	316	334	379	379	299	303	285	285	362	364
207	2	279	281	248	248	226	232	372	376	236	256	324	334	379	379	299	303	285	285	362	362
208	2	279	283	240	246	226	230	372	372	254	256	316	334	379	379	299	303	285	285	362	362
209	2	277	291	248	248	226	226	376	376	254	256	316	336	379	379	295	303	285	285	362	362
210	2	279	279	246	248	226	230	372	372	254	256	328	336	379	379	299	299	285	285	360	362
211	2	279	279	240	246	226	226	374	374	256	258	328	334	379	379	303	303	285	285	362	362
213	2	279	279	246	248	226	226	374	374	256	258	320	328	379	379	301	303	285	285	360	362
214	2	283	291	246	248	226	226	372	372	254	256	320	334	379	379	303	309	285	285	362	362
215	2	279	283	246	248	226	226	372	374	254	256	324	328	379	379	303	303	285	285	360	362
216	2	277	279	246	248	226	226	372	372	236	256	320	324	379	379	301	311	285	285	362	362
217	2	277	279	240	248	232	232	372	372	256	258	324	328	379	379	299	299	285	285	362	362
218	2	281	283	244	246	230	232	372	372	250	256	322	322	379	379	293	303	279	285	360	364
219	2	277	279	246	248	226	232	372	374	236	236	332	332	379	379	293	303	285	285	362	362
220	2	279	279	248	248	226	232	372	376	256	256	328	334	379	379	299	305	285	285	360	362
221	2	279	287	246	248	226	226	372	374	256	258	320	320	379	379	303	303	285	285	362	362
я64	3	279	281	246	246	226	232	372	376	246	258	322	338	381	381	301	301	287	287	360	362
я65	3	279	285	240	246	226	226	372	372	246	258	322	336	379	381	301	301	287	287	358	360
я66	3	281	285	246	246	234	234	376	378	248	258	334	334	379	385	301	301	287	287	358	358
я68	3	279	285	246	246	232	236	376	378	260	260	332	334	379	385	301	301	287	287	358	362
я69	3	283	285	246	246	226	226	376	378	256	256	332	334	379	379	301	301	287	287	358	362
я70	3	279	285	240	246	226	232	378	378	248	260	332	334	387	389	297	301	287	287	358	362
я71	3	279	281	246	246	234	234	378	378	246	258	334	334	379	385	301	301	287	287	358	362
я72	3	279	281	246	246	226	226	372	376	246	256	334	336	381	389	301	301	287	287	358	362
я73	3	275	279	246	246	232	232	372	378	256	256	332	338	379	385	301	301	287	287	358	362
я74	3	275	281	246	246	232	236	376	378	258	258	320	334	379	379	301	301	287	287	358	358
я75	3	279	283	244	246	226	234	376	378	246	246	334	344	379	379	301	301	287	287	358	358
я76	3	279	281	246	246	226	232	378	378	258	258	334	334	385	385	293	301	287	287	358	362

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
я77	3	279	285	246	246	226	232	372	378	256	260	322	346	379	379	297	301	287	287	358	360
я78	3	279	279	246	246	226	234	378	378	258	258	326	330	381	389	301	301	285	285	362	362
я79	3	279	279	246	246	226	236	376	378	258	258	334	334	379	379	301	301	285	287	358	362
я80	3	281	285	246	246	232	232	372	374	260	260	334	338	381	389	301	301	285	287	360	366
я81	3	285	285	246	250	226	232	376	378	256	258	322	334	379	379	293	301	287	287	358	358
я81,5	3	279	281	246	246	232	236	374	378	256	258	334	338	379	385	301	301	287	287	360	362
я82	3	279	285	246	246	232	234	376	378	248	258	332	334	379	385	301	301	287	287	358	362
я83	3	283	285	246	246	226	232	376	376	248	256	338	344	381	381	301	301	287	287	358	358
я84	3	279	285	246	250	226	226	374	378	256	260	332	334	379	379	293	297	287	287	358	366
я85	3	279	285	246	246	226	232	372	376	256	256	322	338	379	379	297	301	287	287	358	358
я86	3	279	281	246	246	226	236	372	378	256	258	336	344	379	379	301	301	287	287	358	358
я87	3	285	285	246	246	226	226	372	378	256	256	338	338	379	383	301	301	287	287	358	360
я88	3	277	283	246	246	226	232	372	376	256	256	332	346	379	385	301	301	287	287	358	358
я89	3	281	281	246	246	226	234	372	374	246	258	332	334	379	381	301	307	287	287	358	362
я90	3	275	281	246	246	226	232	376	378	246	258	322	330	381	385	301	307	287	287	358	358
я91	3	279	285	246	246	226	236	376	378	246	260	334	334	379	381	301	307	287	287	358	358
я92	3	283	285	244	246	234	236	378	378	256	262	322	338	381	385	297	307	287	287	358	362
я93	3	279	279	246	246	226	232	374	378	256	262	334	338	379	385	301	301	285	287	360	362
я288	4	279	293	246	248	232	232	374	378	266	268	316	334	379	379	303	305	285	285	362	362
я289	4	279	279	248	248	226	232	378	378	256	268	332	334	379	379	293	299	285	285	362	362
я291	4	279	279	248	248	226	232	374	378	266	266	316	332	373	379	299	303	285	285	360	362
я292	4	283	291	248	248	226	226	372	376	266	268	328	334	373	379	299	307	285	285	362	362
я293	4	279	279	248	248	226	226	378	378	258	264	316	342	379	379	299	299	285	285	362	362
я294	4	281	283	246	248	226	232	376	378	258	266	316	334	377	377	299	303	285	285	362	362
я295	4	279	283	246	248	226	232	374	374	266	268	316	334	379	379	293	299	285	285	362	362
я296	4	281	291	240	248	226	232	374	378	266	266	328	334	379	379	293	293	285	285	362	362
я297	4	283	291	246	248	226	232	376	378	254	268	324	332	379	379	299	299	285	285	362	362

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
я298	4	279	279	248	248	226	232	378	378	236	266	324	332	379	381	299	301	285	285	360	360
я299	4	279	291	246	248	226	232	372	378	266	266	316	328	379	379	293	301	285	285	360	362
я300	4	287	287	248	248	226	234	376	376	256	256	332	334	379	379	299	303	285	285	362	362
я301	4	279	279	246	248	226	232	372	378	244	268	332	336	371	379	293	299	285	285	362	362
я302	4	279	291	248	248	232	232	374	378	244	244	332	334	371	371	293	299	285	285	360	360
я303	4	279	279	246	246	226	232	378	378	256	268	328	332	379	379	299	299	285	285	362	362
я304	4	279	281	246	248	232	234	376	376	256	268	324	324	379	379	299	299	285	285	362	362
я305	4	279	281	246	248	226	232	376	378	256	266	332	332	377	379	299	299	285	285	362	362
я306	4	279	281	246	248	232	234	372	374	256	268	332	332	377	379	293	301	285	285	360	362
я307	4	277	279	246	246	226	226	372	372	266	268	332	334	377	379	299	299	285	285	360	362
я308	4	283	287	246	248	232	232	374	378	256	268	316	336	371	379	299	303	285	285	362	362
я309	4	279	279	246	248	226	232	372	376	244	266	332	336	371	373	301	301	285	285	362	362
я310	4	279	279	248	248	232	234	374	378	254	256	324	334	379	379	299	303	285	285	360	362
я311	4	281	287	248	248	232	232	374	378	236	266	324	328	379	379	299	307	285	285	362	362
я312	4	279	283	248	248	226	232	374	378	254	268	334	334	379	379	299	303	285	285	360	362
я313	4	279	281	246	248	226	226	378	378	266	268	332	332	379	379	299	299	285	285	360	362
я314	4	283	283	246	248	226	226	374	378	244	266	334	334	379	379	299	301	285	285	362	362
я315	4	279	291	248	248	232	232	372	376	256	268	332	334	373	379	299	299	285	285	360	362
я316	4	279	281	246	248	226	234	374	374	266	268	316	334	379	381	299	301	285	285	360	362
я317	4	287	291	248	248	232	232	376	378	256	268	324	332	371	371	299	299	285	285	362	362
я318	4	279	279	248	248	232	234	372	374	266	268	328	332	379	381	293	301	285	285	362	362
я319	4	279	291	248	248	226	232	374	376	256	256	334	334	379	379	293	303	285	285	362	362
я320	4	279	279	246	246	226	234	374	376	266	268	334	334	379	381	293	299	285	285	362	362
я331	5	275	285	246	246	226	232	374	376	256	256	328	328	379	385	293	301	287	287	360	362
я332	5	285	287	246	248	226	232	376	376	256	256	328	328	385	385	293	301	287	287	360	362
я334	5	275	285	246	246	226	232	374	376	250	256	328	328	379	385	293	301	287	287	360	362

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
я335	5	279	283	246	248	226	232	376	376	248	258	324	330	379	385	301	301	287	287	358	362
я336	5	275	289	246	246	226	226	376	376	248	256	326	334	379	387	301	301	287	287	360	362
я337	5	279	279	246	246	226	232	374	376	248	258	330	336	379	379	301	301	287	287	362	362
я338	5	275	285	246	246	232	232	372	376	254	256	330	344	379	379	301	301	287	287	358	358
я339	5	275	281	246	246	226	232	376	376	254	256	328	328	385	387	301	301	287	287	358	360
я340	5	275	279	240	246	226	226	372	376	256	256	328	336	379	387	301	301	287	287	358	360
я341	5	281	281	246	246	226	232	374	374	250	254	330	344	379	385	293	301	287	287	362	362
я342	5	281	281	246	248	226	232	374	376	250	258	324	344	379	385	293	301	287	287	360	362
я343	5	281	285	246	248	226	226	376	376	248	258	344	350	379	379	293	301	287	287	358	362
я344	5	275	281	246	246	226	226	372	376	240	256	334	334	379	389	293	301	287	287	358	362
я345	5	279	281	240	246	226	232	374	376	254	254	324	344	379	379	301	301	287	287	358	360
я346	5	281	281	240	246	226	226	376	376	250	258	324	328	379	379	293	301	287	287	360	362
я347	5	279	285	246	248	226	232	374	376	256	256	322	346	379	379	301	301	287	287	358	362
я348	5	285	287	244	246	226	226	378	378	256	256	328	328	385	385	301	301	287	287	364	364
я349	5	279	289	244	244	226	232	376	376	256	256	328	330	379	379	293	301	287	287	358	358
я350	5	279	281	246	246	226	232	374	376	254	256	324	336	379	379	301	301	287	287	360	362
я351	5	281	285	246	246	232	232	376	376	254	256	334	334	379	385	293	293	287	287	358	362
я352	5	279	281	246	248	226	226	376	376	254	256	328	330	379	379	293	301	287	287	360	362
я353	5	279	281	246	246	226	232	374	376	240	256	328	330	379	379	301	301	287	287	358	358
я354	5	279	281	246	246	226	226	376	376	248	256	322	328	379	387	301	301	287	287	358	360
я355	5	279	285	246	246	226	232	372	374	248	256	328	330	379	379	301	301	287	287	362	362
я356	5	279	281	246	248	226	226	376	376	250	256	322	350	379	379	301	301	287	287	362	362
я357	5	275	275	246	246	226	226	374	376	248	258	330	330	379	379	301	301	287	287	358	362
я358	5	281	281	246	246	226	226	372	374	250	250	336	344	379	385	293	293	287	287	362	362
я359	5	279	279	240	246	226	232	372	374	256	256	328	336	379	379	301	301	287	287	362	362
я360	5	279	279	246	246	232	232	374	376	248	254	328	328	385	385	301	301	287	287	360	362
я361	5	281	281	246	246	226	232	374	374	240	248	328	330	379	379	301	301	287	287	358	358

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
я362	5	285	287	246	248	226	226	376	376	254	256	322	344	379	385	301	301	287	287	358	358
я363	5	275	279	244	246	226	226	374	376	248	256	328	334	379	385	301	301	287	287	358	360
я371	6	283	283	246	246	226	232	374	376	248	256	320	348	379	389	301	301	285	287	358	360
я372	6	279	283	240	240	226	226	372	376	248	254	320	346	379	389	307	307	285	285	362	362
я373	6	279	283	246	246	226	232	374	376	256	256	336	348	379	379	301	301	285	285	360	360
я375	6	285	285	246	246	226	226	374	376	248	256	336	348	383	389	301	301	285	289	360	362
я376	6	279	283	240	246	226	226	374	374	236	258	328	336	385	391	299	301	285	285	362	362
я377	6	283	283	240	246	226	226	374	376	236	256	328	348	387	391	301	301	285	287	358	362
я378	6	283	283	246	246	226	232	372	374	248	256	336	348	379	387	283	301	285	285	360	360
я379	6	279	287	246	246	226	232	372	374	254	256	320	348	379	379	301	307	287	287	358	362
я380	6	279	281	244	246	226	226	374	376	248	256	336	348	379	387	301	301	285	285	360	360
я381	6	283	285	244	246	226	232	374	374	248	258	324	348	379	379	301	303	285	285	358	358
я382	6	279	285	244	246	226	232	374	376	256	256	336	348	385	389	299	299	285	287	362	362
я383	6	283	283	240	246	226	232	374	376	236	248	328	336	385	391	301	305	285	285	360	362
я384	6	281	283	246	246	226	232	374	376	256	258	336	336	379	379	299	301	287	287	360	362
я385	6	275	289	246	246	226	226	374	376	256	258	336	336	385	385	301	301	285	285	360	360
я386	6	281	285	244	246	226	226	376	376	236	258	320	336	379	385	299	301	285	287	362	362
я387	6	279	283	246	246	226	226	376	376	248	254	322	348	379	379	299	307	285	287	360	362
я388	6	283	283	240	246	226	232	374	374	254	256	324	336	379	383	303	307	285	285	358	360
я391	6	279	281	246	246	226	226	374	374	236	256	322	324	385	387	307	307	287	287	358	362
я392	6	283	283	244	246	226	232	374	374	248	256	324	336	385	385	301	301	285	287	360	362
я393	6	281	281	246	246	226	226	374	374	236	258	336	348	379	385	301	301	285	287	358	360
я394	6	283	283	244	246	226	226	376	376	256	256	336	348	379	385	301	309	287	291	360	360
я395	6	275	285	246	246	226	232	374	376	256	258	348	348	379	385	301	303	285	287	360	360
я396	6	283	283	240	246	226	232	374	376	254	256	320	336	379	389	297	301	285	285	358	360
я397	6	283	283	244	246	226	226	376	376	256	256	336	348	379	385	301	309	287	291	360	360
я398	6	283	283	240	246	232	232	374	376	256	258	332	336	379	387	301	301	285	287	358	360

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
я399	6	279	283	246	246	226	226	374	376	236	258	336	348	379	385	301	303	285	285	358	362
я400	6	279	281	240	246	232	234	376	376	258	258	320	348	379	387	297	301	285	287	358	362
я401	6	283	287	240	246	226	226	374	376	248	256	332	336	385	385	299	301	287	287	358	358
я402	6	279	283	240	246	226	226	374	374	248	248	348	348	385	385	301	307	285	287	360	362
я1	7	275	279	240	246	226	226	376	376	236	256	316	348	373	375	301	301	285	285	358	358
я2	7	277	283	244	248	226	226	376	380	236	256	332	348	375	379	299	299	285	285	358	364
я3	7	277	277	240	244	226	226	376	376	236	236	330	348	375	379	299	305	285	285	358	358
я4	7	275	277	244	248	226	232	376	376	236	256	316	316	379	397	301	301	285	285	364	364
я5	7	277	279	244	248	226	226	376	376	236	250	320	332	389	389	301	301	281	285	364	364
я6	7	279	281	240	246	226	226	376	376	236	250	348	348	379	379	299	301	285	285	364	364
я7	7	277	281	246	246	226	226	376	376	250	256	350	350	379	393	301	305	285	285	364	368
я8	7	277	283	240	244	232	232	376	376	250	250	336	348	379	379	299	301	285	285	364	368
я9	7	277	279	240	240	226	226	374	376	254	254	348	348	379	389	301	301	279	279	364	364
я10	7	277	281	246	248	226	226	374	376	250	264	332	348	379	379	299	301	279	279	364	364
я11	7	277	277	240	244	226	232	376	380	250	254	332	344	379	379	301	305	281	285	362	364
я12	7	281	281	240	240	226	226	376	380	250	250	344	348	379	379	301	307	285	285	364	368
я13	7	275	279	240	244	226	232	376	376	250	258	348	348	379	389	295	301	285	285	358	364
я15	7	275	281	240	244	226	232	374	376	236	256	320	348	379	379	301	303	285	285	358	364
я16	7	277	279	240	240	226	232	376	380	250	264	332	348	379	389	301	301	285	285	364	364
я17	7	277	287	244	248	226	226	374	380	236	252	336	348	375	379	299	299	285	285	358	358
я18	7	277	283	240	244	226	226	374	376	236	250	316	348	373	379	299	301	285	287	358	366
я19	7	277	281	244	248	226	232	376	376	250	254	344	348	379	389	301	301	285	285	364	366
я20	7	275	283	240	246	232	232	374	376	250	264	344	348	379	379	301	301	285	285	364	366
я21	7	281	283	248	248	226	226	376	376	236	250	348	348	379	379	299	305	279	285	364	364
я22	7	279	281	240	244	232	232	376	376	254	264	326	348	389	389	299	313	281	285	364	364
я23	7	283	283	246	248	226	226	376	380	250	264	336	336	379	391	301	303	279	281	364	364
я24	7	277	277	240	246	226	226	376	376	254	256	316	332	375	379	299	301	285	287	364	364

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
я25	7	283	291	244	248	226	226	376	376	256	256	322	330	375	389	299	301	285	285	362	366
я26	7	279	281	240	246	226	232	376	376	236	256	336	346	379	389	299	305	285	285	364	364
я27	7	275	281	240	244	226	236	376	376	250	264	338	350	379	379	301	305	285	285	364	364
я28	7	271	275	240	240	226	232	376	380	250	254	336	348	371	379	301	301	285	285	364	364
я29	7	277	279	240	248	226	232	376	376	236	250	326	350	379	389	299	301	279	285	364	364
я30	7	277	283	240	246	232	232	376	376	256	258	320	326	379	381	301	303	285	285	364	364
я31	7	283	291	246	246	226	226	376	376	236	236	316	322	379	389	299	301	285	285	358	364
я32	7	275	277	240	240	226	232	374	376	254	264	326	332	379	379	299	301	285	285	362	364
я34	8	283	287	244	248	226	226	376	376	254	256	326	334	379	379	301	305	285	287	364	368
я35	8	281	283	240	244	232	232	376	376	254	256	322	348	379	379	299	305	279	285	362	366
я36	8	279	279	240	246	226	226	376	376	250	250	316	322	379	379	301	307	279	285	364	372
я37	8	277	281	240	248	226	226	374	376	236	236	326	348	379	379	299	311	279	279	364	368
я38	8	275	283	244	246	226	232	374	376	236	256	316	316	379	379	299	305	279	285	364	368
я39	8	275	277	240	246	226	232	374	376	252	256	348	352	379	379	301	301	279	285	364	364
я40	8	281	281	246	248	232	232	376	376	254	254	322	336	379	381	301	307	279	279	364	366
я41	8	281	287	246	248	226	226	376	376	256	256	330	342	379	379	301	309	285	285	364	364
я42	8	277	283	240	244	226	232	376	376	254	254	326	340	379	379	299	299	279	285	364	364
я43	8	277	283	246	248	232	232	376	376	244	254	344	348	379	379	299	303	281	285	364	366
я44	8	275	279	244	246	226	226	376	376	254	254	322	336	379	379	301	307	285	287	368	370
я45	8	275	279	240	244	232	232	376	376	256	256	330	354	379	379	299	299	285	285	364	372
я46	8	283	289	244	246	226	232	376	376	236	260	316	344	379	379	299	301	281	285	362	362
я47	8	281	281	248	248	226	226	376	376	236	254	334	354	379	379	299	307	285	285	364	364
я48	8	281	281	246	248	232	232	376	376	254	254	322	336	379	381	301	307	279	279	364	366
я49	8	275	277	240	246	232	232	374	376	236	254	348	348	379	381	305	321	279	285	364	364
я52	8	279	287	244	246	232	232	376	376	236	256	334	350	379	379	301	301	285	285	366	370
я53	8	277	287	240	244	226	232	376	376	250	254	316	330	379	387	305	309	287	287	364	368

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
я54	8	283	287	244	246	232	232	374	376	236	254	330	330	379	379	301	305	279	285	362	364
я55	8	281	281	240	244	226	226	376	376	254	256	316	334	379	379	299	307	279	285	362	364
я56	8	275	277	240	246	226	232	374	376	252	256	348	354	379	379	301	301	279	285	364	364
я57	8	271	283	246	248	226	232	376	376	250	250	322	354	379	379	301	307	281	281	364	372
я58	8	283	287	244	246	232	232	374	376	236	254	330	330	379	379	301	305	279	285	362	364
я59	8	277	283	246	246	226	226	376	376	250	254	322	322	375	379	301	309	285	285	366	366
я60	8	277	277	244	246	226	232	376	376	250	254	334	352	379	381	305	311	285	285	364	374
я61	8	275	281	240	244	226	232	376	376	236	254	316	320	379	383	307	307	279	285	364	368
я62	8	281	287	246	248	226	226	376	376	256	256	330	342	379	379	301	309	285	285	364	364
я63	8	271	277	240	248	226	232	376	376	236	254	336	348	379	379	301	301	281	287	368	368

Примечание. *Код районов отбора образцов: 1-СТ, 2-CMR, 3-CE, 4-US, 5-NS, 6-SN, 7-POV, 8-CU

Приложение IV

Точные длины микросателлитных локусов с фланкирующими районами, полученные с помощью фрагментного анализа для *E. muelleri*

Образец	Поп.*	Локус													
		<i>Lba_em187</i>		<i>Lba_em369</i>		<i>Lba_em291</i>		<i>Lba_em367</i>		<i>Lba_em249</i>		<i>Lba_em266</i>		<i>Lba_em217</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
565	1	312	312	335	365	293	293	306	306	204	208	0	0	398	406
566	1	0	0	363	365	293	295	300	306	208	214	286	289	398	404
569	1	0	0	331	365	283	295	296	306	214	214	283	286	404	406
571	1	304	312	363	365	293	293	300	332	214	226	286	286	404	404
575	1	304	312	335	335	283	293	300	318	204	208	289	289	0	0
582	1	0	0	335	365	293	295	306	228	208	214	283	289	398	406
584	1	0	0	335	365	293	295	318	332	210	214	283	286	398	398
588	1	312	312	335	363	283	283	300	318	208	208	286	289	404	404
589	1	312	312	335	335	283	295	300	318	208	208	286	289	398	404
590	1	304	304	335	335	293	293	300	306	208	208	286	289	398	406
591	1	0	0	335	365	293	295	0	0	208	214	283	286	404	406
602	2	304	314	327	365	283	293	300	336	204	204	283	289	398	412
604	2	304	312	365	365	283	293	296	306	208	224	286	289	398	398
606	2	304	314	327	331	283	295	300	332	214	222	283	286	398	398
614	2	312	312	331	365	293	293	300	300	204	214	283	286	398	406
617	2	300	312	327	333	283	293	300	300	204	214	286	286	398	398
618	2	312	312	329	363	283	295	300	300	214	214	283	286	398	406
619	2	0	0	0	0	283	293	300	300	204	214	286	286	398	398
620	2	0	0	0	0	283	283	0	0	204	204	283	289	398	398
623	2	0	0	317	329	0	0	0	0	204	204	286	286	398	398
626	2	312	312	329	365	293	295	300	300	204	214	286	286	398	398
630	2	0	0	329	335	283	283	300	332	204	222	286	286	398	398
633	2	312	314	329	365	293	295	300	300	204	214	283	286	398	398
634	2	312	312	363	365	283	293	300	300	204	214	286	286	0	0

Примечание. *Популяции: 1 – Оз. Ханхой, 2 – Залив Елга; 0 – данные отсутствуют.

Приложение V

Точные длины микросателлитных локусов с фланкирующими районами, полученные с помощью фрагментного анализа для *L.abietina*, *B.bacillifera*, *S.papyracea*, *R.echinata* в формате для программы GenAlix

Образец	Вид*	Локус																			
		<i>Lba_em291</i>		<i>Lba_em217</i>		<i>Lba_em10</i>		<i>Lba_em124</i>		<i>Lba_em76</i>		<i>Lba_em158</i>		<i>Lba_em414</i>		<i>Lba_em257</i>		<i>Lba_em260</i>		<i>Lba_em315</i>	
Rez_3698	1	285	285	395	395	379	379	206	206	248	248	284	286	270	274	266	266	275	275	231	234
Rez_3699	1	285	285	389	393	379	379	206	206	248	248	0	0	272	274	266	268	269	275	231	234
Rez_3236	1	285	285	377	389	379	379	206	206	240	248	0	0	274	274	266	270	275	275	231	237
Rez_t83	1	285	285	375	375	0	0	206	206	240	248	286	286	0	0	268	268	269	275	231	231
Rez_t36	1	285	285	375	375	0	0	206	206	248	248	286	286	0	0	268	280	283	285	231	237
Sw_3201	2	293	293	375	391	388	388	203	203	242	246	286	288	302	308	264	282	257	263	231	234
Sw_3212	2	293	293	0	0	385	385	203	203	246	252	286	0	0	292	262	266	267	267	234	234
Sw_3210	2	293	293	0	0	382	382	203	203	242	248	286	308	306	306	264	266	267	283	234	234
Sw_3209	2	293	293	0	0	0	0	203	203	246	246	286	286	0	0	266	274	267	267	234	234
Sw_3154	2	293	293	375	375	0	0	203	203	246	252	288	298	0	0	262	274	263	267	228	234
Lab_3193	3	285	285	373	375	379	379	203	203	240	244	286	288	274	274	260	264	277	277	237	243
Lab_3238	3	285	285	0	0	379	382	206	206	0	0	280	286	272	274	262	268	265	273	237	237
Lab_3241	3	285	285	355	373	379	382	203	203	244	246	286	288	274	274	266	282	273	283	240	243
Lab_3269	3	285	285	375	379	0	0	0	0	246	248	286	286	274	274	274	282	269	275	240	240
Lab_3276	3	285	285	373	375	0	0	203	203	240	242	286	286	274	274	270	272	271	283	237	237
Bac_170	4	285	285	0	0	379	379	203	203	246	246	294	294	266	266	260	272	263	275	231	231
Bac_187	4	285	285	373	377	379	379	203	203	246	246	0	0	266	266	260	274	0	0	234	243
Bac_184	4	285	285	373	377	379	379	203	203	246	246	286	286	266	266	270	278	281	299	237	240
Bac_200	4	285	285	373	387	379	382	203	203	246	246	292	292	268	268	262	262	0	0	240	240
Bac_3149	4	285	285	0	0	379	379	203	203	246	246	282	298	268	268	276	290	0	0	240	240

Примечание. *Виды: 1 - *R. echinata*, 2 - *S. papyracea*, 3 - *L. abietina*, 4- *B. bacillifera*; 0 – данные отсутствуют.