

На правах рукописи



ИЦКОВИЧ

Валерия Борисовна

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ И СИСТЕМАТИКА
ПРЕСНОВОДНЫХ ГУБОК**

03.00.15 – Генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владивосток

2005

Работа выполнена в лаборатории аналитической биоорганической химии Лимнологического института СО РАН, Иркутск

Научный руководитель: Доктор биологических наук, зав. лабораторией аналитической биоорганической химии ЛИН СО РАН
Беликов Сергей Иванович

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, зав. лабораторией генетики ИБМ ДВО РАН
В. А. Брыков
Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории эмбриологии ИБМ ДВО РАН
А. В. Чернышев

Ведущая организация: Кафедра эмбриологии биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета

Защита состоится “14” октября 2005 г. в “16” часов на заседании диссертационного совета Д005.008.01 при Институте биологии моря ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Автореферат разослан “9” сентября 2005 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Вашенко

М. А. Ващенко

2006-4
11005

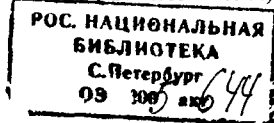
3 2165156

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Байкал является древнейшим и самым глубоким пресноводным озером Земли. По видовому разнообразию и уровню эндемизма Байкал занимает первое место среди всех озер и является уникальной моделью для изучения процессов видообразования и эволюции (Тимошкин, 1999).

Байкальские губки (семейства *Lubomirskiidae* и *Spongillidae*) являются одним из главных компонентов литоральных экосистем озера. Семейство *Lubomirskiidae* является эндемиком озера Байкал. Недавний пересмотр систематики этого семейства позволил описать ряд новых видов, однако в сборах имеются образцы с неясным таксономическим положением (Ефремова, 2001 а, б). Нерешенным является вопрос и о происхождении губок Байкала наряду с другими семействами пресноводных губок, обитающими в древних озерах (Танганьика и Охрид). Проблема полифилетического или монофилетического происхождения мировой пресноводной фауны губок неоднократно привлекала внимание исследователей (Marshall, 1885; Brien, 1970; Volkmer-Ribeiro, De Rosa-Barbosa, 1978) и остается актуальной и в настоящее время.

Губки обладают низким уровнем целостности организма и исключительной морфологической пластичностью (Колтун, 1988). Морфологическая пластичность губок отражается в широкой внутривидовой вариабельности и межвидовом сходстве. Поэтому применение методов морфологии для систематики и филогении губок в ряде случаев ограничено отсутствием четких морфологических критериев. Для уточнения классификации и филогении губок актуальным является применение методов молекулярной биологии. Так, анализ ряда генов у морских семейств губок позволил прояснить их филогенетические взаимоотношения (Kelly-Borges et al., 1991; Shombard et al., 1997; Borchellini et al., 2004). Поэтому необходимо было провести подобные исследования и на пресноводных губках Байкала. Развитие методов, основанных на сравнении нуклеотидных последовательностей ДНК организмов, привело в последнее время к большому прогрессу в области систематики и эволюции. Использование в качестве анализируемых признаков последовательностей ДНК обладает важным преимуществом перед использованием морфологических признаков. На основе гипотезы молекулярных часов (Zuckerkandl, Pauling, 1962),



анализ последовательностей ДНК позволяет не только установить филогенетические связи между видами, но и определить время дивергенции видов от общего предка.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – изучить эволюционные взаимоотношения и происхождение эндемичных байкальских и космополитных пресноводных семейств губок на основе сравнения нескольких генов.

Задачи исследования. В работе решались следующие задачи:

1. Определить нуклеотидные последовательности фрагментов генов 18S рРНК, цитохром с оксидазы субъединицы I, бета-тубулина, а также ITS района рибосомной РНК исследуемых видов губок.
2. Провести анализ полученных нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических схем, отражающих эволюционные взаимоотношения между видами.
3. Сопоставить полученные результаты с имеющимися схемами и классификациями, а также данными палеонтологических исследований.

Научная новизна. В настоящей работе впервые для анализа филогении пресноводных губок были применены молекулярные методы исследования. Проведена оценка филогенетических отношений между видами семейств Lubomirskiidae и Spongillidae, а также их эволюционных связей с морской спонгиозауной на основе анализа фрагментов нескольких генов: 18S рРНК, цитохром с оксидазы субъединицы I, бета-тубулина и ITS района рибосомной РНК. Проведенный анализ интронов генов является новым подходом в изучении молекулярной филогении эндемичных организмов Байкала. Анализ митохондриального гена был проведен впервые не только для пресноводных губок, но и для всей фауны Porifera.

В настоящей работе впервые показано, что семейства Lubomirskiidae и Spongillidae являются монофилетичными и имеют общее происхождение с третьим семейством пресноводных губок – Potamolepidae. Определены участки генов, которые являются генетическими маркерами видов и могут использоваться для целей геносистематики губок.

Практическая значимость работы. Губки, являющиеся биофильтраторами и играющие большую роль в процессах естественной очистки байкальской воды, являются важным объектом экологических исследований. Проведенные исследования филогении пресноводных

губок на основе анализа ряда генов важны для получения наиболее полной информации о видовом составе данной группы организмов, а также путях ее эволюции и ходе видообразования. Полученные данные помогут спланировать мероприятия по охране и рациональному использованию природных ресурсов Байкала. Учитывая, что губки являются продуцентами биологически активных веществ, большое практическое значение имеет также разработка методов геносистематики губок.

Внедрение в практику. Полученные нуклеотидные последовательности генов депонированы в международный компьютерный банк данных GenBank.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Семейства пресноводных губок Lubomirskiidae и Spongillidae являются монофилетичными.
2. Пресноводные семейства губок Lubomirskiidae, Spongillidae и Potamolepidae имеют общее происхождение.
3. Приблизительная оценка времени дивергенции семейства Lubomirskiidae не превышает геологического возраста озера Байкал.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены: на V международном симпозиуме по губкам (“5th International Sponge Symposium”, Сидней, 1998); на VI международной конференции по губкам (“VI International Sponge Conference”, Генуя, 2002); на Конференции по древним озерам (“Conference on Ancient Lakes: their Biological and Cultural Diversities (ICAL)”, Иркутск, 1997); на Международном симпозиуме по озеру Байкал (“Joint International Symposium on Lake Baikal”, Иркутск, 1998); на III международном симпозиуме “Видообразование в древних озерах (Third International Symposium “Ancient Lakes: Speciation, Development in Time and Space, Natural History”, Иркутск, 2002); на Международной конференции “Живые клетки диатомей” (“The living diatom cells”, Иркутск, 2004).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы и 4 приложений. Работа изложена на 112 страницах, иллюстрирована 10 рисунками и 4 таблицами. Список литературы содержит 129 наименований, в том числе 96 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему руководителю д. б. н. С. И. Беликову и директору ЛИН СО РАН академику РАН М. А. Грачеву за всестороннюю помощь и поддержку в работе. Автор глубоко признателен к. б. н. С. М. Ефремовой за неоценимое содействие в выполнении работы и важные замечания по тексту диссертации. Автор выражает особую благодарность Й. Масуда, Е. В. Вейнберг и О. Ю. Глызиной за творческое сотрудничество и помощь в сборе образцов. Мы искренне благодарны д. б. н. Д. Ю. Щербакову за помощь в математической обработке данных, к. б. н. Т. А. Щербаковой, к. б. н. С. В. Кирильчик и д. б. н. О. А. Тимошкину за ценные замечания и полезную критику. Автор благодарит всех сотрудников лаборатории аналитической биоорганической химии Лимнологического института СО РАН за содействие в выполнении работы. Наши благодарности адресованы также команде НИС «Обручев» за помощь в проведении экспедиций по озеру Байкал. Работа выполнена при финансовой поддержке фондов РФФИ (97-04-96172, 01-04-97229), INTAS (96-1787, INTAS-YSF 2002-0382), DFG (436 RUS/17/20/01) и японско-российского центра молодежных обменов (Obuchi fellowship).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы байкальских видов были собраны в ходе экспедиций по озеру Байкал в литоральной зоне Южного, Среднего и Северного Байкала в 1993 – 2000 гг. Видовая идентификация образцов была проведена С. М. Ефремовой (БиНИИ Санкт-Петербургского госуниверситета) и Й. Масудой (Медицинская школа Кавасаки, Япония). Образцы космополитных пресноводных и морских губок были любезно предоставлены сотрудниками Медицинской школы Кавасаки (Япония) и БиНИИ Санкт-Петербургского госуниверситета. Для молекулярного анализа были использованы образцы 11 видов эндемичного семейства *Lubomirskiidae*, 13 видов семейства *Spongillidae*, 1 вида семейства *Potamolepidae*, 3 видов семейства *Halichondriidae* и 1 вида семейства *Haliclonidae*. Суммарную ДНК выделяли из менее заселенной симбионтами внутренней части губки. Для этой цели использовали традиционный фенол–хлороформный метод (Sambrook et al., 1967), метод с использованием цетилтриметиламмоний бромида (Gustincich, 1991), а также наборы для выделения ДНК Genomic-tip 100G Kit (QIAGEN).

Подбор праймеров для амплификации выбранных участков генов проводили на основе опубликованных в GenBank последовательностей генов губок с использованием программы GENTOOLS (Resenchuk, 1991).

Два перекрывающихся фрагмента, включающие V4 и V5 районы 18S рРНК, общей длиной 630 пар нуклеотидов (п. н.) были амплифицированы с праймерами:

№1 5'- TAAAAAGCTCGTAGTTGGAT -3';

№2 5'- GTAGTGGCCTACCATGGTTGC -3';

№3 5'- GGACTACGACGGTATCTGAT -3';

№4 5'- СТААТТТТТТCAAAGTAAACGTCCCGA -3'

Фрагмент COXI гена размером 650 п.н. амплифицировали с праймерами:

№5 5'- GGTC AACAAATCATAAAGATATTGG -3'

№6 5'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA -3'

Для амплификации фрагмента гена бета-тубулина длиной около 515 (п.н.) использованы праймеры:

№7 5'-TGGGAAGTCATTTTCAGACGAACACGG -3'

№8 5'-GATTCTGTCAGGGAATTCCTCCCTGATCTTTGA -3'.

Для амплификации ITS района рибосомной РНК длиной около 1060 пар нуклеотидов использованы праймеры:

№9 5'- GATGAAGATCGCAGC -3'

№10 5'- ACCTGGAAATGCACGTC -3'

Амплификацию проводили в амплификаторе фирмы Perkin-Elmer. Выделение продукта из агарозы проводили на колонках QIAquick Spin column (QIAGEN) или последовательным замораживанием-оттаиванием. Очищенные продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) были клонированы в векторе pGEMT-Easy (Promega). Секвенирование фрагментов 18S рибосомной РНК проводили по двум цепям с использованием fmol DNA Sequencing System (Promega) и альфа [33]dATP согласно протоколу фирмы Promega. Секвенирование фрагментов гена COXI, бета-тубулина и ITS спейсеров проводили на автоматических секвенаторах DNA Analyzer Gene Reader IR 400 (LICOR) с использованием стандартного набора Deaza-Termination Kit (Amersham) и ABI 373A automatic DNA Sequencer (Applied Biosystems) с использованием стандартного набора BigDye Termination Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно методикам фирмы Amersham и Applied Biosystems. Анализ полученных структур был проведен с помощью программ BLAST (Altschul et al., 1997), GeneTools

(Resenchuk, 1991), CLUSTAL W (Thompson et al., 1997), MEGA 1.01 (Kumar et al., 1993), PHYLIP (Felsenstein, 1995), PUZZLE 4.0 (Strimmer, Haeseler, 1997) и MrBayes v3.0 (Huelsenbeck, 2000). Для филогенетического анализа также были использованы последовательности генов других видов губок, опубликованные в GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 18S рРНК

Существующая молекулярная филогения морских губок почти целиком основана на генах рибосомной РНК (рРНК). Нами определены последовательности фрагментов гена 18S рРНК длиной 630 п.н. для 8 видов губок: *Swartschewskia papyracea*, *Lubomirskia abietina*, *Baikalospongia bacillifera*, *Spongilla lacustris*, *Ephydatia muelleri*, *Eunapius* sp., *Potamolepidae* sp., *Halichondria japonica*. Полученные структуры имеют 95% гомологии. На филогенетическом древе, полученном методом объединения ближайших соседей (рис. 1), виды байкальских эндемичных губок семейства Lubomirskiidae (*S. papyracea*, *L. abietina*, *B. bacillifera*) образуют единый кластер, включающий также пресноводную космополитную губку семейства Spongillidae *Clipeatula cooperensis*. Ближайшей к нему является группа, включающая космополитных губок семейства Spongillidae: *E. muelleri*, *S. lacustris*, *E. fragilis* и *Eunapius* sp. В этой же монофилетической группе находится вид *Potamolepidae* sp. из пресноводного семейства Potamolepidae. Филогенетические деревья, полученные методами максимального правдоподобия и максимальной экономии имеют сходную топологию. То, что все пресноводные губки с высокой бутстреп-поддержкой (100%) объединяются в одну группу, указывает на их монофилетическое происхождение. Характер ветвления дерева позволяет сделать предположения о порядке дивергенции исследованных семейств пресноводных губок от общего предка. Согласно этой топологии, семейство Potamolepidae является наиболее древним. Позднее, вероятно, дивергировало семейство Spongillidae и наиболее молодым является семейство Lubomirskiidae. Учитывая длину ветвей можно сказать, что дивергенция пресноводных губок от морских произошла значительно раньше, чем отделение эндемичного семейства Lubomirskiidae от космополитного Spongillidae. Ветвление внутри группы видов семейства Lubomirskiidae разрешено недостаточно, что

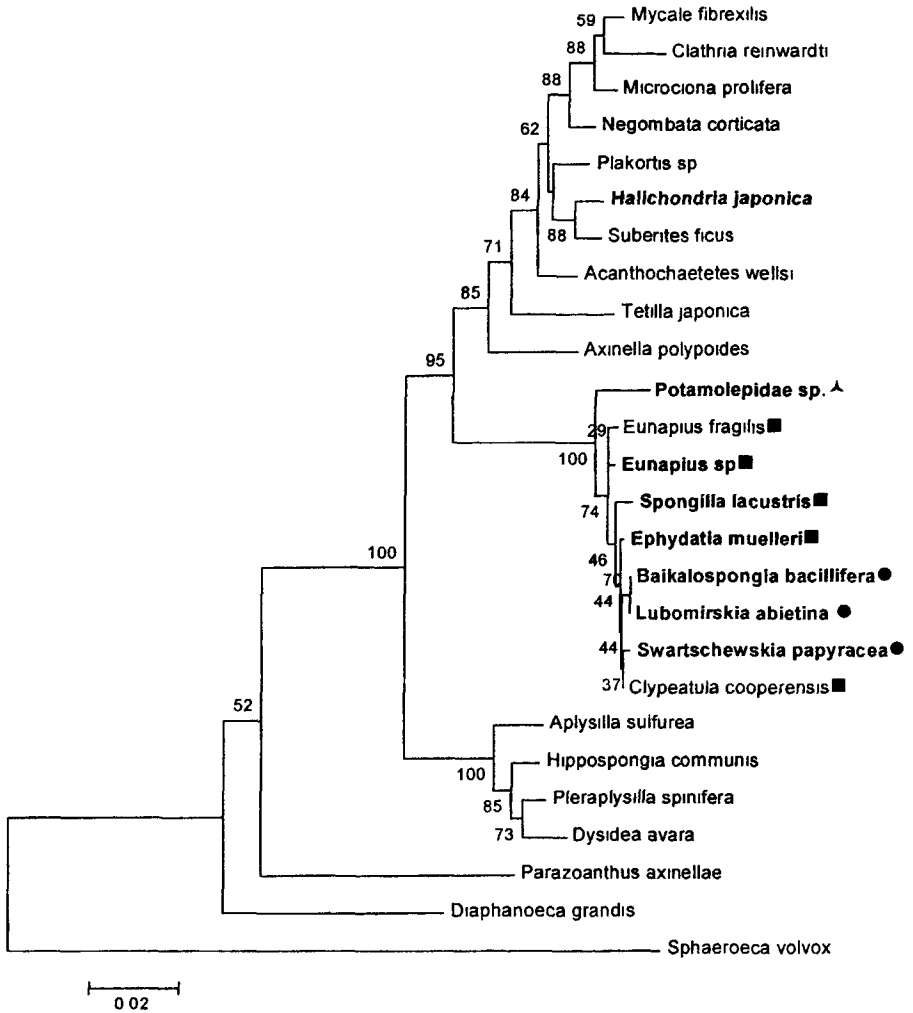


Рис. 1. Филогенетическое дерево, полученное методом объединения ближайших соседей на основе последовательностей гена 18S рРНК. Цифрами показаны значения бутстреп-поддержки. Жирным шрифтом выделены последовательности, полученные в данной работе

- виды семейства Lubomirskiidae
- виды семейства Spongillidae
- ▲ вид семейства Potamolepidae

отражено низкими значениями бутстреп-поддержки (37–70%), однако при любых анализах ветвь *Swartschewskia papyracea* отделяется от тесного кластера, состоящего из *Lubomirskia* и *Baikalospongia*. Данный вид отличается также особенностями экологии и морфологии. Таким образом, данные о частичных последовательностях 18S рРНК указывают на общее происхождение пресноводных губок и опровергают гипотезу о полифилетическом происхождении пресноводных спонгиофауны. Недостаточная вариабельность данного гена не позволяет использовать его для построения филогении пресноводных губок на уровне рода и вида. Поэтому для этих целей были проведены исследования нуклеотидной структуры ITS района рибосомной РНК.

Анализ нуклеотидных последовательностей ITS района рибосомной РНК

Были определены нуклеотидные последовательности ITS района рибосомной РНК 13 видов пресноводных губок из сем. Spongillidae, 11 видов из сем. Lubomirskiidae и 1 вида из сем. Potamolepidae. Данный участок генома включает 3' конец 18S рРНК, внутренний транскрибируемый спейсер ITS1, 5S рРНК, внутренний транскрибируемый спейсер ITS2 и 5' конец 28S рРНК (рис. 2). Длина проанализированных последовательностей составила около 1060 п. н. Длина ITS1 варьирует у разных видов в пределах от 215 до 260 п.н., ITS2 – от 237 до 294 п.н. Наибольшие отличия имеются в ITS1 и ITS2 спейсерах рРНК, в то время как участки 18S и 28S рРНК являются консервативными. Филогенетические деревья, полученные методами объединения ближайших соседей (рис. 3), максимальной экономии и

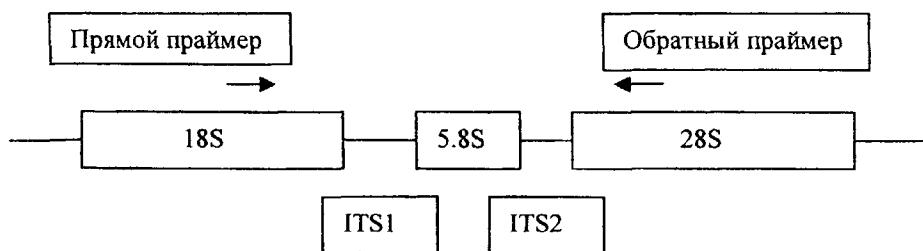


Рис. 2. Схема расположения внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1, ITS2) относительно генов 18S и 28S рРНК и позиции использованных праймеров.

максимального правдоподобия имеют сходную топологию. На полученных филогенетических деревьях все пресноводные губки имеют общего предка. Семейства Lubomirskiidae и Spongillidae монофилетичны. Дивергенция пресноводных семейств губок от общего предка происходила в следующем порядке: Potamolepidae, Spongillidae, Lubomirskiidae. Все виды Lubomirskiidae с высокой степенью бутстреп-поддержки (99–100%) образуют одну монофилетическую группу. Внутри данной группы ветвление разрешено недостаточно из-за низкого уровня дивергенции между последовательностями ITS района. Кластеризация видов внутри семейства Spongillidae согласуется с данными систематики по морфологическим признакам (Penney, Racek, 1968; Masuda, 1998; Mancony, Pronzato, 2002). Среди изученных родов пресноводных губок наиболее базально расположен род *Ephydatia*, что указывает на его большую близость к общему предку пресноводных губок как семейства Lubomirskiidae, так и семейства Spongillidae. Проведенный анализ ITS района рибосомной РНК показал, что семейства Spongillidae и Lubomirskiidae монофилетичны, из трех семейств пресноводных губок Lubomirskiidae является наиболее эволюционно молодым. Эти результаты хорошо согласуются с полученными нами данными по гену 18S рРНК и с выводами Ефремовой (1982, 1986) о происхождении любомирскиид от спонгиллид, полученными на основе данных цитологических и эмбриологических исследований.

Разработка способа видовой идентификации губок с неопределенными морфологическими признаками

Классификация пресноводных губок основана на форме и размерах спикул, однако эти признаки подвержены большой вариабельности, что часто затрудняет видовую идентификацию (Ефремова, 2001 а, б). Полученные нами данные показали наличие замен по последовательностям ITS района рРНК у разных видов губок. Мы проанализировали эти последовательности у ряда образцов, идентификация которых на основе морфологических признаков была затруднена. Часть из них после проведенного анализа ITS-спейсерного участка рРНК была отнесена к видам *Eunapius sinensis*, *Ephydatia muelleri* и *Heterorotula multidentata*. Образец из оз. Байкал, отнесенный по морфологической классификации к сем. Spongillidae, а именно виду *Trochospongilla* sp., согласно молекулярным данным кластеризуется вместе с видом *Baikalospongia* sp. из сем. Lubomirskiidae, и, возможно,

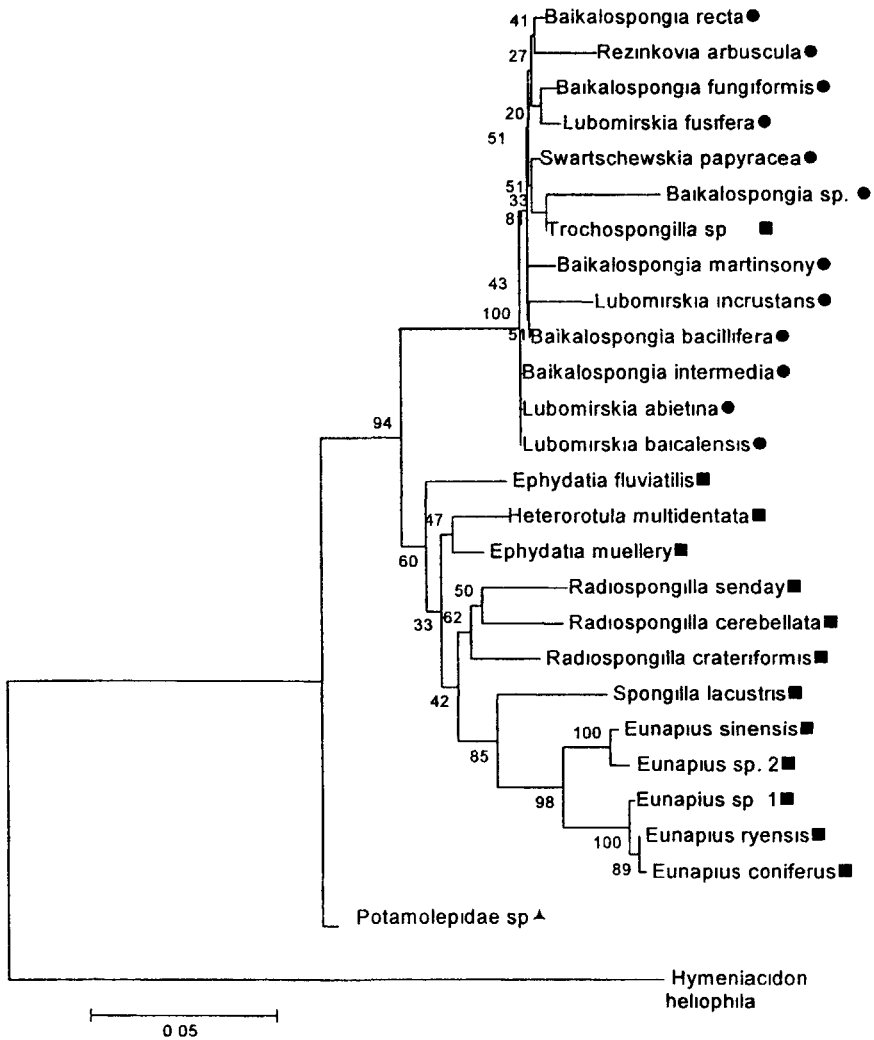


Рис. 3. Филогенетическое дерево, полученное методом объединения ближайших соседей на основе последовательностей ITS района рРНК. Цифрами показаны значения бутстреп-поддержки.

- виды семейства Lubomirskiidae
- виды семейства Spongillidae
- ▲ вид семейства Potamolepidae

является новым видом из этого сем. Нуклеотидная последовательность ITS района рРНК образца, имеющего смешанные спикулы, характерные для *Ephydatia fluviatilis* и *Sanidastra yokotonensis*, оказалась идентичной таковой у *E. fluviatilis*. Таким образом, анализ последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров указывает на то, что *S. yokotonensis*, возможно, является синонимом *E. fluviatilis*. Анализ 5 образцов, относящихся к роду *Eunapius*, видовой статус которых на основе признаков морфологии невозможно было определить, показал, что последовательности 4 образцов, обозначенных как *Eunapius* sp. 2, оказались практически идентичными, тогда как последовательность пятого, обозначенного как *Eunapius* sp. 1 – достаточно дистантной. Данные губки также отличались по нуклеотидной последовательности ITS района от всех остальных проанализированных видов рода *Eunapius*. При этом *Eunapius* sp. 2 имеет 97% гомологии с *Eunapius sinensis*, а *Eunapius* sp. 1 – 98% гомологии с *Eunapius coniferus* и *Eunapius ryuensis*. Отличия в форме спикул (Masuda, перс. сообщ.) и полученные нами молекулярные данные, возможно, говорят о необходимости присвоения данным формам статуса новых видов или подвидов. Достаточное количество замен говорит о возможности использования для видовой идентификации короткого фрагмента генома (200–300 п. н.), что значительно проще и дешевле, чем определение полноразмерной нуклеотидной последовательности 18S рибосомной РНК, используемое для этих целей в настоящее время (Peterson, 1999). Таким образом, последовательности ITS района рРНК могут быть эффективно использованы для видовой идентификации губок. Однако, поскольку внутри группы видов семейства Lubomirskiidae уровень дивергенции между последовательностями ITS района рРНК чрезвычайно низок, для разделения близкородственных видов эндемичных байкальских губок был проведен анализ интрона гена бета-тубулина.

Анализ нуклеотидных последовательностей интрона гена бета-тубулина

Были определены нуклеотидные последовательности интрона гена бета-тубулина, соответствующего области интрона 2 (рис. 4) в структуре гена бета-тубулина человека (Lewis et al., 1985) для 3 видов байкальских губок, 1 вида космополитных пресноводных и одной морской губки. Показано, что у губок размер данного интрона

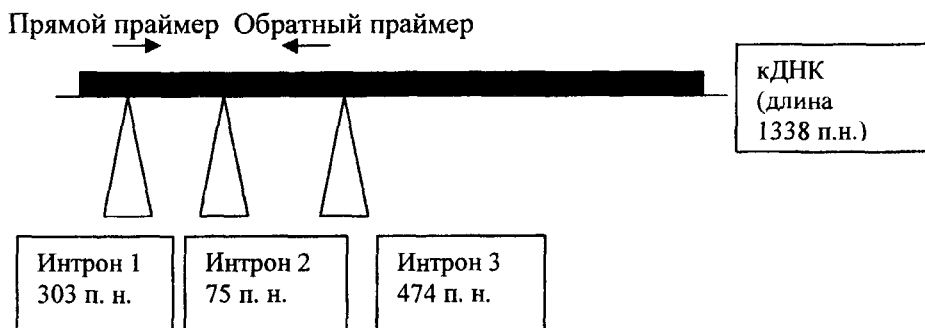


Рис. 4. Интрон/экзонная организация гена бета2-тубулина человека (GenBank номер NM006088) и позиции использованных праймеров.

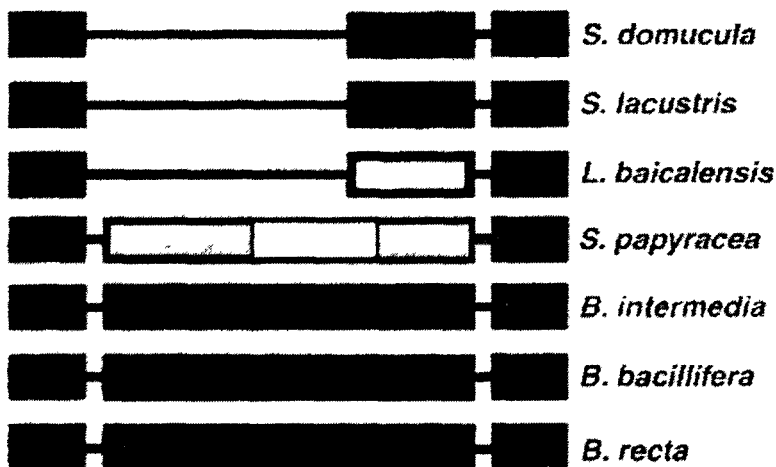


Рис. 5. Схематическое изображение полученных фрагментов интрона 2 гена бета-тубулина. Черным цветом показаны наиболее консервативные участки, серым – менее консервативные, белым – неконсервативный участок интрона.

варьирует от 50 п.н. (*Lubomirskia baicalensis*) до 89 п.н. (*Baikalospongia intermedia*, *Baikalospongia bacillifera*, *Baikalospongia recta*).

Проведена оценка размера и расположения интрона у морских и пресноводных губок (рис. 5). Интрон *Suberitus domuncula* и *Spongilla lacustris* идентичен и является коротким. От него происходит интрон *Lubomirskia baicalensis*, вероятно путем утраты центральной части. Структурное сравнение интронов трех видов рода *Baikalospongia* показывает, что данные интроны, вероятно, увеличились в размере в ходе эволюции. Проведенный структурный анализ интронов показал, что, поскольку *S. lacustris* имеет интрон, сходный с интроном морской губки *S. domuncula*, то, по всей вероятности, этот вид является филогенетически наиболее древним из всех исследованных пресноводных губок. Сходство интронов видов рода *Baikalospongia* соответствует существующей систематике и указывает на то, что данный род является монофилетичным. Наличие замен в полученной последовательности гена тубулина байкальской губки *Baikalospongia recta* свидетельствует в пользу правомерности недавнего выделения этого вида как самостоятельного (Ефремова, 1999). Было показано, что интрон *Swartschewskia papyracea* имеет большее, чем у других исследованных видов байкальских губок, количество замен.

Таким образом, анализ интронов гена бета-тубулина позволил разделить близкородственные виды трех родов эндемичного семейства *Lubomirskiidae*. Для приблизительной оценки времени дивергенции между семействами пресноводных губок впервые был проведен анализ гена COXI.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов гена первой субъединицы митохондриальной цитохром с оксидазы

Митохондриальные гены, эволюционирующие у многих организмов примерно в 10 раз быстрее, чем ядерные (Wolstenholme, 1992), широко применяются для изучения филогенетических отношений между близкородственными видами.

Для губок анализ митохондриальных генов был проведен нами впервые. Были определены частичные последовательности COXI гена (676 п.н.) восьми видов губок родов *Lubomirskia*, *Baikalospongia*, *Swartschewskia*, *Spongilla*, *Halichondria*, *Haliclona* и *Suberitus*, а также вида *Potamolepidae* sp. Анализ полученных последовательностей показал наличие большего количества замен в первичной нуклеотидной последовательности COXI гена морской губки рода *Suberitus*, по

сравнению с таковыми у пресноводных губок. Во всех полученных последовательностях обнаружена единая рамка считывания без сдвигов и стоп-кодона. Набор выравненных последовательностей содержит 241 вариабельный сайт, из которых 138 информативны в кладистическом смысле. Анализ попарного сравнения нуклеотидных последовательностей показал, что наибольшее количество замен является синонимичными заменами в третьем положении кодона. Поскольку между полученными последовательностями COXI гена пресноводных губок имеются лишь единичные замены, для филогенетического анализа мы использовали нуклеотидные последовательности и замены во всех трех положениях кодона.

Уровень гомологии между последовательностями COXI гена у морской и пресноводных губок составляет около 80%, между последовательностями у пресноводных губок разных родов – 99%. Последовательности COXI гена у пресноводных видов губок семейств *Lubomirskiidae* и *Potamolepidae* отличаются незначительно, а у видов из сем. *Lubomirskiidae* являются идентичными. Малое количество замен в нуклеотидных последовательностях гена COXI, сравнимое с количеством замен в гене 18S рРНК, противоречит представлениям о повышенной скорости эволюции митохондриального генома у большинства организмов. На полученном филогенетическом древе (рис. 6) все пресноводные губки образуют один монофилетический кластер с высокой бутстреп-поддержкой. Внутри данного кластера имеется две группы, одна из которых состоит из представителей сем. *Lubomirskiidae*, а другая – из представителей семейств *Spongillidae* и *Potamolepidae*. Наибольшую бутстреп-поддержку получили группа, объединяющая всех пресноводных губок (100%) и кластер, объединяющий виды семейства *Lubomirskiidae* (96%). Филогенетические деревья, полученные другими методами анализа, имеют сходную топологию. Характер ветвления филогенетических деревьев, полученных на основе анализа последовательностей гена COXI, сходен с характером ветвления филогенетических деревьев, полученных на основе анализа последовательностей 18S рРНК. На этих дендрограммах семейства *Spongillidae* и *Potamolepidae* расположены ближе к общему предку всех пресноводных губок, а семейство *Lubomirskiidae* выглядит дивергировавшим позднее. Таким образом, согласно результатам анализа нуклеотидной последовательности COXI

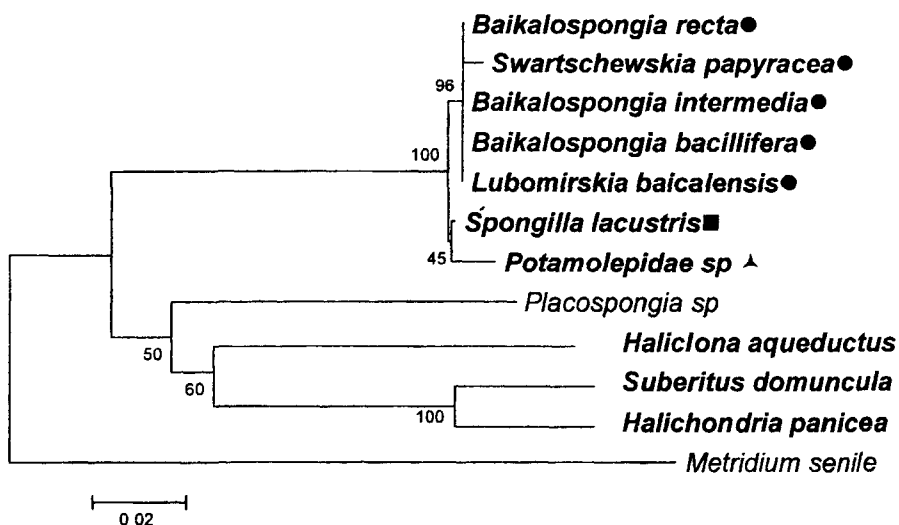


Рис. 6. Филогенетическое древо, полученное методом объединения ближайших соседей на основе последовательностей гена COXI. Цифрами показаны значения бутстреп-поддержки. Жирным шрифтом выделены последовательности, полученные в данной работе.

● виды семейства Lubomirskiidae

■ вид семейства Spongillidae

▲ вид семейства Potamolepidae

гена, эндемичное семейство Lubomirskiidae является монофилетичным, как и вся группа пресноводных губок.

Оценка времени дивергенции байкальских губок

Для приблизительной оценки времени дивергенции байкальских губок от космополитных пресноводных губок нами был использован ген первой субъединицы цитохром с оксидазы, эволюция которого более соответствует гипотезе молекулярных часов (Saccone et al., 1999), чем эволюция исследованных нами генов рРНК и интронных последовательностей.

Для оценки постоянства скорости нуклеотидных замен был применен двухкластерный тест и тест на отношение длин ветвей (Takezaki et al., 1995). Оценка равномерности эволюции гена COXI у

Табл. 1. Генетические расстояния, подсчитанные по двух-параметровому методу Кимура на основе последовательностей СОХI гена для всех видов губок, входящих в анализ.

№	Вид	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<i>Suberitus domuncula</i>											
2	<i>Halichondria panicea</i>	0,081										
3	<i>Haliclona aqueductus</i>	0,187	0,197									
4	<i>Baikalospongia recta</i>	0,205	0,193	0,195								
5	<i>Baikalospongia bacillifera</i>	0,205	0,193	0,195	0,000							
6	<i>Lubomurskia baicalensis</i>	0,205	0,193	0,195	0,000	0,000						
7	<i>Baikalospongia intermedia</i>	0,205	0,193	0,195	0,000	0,000	0,000					
8	<i>Swartschewskia papyracea</i>	0,207	0,195	0,201	0,004	0,004	0,004	0,004				
9	<i>Spongilla lacustris</i>	0,201	0,193	0,191	0,004	0,004	0,004	0,004	0,009			
10	<i>Potamolepidae sp</i>	0,213	0,205	0,199	0,013	0,013	0,013	0,013	0,018	0,010		
11	<i>Placospongia sp</i>	0,167	0,190	0,180	0,161	0,161	0,161	0,161	0,163	0,157	0,163	
12	<i>Metridium senile</i>	0,264	0,272	0,258	0,240	0,240	0,240	0,247	0,242	0,205	0,248	0,274

байкальских и морских губок показала, что для многих ветвей филогенетического древа скорость эволюции не является постоянной (значение $Z > 1$), поэтому расчет времени дивергенции пресноводных губок является приблизительным.

Проведен подсчет генетических дистанций по двухпараметровому методу Кимура для всех видов, входящих в анализ (Табл. 1). В заключение подсчитаны средние генетические дистанции между кластерами близкородственных видов. Так, средняя генетическая дистанция между семействами *Lubomirskiidae* и *Spongillidae* составила 0,5% нуклеотидных замен, между видами семейства *Lubomirskiidae* – 0,2%, между пресноводными и морскими *Porifera* – 19%.

Согласно палеонтологическим данным, возраст первых пресноводных губок оценивается в интервале от 50 до 150 млн. лет (Mancony, Pronzato, 2002). Учитывая это, а также полученные генетические дистанции между морскими и пресноводными губками, мы получили скорость накопления замен, равную около 0,1–0,4 % нуклеотидных замен за 1 млн. лет.

Стандартная скорость эволюции митохондриального генома многоклеточных равна 1–2% нуклеотидных замен за 1 млн. лет (Wolstenholme, 1992). Полученные нами данные показали замедленную скорость эволюции митохондриального генома у губок по сравнению со стандартными значениями. Замедленная скорость эволюции митохондриальных генов у низших беспозвоночных отмечается также в недавно опубликованных работах других авторов (Shearer et al., 2002). Основываясь на полученных результатах, мы получили следующие временные интервалы: для дивергенции между семействами *Lubomirskiidae* и *Spongillidae* – 1,3–3,8 млн. лет, для дивергенции видов внутри *Lubomirskiidae* – 0,5–1,5 млн. лет. Временные оценки, полученные нами при анализе гена первой субъединицы цитохром с оксидазы, хорошо согласуются с данными по другим бентосным организмам Байкала (Зубаков, 1997; Kaigorodova, 1999).

ВЫВОДЫ

1. На основании сравнительного филогенетического анализа генов 18S рРНК, COXI, бета-тубулина и ITS района рРНК доказано, что семейства Lubomirskiidae и Spongillidae являются монофилетичными, а мировая пресноводная фауна губок имеет общее происхождение.
2. Оценка времени дивергенции семейства Lubomirskiidae, проведенная на основе анализа последовательностей COXI гена, составляет 1,3–3,8 млн. лет, что не превышает геологического возраста озера Байкал и указывает на автохтонную эволюцию данного семейства.
3. Впервые показано, что накопление нуклеотидных замен у близкородственных видов губок происходит за счет вставок и делеций в области интронов ядерной ДНК, тогда как точечные замены в кодирующих областях ядерного и митохондриального генома накапливаются с меньшей скоростью. Эволюция митохондриального генома у губок является замедленной по сравнению с большинством других многоклеточных, и составляет 0,1–0,4 % нуклеотидных замен в 1 млн. лет.
4. Об относительной молодости сем. Lubomirskiidae свидетельствуют чрезвычайно малые генетические дистанции между видами этого семейства, по сравнению с дистанциями между видами внутри Spongillidae.
5. Внутри Lubomirskiidae вид *Swartschewskia papyracea* вероятно дивергировал раньше остальных видов.
6. Последовательности спейсеров рибосомной РНК (ITS1, ITS2) и интрона гена бета-тубулина могут быть использованы для идентификации видов у губок.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Masuda Y., Itskovich V., Weinberg E., Efremova S. Studies on the taxonomy and distribution of freshwater sponges in Lake Baikal // Int. Conference on Ancient Lakes: their Biological and Cultural Diversities (ICAL'97): Abstracts. Irkutsk, 1997. P. 218.
2. Masuda Y., Itskovich V., Weinberg E., Efremova S. Studies on the taxonomy and distribution of freshwater sponges in Lake Baikal // Animal Community, Environment and Phylogeny in Lake Baikal.

- Otsuchi Marine Research Center: University of Tokyo Press. 1997. P. 21 – 41.
3. Masuda Y., Itskovich V., Weinberg E.V., Efremova S.M. Study on the distribution of Baikalian sponges // 5th Int. Sponge Symposium 'Origin and Outlook': Abstracts. Brisbane, Australia. 1998. P. 46 – 47.
 4. Itskovich V., Belikov S.I., Efremova S.M., Masuda Y. Molecular phylogeny of freshwater sponges (Families Lubomirskiidae and Spongillidae) and their relationships with sea sponges // 5th Int. Sponge Symposium 'Origin and Outlook': Abstracts. Brisbane, Australia. 1998. P. 30.
 5. Masuda Y., Itskovich V., Weinberg E.V., Efremova S.M. A study on the distribution of freshwater sponges in Lake Baikal // Joint Int. Symposium on Lake Baikal: Abstracts. Irkutsk. 1998. P. 66 – 67.
 6. Masuda Y., Itskovich V., Weinberg E.V., Efremova S.M. Perspective studies of freshwater sponges in Lake Baikal // Berliner geowiss. Abh. Berlin. 1999. P. 329 – 332.
 7. Masuda Y., Itskovich V., Weinberg E.V., Efremova S.M. A study on the distribution of freshwater sponges in Lake Baikal // Biodiversity, Phylogeny and Environmental in Lake Baikal: Abstracts. Otsuchi Marine Research Center: University of Tokyo Press. 1999. P. 216.
 8. Masuda Y., Itskovich V.B., Weinberg E.V., Efremova S.M. A study of the vertical distribution of freshwater sponges in the littoral zone of Lake Baikal // Biodiversity, Phylogeny and Environmental in Lake Baikal. Otsuchi Marine Research Center: University of Tokyo Press. 1999. P. 25 – 34.
 9. Itskovich V.B., Belikov S.I., Efremova S.M., Masuda Y. Phylogenetic relationships between Lubomirskiidae, and some marine sponges according partial sequences of 18S rDNA // Biodiversity, Phylogeny and Environmental in Lake Baikal. Otsuchi Marine Research Center: University of Tokyo Press. 1999. P. 35 – 44.
 10. Itskovich V.B., Belikov S.I., Efremova S.M., Masuda Y. Phylogenetic relationship between Lubomirskiidae, Spongillidae and some marine sponges according partial sequences of 18S rDNA // Memoirs of the Queensland Museum / Proceed. 5th Int. Sponge Symp. 1999. P. 275 – 280.
 11. Ицкович В.Б., Беликов С.И., Ефремова С.М., Масуда Й. Изучение филогенетических связей пресноводных губок Байкала методом

- анализа структур гена 18S рРНК // Сиб. экол. журн. 1999. № 6. С. 639 – 643.
12. Itskovich V.B., Belikov S.I., Efremova S.M., Masuda Y., Krasko A., Schröder H. C, Müller W. E.G. Monophyletic origin of freshwater sponges in ancient lakes based on partial structures of the COX1 gene // Third Int. Symposium “Ancient Lakes: Speciation, Development in Time and Space, Natural History”: Abstracts. Novosibirsk: Nauka. 2002. P. 64.
 13. Müller W.E.G., Efremova S.M., Itskovich V.B., Belikov S., Masuda Y., Krasko A., Müller I.M., Schröder H.C. New approaches to resolve the phylogenetic relationship of the freshwater sponges in lake Baikal // Third Int. Symposium “Ancient Lakes: Speciation, Development in Time and Space, Natural History”: Abstracts. Novosibirsk: Nauka. 2002. P. 115.
 14. Efremova S.M., Itskovich V.B., Parfenova V., Drucker V.V., Müller W.E.G., Schröder H.C. Lake Baikal: a unique place to study evolution of sponges and their stress response in an environment nearly unimpaired by anthropogenic perturbation // Cell Mol. Biol. 2002. V. 48, № 4. P. 359 – 371.
 15. Bonse D., Itskovich V., Janussen D., Korduan P., Masuda Y., Meixner M., Weinberg E. Evolutionary ecology of the endemic Poriferan family Lubomirskiidae and the reconstruction of the palaeoecological development in Lake Baikal based on sponge associations // VI International Sponge Conference: Abstracts. Rapallo: Boll. Mus. Inst. biol. Univ. Genova. 2002. P. 30 – 31.
 16. Schröder H.C., Efremova S.M., Itskovich V.B., Belikov S.I., Masuda Y., Krasko A., Müller I.M. and Müller W.E.G. Molecular phylogeny of the freshwater sponges in Lake Baikal // J. Zool. Syst. Evol. Research. 2003. V. 41. P. 80 – 86.
 17. Шредер Х.С., Ефремова С.М., Ицкович В.Б., Беликов С.И., Масуда Й., Краско А., Мюллер И.М., Мюллер В.Е.Г. Молекулярная филогения пресноводных губок озера Байкал // Тез. Межд. симпозиума “Живые клетки диатомей”, посвященного 100-летию со дня рождения А.П. Скабичевского. Иркутск. 2004. С. 84 – 85.
 18. Itskovich V.B., Belikov S.I., Efremova S.M., Masuda Y., Krasko A., Schröder H.C., Müller W.E.G.. Monophyletic origin of freshwater sponges in ancient lakes based on partial structures of COXI gene // Hydrobiologia. 2004 (in press).

Подписано к печати 29.07.2005 г.
Объем 1 п.л. Тираж 100 экз. Заказ № 319.
Издательство Института географии СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1

№ 16079

РНБ Русский фонд

2006-4

11005