

На правах рукописи



Анненкова Наталия Вадимовна

**Генетическое разнообразие планктонных и ассоциированных с
губками динофлагеллят озера Байкал**

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск
2010

Работа выполнена в лаборатории аналитической биоорганической химии Учреждения Российской Академии Наук Лимнологический институт Сибирского Отделения РАН, г. Иркутск.

Научный руководитель:

доктор биологических наук
профессор
Беликов Сергей Иванович
Лимнологический институт СО РАН,
г. Иркутск

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
Колесников Николай Николаевич
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО
РАН, г. Новосибирск

доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
Гончаров Андрей Анатольевич
Биолого-почвенный институт ДВО
РАН, г. Владивосток

Ведущая организация

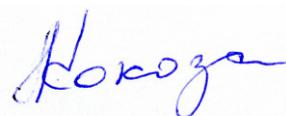
Санкт-Петербургский
государственный университет

Защита состоится: 3 декабря 2010 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.045.02 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в конференц-зале института по адресу: 630090, Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 8. Тел: +7 (383) 33-33-912

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан « ____ » _____ 2010г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е. Б. Кокоза

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Развитие методов микроскопии и генно-молекулярной идентификации позволило на качественно новом уровне исследовать одноклеточных эукариот (простейших), которые, как выяснилось, играют огромную роль в биосфере и гораздо разнообразнее по своему происхождению и строению, чем считалось ранее. Новые знания о них породили новые вопросы, в том числе дискуссию о том, существует ли небольшое число видов, встречающихся повсеместно, или же их разнообразие велико, а местообитание может быть специфичным (Taylor et al. *Philos. T. R. Soc. B: Biol.* 2006. **361**: 1947). В пользу второго предположения свидетельствует наличие скрытого разнообразия: морфологически идентичные одноклеточные отличаются генетически, в ряде случаев выявлены отличия на уровне физиологии (Boenigk et al. *Appl. Environ. Microb.* 2006. **72**: 5159). Не все простейшие одинаково культивируемы и поэтому могут быть пропущены при анализе (Epstein, López-García. *Biodivers. Conserv.* 2008. **17**: 261). Основная часть генетических исследований выполнена для простейших, обитающих в океанах; настоятельно требуются данные по пресным водоемам (Lopez-Garcia, Moreira. *Res. Microbiol.* 2008. **159**: 67). Это позволило бы определить, насколько эволюционно отличаются от морских виды, перешедшие в другие условия существования. Кроме того, озера достаточно изолированы друг от друга и часто имеют свои особенности, таким образом, являясь вероятным местом для новых, адаптированных к конкретным условиям, видов.

Dinoflagellata – большая группа простейших, образующая вместе с Apicomplexa и Ciliophora супергруппу альвеолят. Эти жгутиковые одноклеточные могут питаться за счет фотосинтеза или гетеротрофно. Целый ряд морских динофлагеллят синтезирует сильные токсины (Wang. *Mar. Drugs.* 2008. **6**: 349). Динофлагелляты-симбионты необходимы для развития коралловых рифов (Douglas. *Mar. Pollut. Bull.* 2003. **46**: 385). В настоящей работе изучены представители класса Dinophyceae из пресноводного озера Байкал. Это древнейшее и самое глубокое озеро на планете – известный центр интенсивного видообразования, многие обитатели которого эндемичны. Простейшие в нем практически не изучены, особенно молекулярными методами. Динофлагелляты составляют важную часть планктона озера, но известно о них мало и лишь на основе данных оптической микроскопии (Kozhova, Izmet'eva. *Leiden. Backhuys Publ.* 1998). Высказано предположение о наличии специфичных динофлагеллят в байкальских губках (Müller et al. *FEBS J.* 2007. **274**: 23), но их систематическое положение не изучено.

Цель исследования: В связи с вышеизложенным молекулярно-генетическая характеристика и определение видового состава динофлагеллят представляется важным шагом. Поэтому целью работы являлась сравнительная характеристика и анализ генетического разнообразия свободноплавающих и ассоциированных с губками динофлагеллят озера Байкал.

Задачи исследования: 1. Найти подходы к идентификации ДНК некультивируемых динофлагеллят, позволяющие охватить их наибольшее число. 2. Выяснить родственные связи эндемичного *Gymnodinium baicalense*, имеющего наибольшую численность

среди динофлагеллят озера Байкал. **3.** Определить генетическое разнообразие планктонных динофлагеллят в период их массового развития и уточнить фенотипические характеристики известных беспанцирных динофлагеллят. **4.** Выявить специфичные нуклеотидные последовательности динофлагеллят в различных видах байкальских губок сем. *Lubomirskiidae*. **5.** Определить филогенетическое положение байкальских динофлагеллят среди известных морских и пресноводных видов.

Научная новизна. Впервые с помощью молекулярно-генетических методов изучено разнообразие динофлагеллят в о. Байкал и исследованы динофлагелляты в пресноводных губках. В ходе работы впервые в пресноводных беспозвоночных обнаружены представители порядка *Suessiales*, ранее члены этой группы были известны как симбионты лишь морских беспозвоночных. Выявлен относительно большой спектр последовательностей ДНК динофлагеллят и определено их филогенетическое положение по отношению к известным видам. Впервые получены изображения эндемичного *Gymnodinium baicalense* при помощи сканирующей электронной микроскопии, установлено его недавнее морское происхождение.

Для оценки разнообразия организмов использован наиболее современный подход – анализ метагеномной ДНК из окружающей среды, что помогает учесть редкие или же сложно культивируемые виды. При этом проанализированы не все эукариоты из проб, а одна группа (динофлагелляты), для чего были сконструированы специфичные праймеры. Это минимизировало недоучет части искомым фрагментов ДНК, что случается при анализе всего спектра простейших. Также для более полного анализа разнообразия динофлагеллят использована природная способность губки аккумулировать в себе простейших, фильтруя воду через себя. Благодаря этому были исследованы и вероятные симбионты, и свободноживущие представители группы, скапливающиеся в губках в течение некоторого времени.

Положения, выносимые на защиту: **1.** В о. Байкал обитают, помимо известных двух родов *Gymnodinium* и *Peridinium*, представители ряда других родов и семейств. **2.** Вид *Gymnodinium baicalense* занимает филогенетическое положение среди истинных представителей рода *Gymnodinium* и наиболее близок к динофлагелляту из арктического льда. **3.** В эндемичных байкальских губках сем. *Lubomirskiidae* присутствуют нуклеотидные фрагменты неизвестных для планктона динофлагеллят. Из них две группы, относящиеся к порядку *Suessiales*, – потенциальные симбионты губок. **4.** Большая часть динофлагеллят Байкала, по-видимому, имеет недавнее морское происхождение, меньшая – перешла к жизни в пресных водах давно.

Научно-практическое значение работы. Подходы, применявшиеся в работе, могут использоваться для комплексного определения различных групп одноклеточных, особенно, не имеющих прочной клеточной стенки. Разработанные генные маркеры подходят для быстрой идентификации динофлагеллят. Полученные результаты расширяют наши знания о взаимодействии динофлагеллят с беспозвоночными, важны для понимания как особенностей динофлагеллят Байкала, так и общих закономерностей эволюции и расселения простейших. Обнаружение новых динофлагеллят позволяет проводить поиск новых полезных метаболитов, которые в том

числе могут накапливаться в байкальских губках. Показано присутствие в Байкале *Peridinium aciculiferum* (вида, известного как токсичный). Полученные данные могут использоваться при чтении лекций в учебных заведениях. В базу данных GenBank депонировано 96 отличающихся друг от друга нуклеотидных последовательностей (номера доступа: FJ024297 – FJ024304, FJ823462 – FJ823502, GQ423575 – GQ423596, GU723481 – GU723491, HQ259032 – HQ259047). Филогенетические деревья, описывающее генетическое разнообразие динофлагеллят в губках, депонированы в базу данных TreeBase (URL: <http://purl.org/phylo/treebase/phylo/low/study/TB2:S10600>).

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на конференциях: 2010 Joint meeting of the International Society of Protistologists and the British Society for Protist Biology (Университет Кента, Кентербери, Великобритания, 18-23 июля 2010); II всероссийская конференция «Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге» (Сыктывкар, 5-9 октября 2009 г.); X Съезд Гидробиологического общества при РАН (Владивосток, 28 сентября – 2 октября 2009 г.); международная конференция "Nanotechnology and Applications" of The International Association of Science and Technology for Development (Крит, Греция, 29 сентября – 1 октября 2008); IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 11- 15 мая 2008 г.); IV международная конференция «Биоразнообразие и роль животных в экосистемах» (Днепропетровск, 9 – 12 октября 2007 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 3 статьи – в журналах из списка, рекомендованного ВАК РФ.

Вклад автора. Основные результаты диссертации получены и проанализированы автором самостоятельно. Работа по подсчёту численности и промерам клеток планктонных динофлагеллят сделана совместно с к.б.н. О. И. Белых.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы (168 источников, из них 148 на английском языке) и приложения, изложена на 136 страницах, содержит 22 рисунка и 6 таблиц.

Благодарности. Выражаю искреннюю признательность профессору Лаврову Д.В. (Государственный университет Айовы, США) и к.б.н. Белых О.И. (ЛИН СО РАН) за обсуждение результатов и ценные замечания, а также сотрудникам лаборатории аналитической биоорганической химии ЛИН СО РАН за помощь в организации работы, предоставление реактивов и консультации. Благодарю директора ЛИН СО РАН академика Грачева М.А. за помощь и участие. Особую благодарность выражаю моим родителям за постоянную и всестороннюю поддержку. Работа поддержана проектами: программы РАН (базовое финансирование) № 6.1.1.10 и № VI.42.1.3, программа Президиума РАН № 23.12, Лаврентьевский молодёжный проект СО РАН № 6.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов. Пробы планктона отбирали еженедельно с марта по май 2008 и 2009 гг. в поверхностном слое воды из трещин во льду у пос. Листвянка (Южный Байкал, литораль) сетью Апштейна и батометром. Губки собрали в 2005 г. вблизи о. Ольхон

(зап. побережье Байкала) на глубине 5 – 15 метров. Видовую принадлежность определили на основе морфологии спикул. Образцы хранили в 70% этаноле при +4°C.

Оптическая, электронная микроскопия. Пробы изучали при помощи инвертированного микроскопа Axiovert 200. Виды определяли по (Пелагобионты Байкала: атлас и определитель. Н: 1995: 146). Наличие фотосинтезирующих пигментов выявляли, используя голубой (470 нм) и зеленый (545 нм) фильтры. Измерение клеток проводили с помощью программы Image-Pro Plus 4.0. Кроме того, пробы планктона фиксировали в 1% растворе OsO₄, дегидратировали клетки в градиентном растворе этанола (от 30% до 100%), затем удаляли его добавлением гексаметилдисилазана или в вакуумной установке Hitachi HCP-2/Critical Point Dryer (Япония), напыленные золотом образцы исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа Philips SEM 525M.

Выделение ДНК, конструирование праймеров, амплификация ДНК. Суммарную ДНК выделяли из проб с помощью набора ДНК-sorb B (InterLab Service, Москва) или СТАБ-методом. Дизайн специфичных для динофлагеллят праймеров проводили на основе ДНК динофлагеллят из GenBank и программы Primer Blast. Основные продукты амплификации получены с помощью праймеров L1 (5'-TTGGCCTACCGTGGCAATGAC) и R1 (5'-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG) (T_{пл}=61), ограничивающих фрагмент 18S рДНК от V1 до V5 домена. Участок, содержащий второй нетранслируемый спейсер (ITS2) и фрагменты 5.8S и 28S рДНК амплифицировали с помощью праймеров 5L (5'-GTGAATTGCAGAACTCCGTGAAC) и RR (5'-ATCCCTGTTTCATTCGCCATTACT) (T_{пл}=52); участок 18S рДНК – с помощью L1 и 5R (5'-GTTACGGAGTTCTGCAATTCAC) (T_{пл}=60); фрагмент митохондриального гена *cox1* – с помощью mF (5'-GAAAACCAGAACTTCTATAATG) и mR (5'-CGGTAAGGATATCAAGATTG) (T_{пл}=51). Продукты амплификации очищали электрофорезом в 1% легкоплавкой агарозе.

Клонирование, определение нуклеотидных последовательностей. Клонирование продуктов амплификации проводили с использованием InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas) и химически компетентных клеток. Определение нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации с клонов проводили на секвенаторе SEQ 8800 (Beckman Coulter Inc.) согласно методике фирмы-производителя.

Рестрикционный анализ (ПДРФ). Определяли последовательности ряда клонов, содержащих фрагмент 18S рДНК между праймерами L1 и R1, и с помощью программы DNAMAN 5.2.9 (Lynnon. Biosoft, Canada) подбирали рестриктазы для получения различающихся картин рестрикции. Выбрали рестриктазы *Alu1* и *Ddel*. В дальнейшем данные клоны обрабатывали отдельно ферментом *Alu1* и ферментом *Ddel* согласно протоколу. Продукты рестрикции изучали при помощи электрофореза в 2.5% агарозе.

Филогенетический анализ. По расшифрованным фрагментам ДНК проводили поиск родственных им последовательностей в GenBank с помощью программы BLAST. Нуклеотидные фрагменты выравнивали, используя программу BioEdit 7.0.5.2. На основе матриц выравниваний конструировали филогенетические деревья методом ближайших соседей с помощью программы Mega 4.0 и сравнивали эти деревья с анализом 238 последовательностей 18S рДНК динофлагеллят из работы (Logares et al. Mol. Phylogenet. Evol. 2007. 45: 887) для проверки того, учтены ли все виды,

близкие к байкальским. На основе выбранных последовательностей строили филогенетические деревья методом максимального правдоподобия (ML) с помощью on-line программы PhymI (устойчивость кластеризации оценивали в 1000 циклах бутстреп анализа) и методом Байеса (BI), используя программу MrBayes 3.1.2. При BI анализе запускали в двух повторностях 6 «горячих» и 1 «холодную» марковские цепи в течение $N \cdot 10^6$ циклов (N – в зависимости от маркера 2 – 7) с отбором каждого сотого дерева. На основе деревьев со стабильными оценками параметров моделей нуклеотидных замен и правдоподобия получали консенсусные деревья и апостериорные вероятности ветвления. Использовали следующие модели: для 18S рДНК – GTR+G+I, для ITS2 – HKY85+G+I, для фрагмента гена *cox1* – F81+G. Эти модели оптимальны для наших матриц данных согласно критерию Akaike (AIC), реализованного в программе Modeltest v3.8. Дополнительно для 18S рДНК при BI анализе применяли COV модель. Также использовали программы Mesquite 2.72 и FigTree v1.2.2. На приведенных в работе рисунках представлены байесовские деревья, укоренённые по середине. При помощи программы Mega 4.0 рассчитывали p -расстояния.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для более полного анализа разнообразия динофлагеллят Байкала, во-первых, исследовали весенний подледный планктон, так как к этому сезону приурочено наибольшее число видов и их максимальная биомасса (Kozhova, Izmet'seva, 1998). *Gymnodinium baicalense* выделяется самой большой численностью, и он был изучен особенно тщательно. Во-вторых, анализировали ДНК динофлагеллят из эндемичных губок, процветающих в Байкале, в том числе из-за их ассоциации с симбионтами. Ими, как мы полагаем, могут быть динофлагелляты. Такой симбиоз известен для морских губок (Granados et al. Mol. Phyl. Evol. 2008. **49**: 554). Кроме симбиотических, надеялись выявить и свободноживущих динофлагеллят, благодаря способности губок быть «натуральными фильтрами» и концентрировать в себе одноклеточных.

Динофлагелляты из весеннего подледного сообщества озера Байкал. Начало цветения и в 2008, и в 2009 гг. отмечали в середине февраля с появлением вида *Gymnodinium baicalense*. Динофлагелляты других видов выявляли в пробах с конца марта и не так массово, как *G. baicalense*. Все они были способны к фотосинтезу, кроме *Gymnodinium coeruleum*: у него отсутствовали соответствующие пигменты. Наибольшее количество динофлагеллят наблюдали в апреле 2008 г.: *G. baicalense* – до 1743.2 тыс кл/л, *Peridinium baicalense* – до 19.0 тыс кл/л, *Peridinium* sp. – до 3.5 тыс кл/л и единичные особи *G. coeruleum*. Для беспанцирных динофлагеллят важной характеристикой является размер клеток. Средние размеры *G. coeruleum* (данные оптической микроскопии) составили 47.5 ± 3.1 мкм \times 27.1 ± 2.3 мкм. Это соответствует размерам вида *Gyrodinium helveticum* (47.2 ± 3.2 мкм \times 26.3 ± 2.5 мкм (Takano et al. Phycol. Res. 2004. **52**: 107)), наиболее похожего на *G. coeruleum* (Антипова. ДАН. 1955. **103**: 325). Размеры клеток *G. baicalense*, по данным оптической микроскопии, составили 48.6 ± 4.8 мкм \times 37.6 ± 7.1 мкм в марте 2008 г., когда вид был в подавляющем большинстве, и 37.3 ± 4.5 мкм \times 29.5 ± 2.6 мкм в апреле 2008 г., когда он доминировал на

фоне увеличения числа других организмов. С помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 1а) в апреле 2009 г. определили его размеры как 38.2 ± 5.0 мкм \times 27.1 ± 3.4 мкм, ширину поперечной борозды – 2.9 ± 0.8 мкм, продольной – 0.6 ± 0.1 мкм.

Используя ДНК из пробы от 10.03.2008 с множеством клеток *G. baicalense* и единичными клетками *G. coeruleum* (данные оптической микроскопии), амплифицировали фрагменты 5.8S-ITS2-28S рДНК, 18S рДНК и гена *cox1*. На основе этих генетических маркеров создали библиотеки клонов, провели частичное определение последовательностей и филогенетический анализ вида *G. baicalense* (например, рис. 1б)

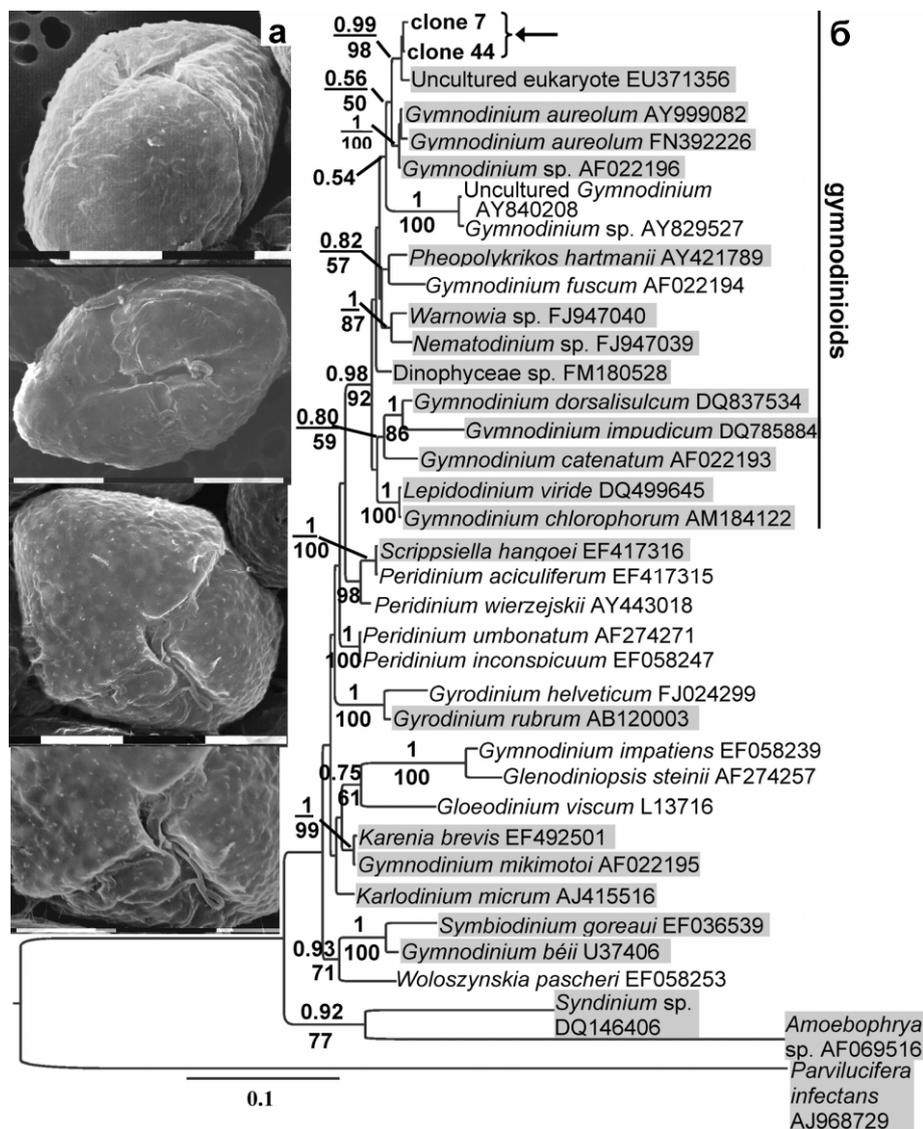


Рис. 1. а) Электронно-микроскопические изображения *Gymnodinium baicalense*, масштаб 10 мкм; б) филогенетический анализ фрагментов 18S рДНК динофлагеллят (1429 позиций). *G. baicalense* выделен стрелкой. На сером фоне представлены морские виды. Значения над линиями – апостериорные вероятности (метод BI), под линиями – значения бутстреп анализа (метод ML) (<50 не показаны, также на последующих рисунках).

Согласно всем трём маркерам, байкальский вид достоверно кластеризуется с морскими представителями рода *Gymnodinium* и с несколькими морскими видами, близкородственными этому роду

Лучше всего разнообразие динофлагеллят изучено по 18S рДНК, поэтому этот маркер дает более полную информацию о родстве *G. baicalense*. Помимо морских гимнодиниумов, в общую кладу с ним вошли пресноводные *Gymnodinium* sp. из озера Тувель и *Gymnodinium fuscum*, но они не являются наиболее близкими к байкальскому виду. Ближайший к *G. baicalense* организм (рис.1б) - эукариот из пробы льда с о. Шпицберген (генетическое расстояние – 0.003). Второй по сходству с *G. baicalense* является последовательность вида *Gymnodinium aureolum* (генетическое расстояние – 0.006).

Для изучения разнообразия динофлагеллят в планктоне амплифицировали фрагменты 18S рДНК из суммарной ДНК пробы от 13.04.2008 с 4 чётко различающимися морфовадами динофлагеллят (данные оптической микроскопии).

Клонировав их, получили 57 клонов. Рестрикционный анализ разделил их на 4 группы. Чтобы соотнести эти группы с известными таксонами, определили первичную структуру 34 фрагментов. Исключив идентичные, оставили 28 фрагментов и на их

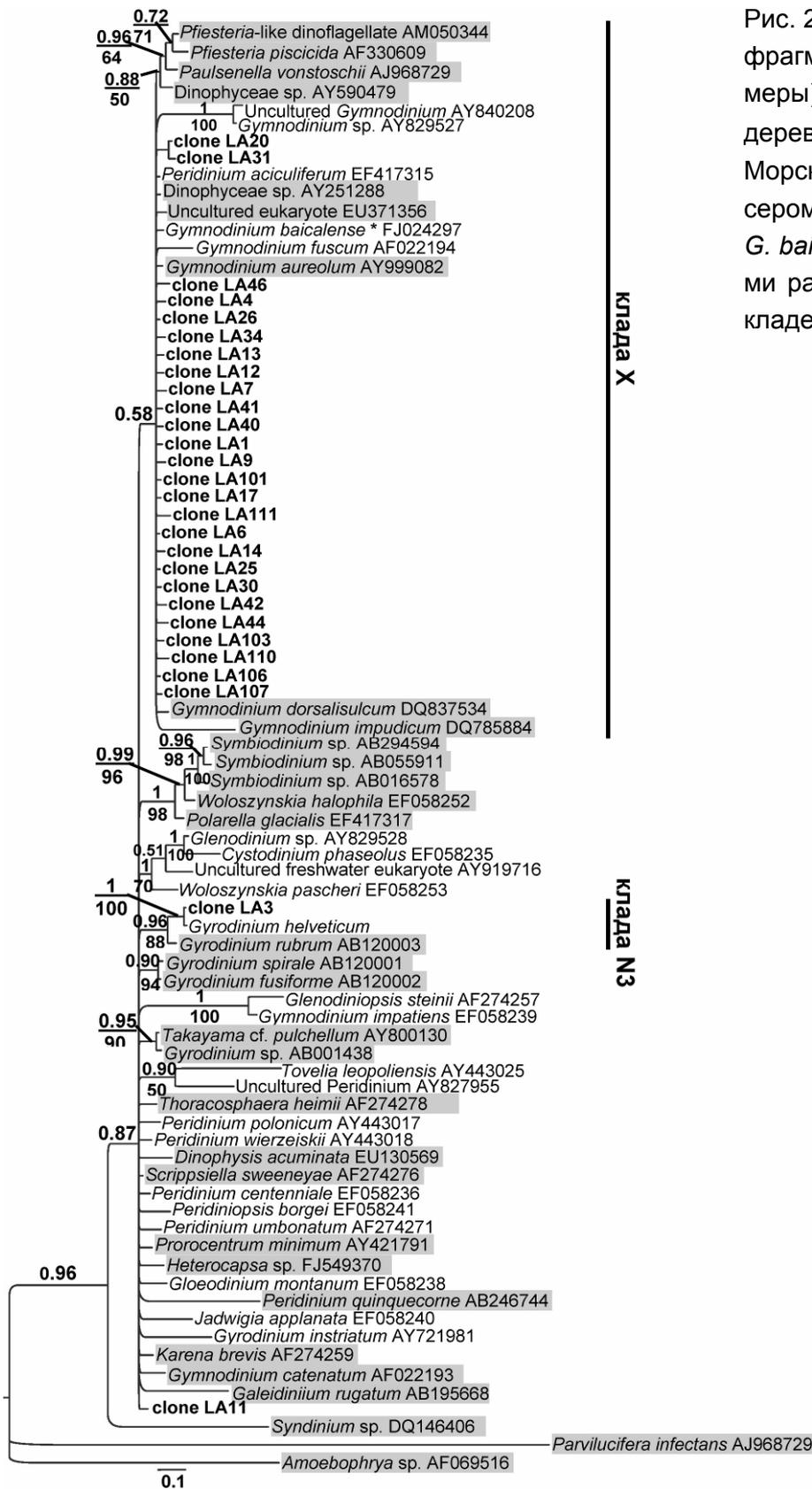


Рис. 2 Филогенетический анализ фрагментов 18S рДНК (L1/R1 праймеры) (677 позиций). Консенсусное дерево по принципу большинства. Морские виды представлены на сером фоне. * – отмечен фрагмент *G. baicalense*, расшифрованный нами ранее. Клада N3 соответствует кладе на рис. 4.

основе провели филогенетический анализ, включив в него также 53 последовательности из GenBank. Полученное филогенетическое дерево (рис. 2) имело низкую степень достоверности в своей основе, что характерно для рДНК деревьев динофлагеллят (Saldarriaga et al. Eur. J. Protistol. 2004. 40: 85). В то же время и среди внутренних клад лишь некоторые были достоверны. Основная часть байкальских последовательностей и в ML, и в BI анализах вошла в кладу X с низкой статистической поддержкой (рис. 2). Кроме них в кладе X оказались последовательности ДНК морских представителей рода *Gymnodinium*, три последовательности пресноводных гимнодиниумов и

отдельной группой – представители сем. Pfiesteriaceae. Два байкальских клона из этой клады идентичны рДНК вида *Peridinium aciculiferum*, три имели единичные замены в сравнении с расшифрованной нами рДНК вида *Gymnodinium baicalense*. Остальные

байкальские клоны клады X отличаются и от *G. baicalense*, и от *P. aciculiferum*, но недостаточно сильно, чтобы образовать отдельные достоверные кластеры. Генетические расстояния между последовательностями ДНК байкальских динофлагеллят из клады X (рис. 2) составляют 0.001 – 0.018. Кроме того, выявлен нуклеотидный фрагмент, идентичный участку 18S рДНК вида *Gyrodinium helveticum* (клада N3, рис. 2). Достоверно близок к нему другой представитель рода *Gyrodinium*: морской *G. rubrum*. Клон LA11 не образовал общей клады с изученными динофлагеллятами.

Динофлагелляты, ассоциированные с байкальскими эндемичными губками.

Анализировали три вида губок: *Baikalospongia intermedia*, *Baikalospongia recta* и *Lubomirskia incrustans*. Используя суммарную ДНК из каждой губки и специфичные для динофлагеллят праймеры, амплифицировали фрагменты 18S рДНК, клонировали их и получили 170 клонов: 60 из *L. incrustans*, 60 из *B. intermedia*, 50 из *B. recta*. По результатам рестрикционного анализа все клоны разделились на 11 групп, различающихся по картине рестрикции и найденных во всех трёх губках (рис. 3). У 70 фрагментов из

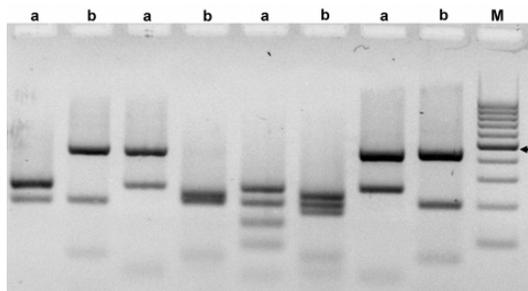
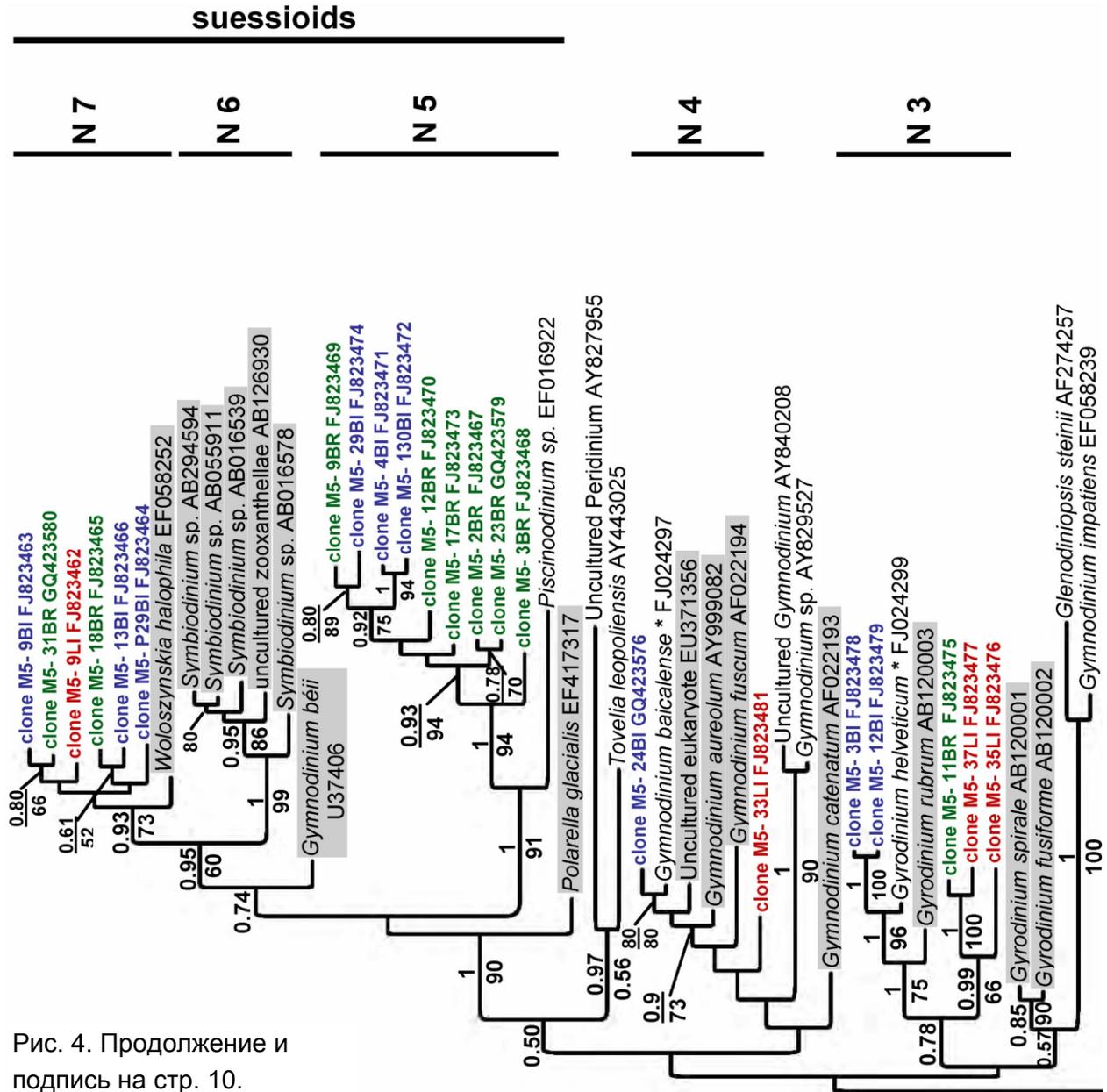


Рис. 3. Пример рестрикционного анализа клонированных фрагментов 18S рДНК из губки *B. recta*. Каждая пара дорожек соответствует одному клону, рестрицированному а) *Alu1* и б) *Dde1*; М – маркер, (Fermentas).

разных групп рестрикции определили первичную структуру. Идентичные последовательности из одной и той же губки не учитывались в анализе, 10 фрагментов не имели существенного сходства с последовательностями из GenBank, их также исключили. В итоге, филогенетический анализ провели на основе 45 выявленных фрагментов ДНК и 54 последовательностей ДНК, взятых из GenBank. ML и BI деревья имели сходную топологию и идентичные внутренние кластеры. Фрагменты динофлагеллят из байкальских губок не сформировали монофилетической группы и кластеризовались с фрагментами ДНК, принадлежащими ряду разных семейств динофлагеллят (рис. 4).

Два варианта последовательностей выявлены нами ранее также в планктоне. Во-первых, это клон М5-24В1, схожий с фрагментами *Gymnodinium baicalense* и *Gymnodinium aureolum*. Клон М5-33Л1 близок к данной группе, но с низкой степенью достоверности (клада N4, рис. 4). Во-вторых, около 15% фрагментов из каждой губки, согласно ПДРФ и нуклеотидной последовательности, образовало общую группу с родом *Gyrodinium* (клада N3, рис. 4). Генетическое расстояние между байкальскими клонами и *G. helveticum* составило 0.008 – 0.027. Кроме того, более половины определенных фрагментов сгруппировано с представителями родов *Pfiesteria*, *Peridinium*, *Paulsenella* и двумя Dinophyceae sp. (клада N2, рис. 4; BI 97, ML 51). Генетическое расстояние между байкальскими клонами в этой кладе доходило до 0.02. Другой вариант фрагмента рДНК динофлагеллят представлен клоном М5-32Л1, достоверно кластеризующимся с пресноводным динофлагеллятом из олиготрофного озера Георга (США) и видами из европейских озер (клада N1, рис. 4). Согласно ПДРФ анализу

фрагменты последнего типа редки в изученных губках. В большинстве, взаимоотношения среди клад N1 – N4 на рисунке 4 не имеют сильной статистической поддержки.



Прочие расшифрованные фрагменты ДНК вместе с морскими видами порядка Suessiales и пресноводным паразитом *Piscinoodinium* sp. объединились в группу “suessioids” с высокой степенью достоверности (BI 1; ML 90%). Она состоит из трёх чётко выраженных клад (рис. 4). Клада N5 включает байкальских представителей и *Piscinoodinium* sp., клада N6 – симбиодиниумов, живущих в симбиозе с разными морскими хозяевами (включая морскую губку *Haliclona koremella*; *Symbiodinium* sp. AB016578), клада N7 – байкальских клонов и холодолюбивую свободноживущую *Woloszynskia halophila*. Симбионт фораминифер *Gymnodinium beii* близок к кладам N6 и N7, но с низкой достоверностью. Свободноживущая *Polarella glacialis* является сестринской по отношению к другим членам группы “suessioids”, как было показано ранее (Shaked, Vargas. MEPS. 2006. **325**: 59). Взаиморасположение клад N 5, 6, и 7 (рис. 4) нестабильно: когда *P. glacialis* включена, клада симбиодиниумов группируется с кладой N7, в противном случае она группируется с кладой N5.

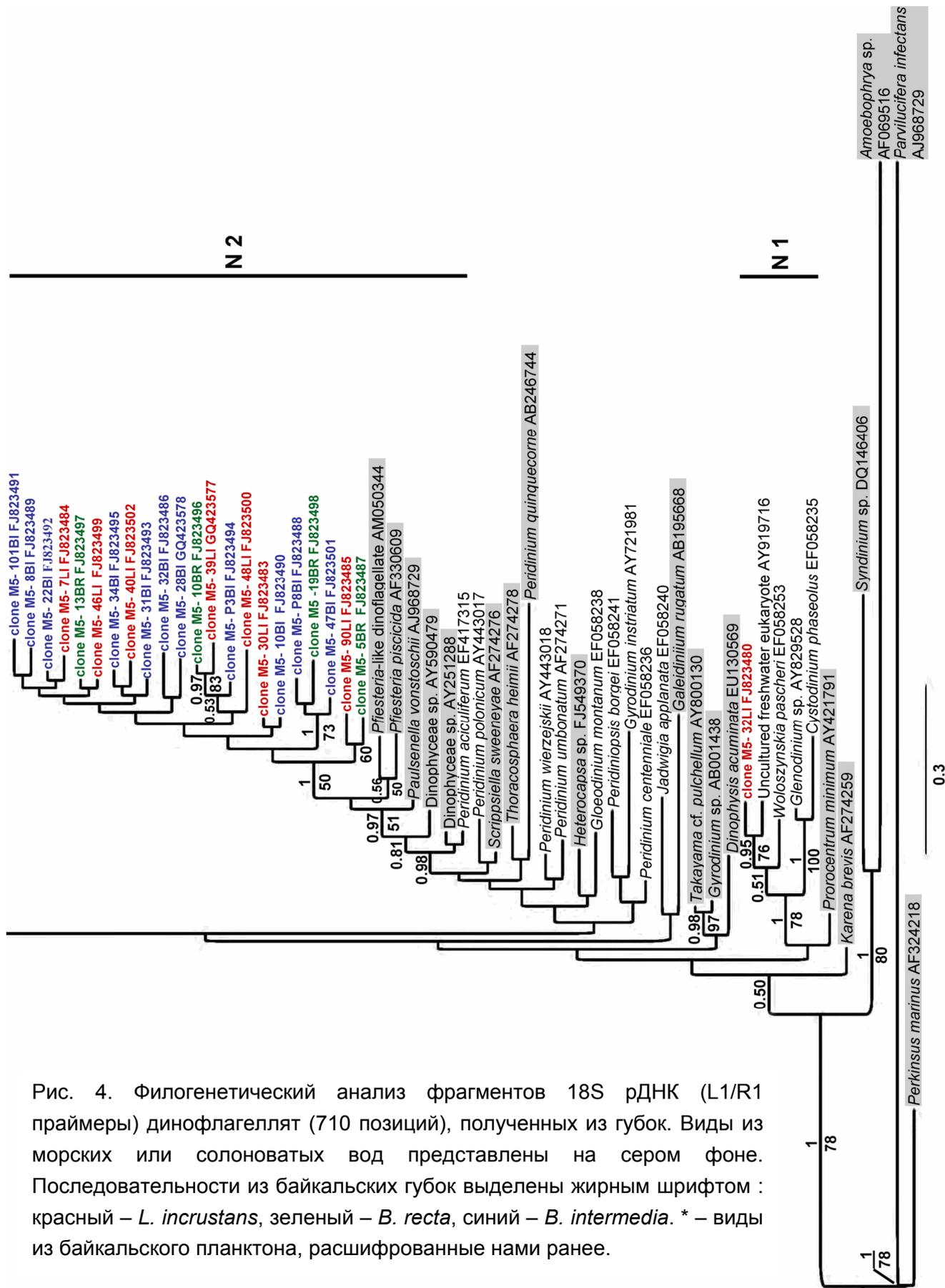


Рис. 4. Филогенетический анализ фрагментов 18S рДНК (L1/R1 праймеры) динофлагеллят (710 позиций), полученных из губок. Виды из морских или солоноватых вод представлены на сером фоне. Последовательности из байкальских губок выделены жирным шрифтом : красный – *L. incrustans*, зеленый – *B. recta*, синий – *B. intermedia*. * – виды из байкальского планктона, расшифрованные нами ранее.

Для подтверждения присутствия членов порядка Suessiales в губках и уточнения их родственных связей, сконструировали специфичные к этому порядку праймеры, ограничивающие участок 5.8S-ITS2-28S рДНК. Этот фрагмент выделили из губок и расшифровали по 15 клонов из каждой библиотеки. Идентичные

последовательности из одной губки не учитывали. Большинство расшифрованных фрагментов ДНК имели единичные замены в сравнении друг с другом, и лишь один клон (M5-6BR) существенно отличался. В итоговый анализ (рис. 5) вошло 15 фрагментов ДНК, а также последовательности из базы данных GenBank: 8 от представителей Suessiales и 5 от свободноживущих динофлагеллят. Сравнение данных ITS2 участков показало различие в их длине: от 258 до 326 нуклеотидов у динофлагеллят порядка Suessiales и от 322 до 374 нуклеотидов у остальных динофлагеллят. Длина ITS2 байкальских динофлагеллят из клады N7 (рис. 5) и двух *Symbiodinium* sp. практически одинакова (292-296 нуклеотидов). Последовательность байкальского динофлагеллята из клады N5 (рис. 5) состояла всего из 258 нуклеотидов. Все обсуждаемые байкальские клоны вошли в порядок Suessiales (BI, 1; ML, 98%) (рис. 5), топология кластеров внутри него соответствовала расположению

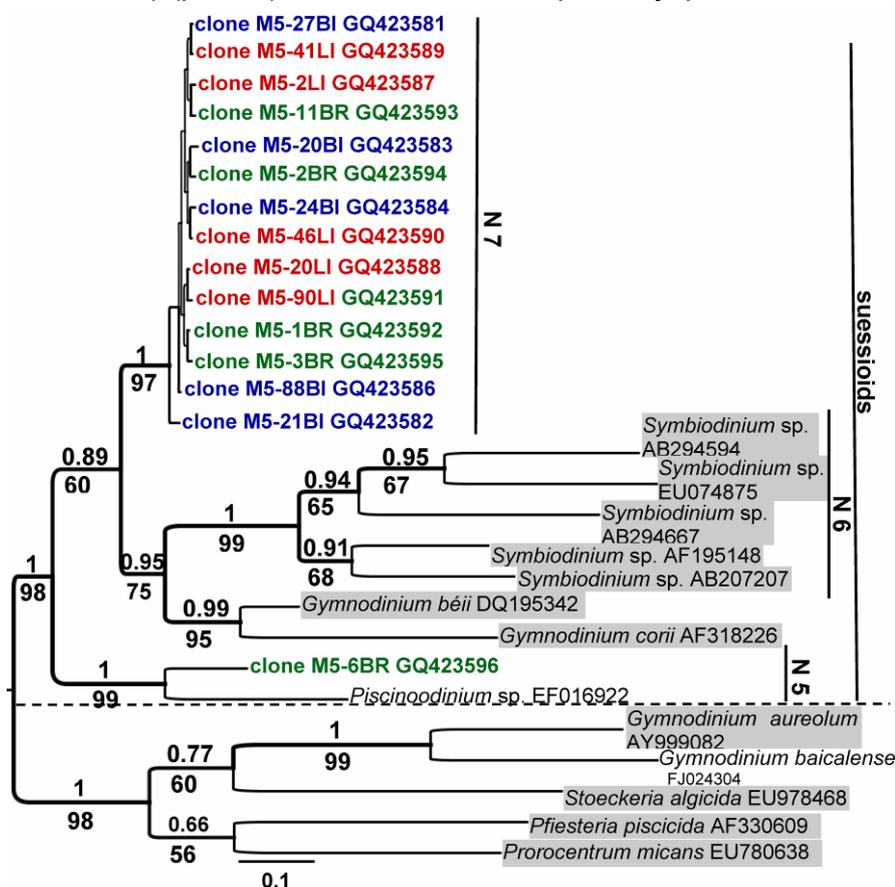


Рис. 5. Филогенетический анализ участка 5.8S–ITS2–28S ДНК динофлагеллят (428 позиций, учитывая пропуски). Морские виды представлены на сером фоне. Последовательности из байкальских губок выделены жирным цветом: красный – *L. incrustans*, зеленый – *B. recta*, синий – *B. intermedia*. Под пунктирной чертой располагаются известные планктонные виды.

соответствующих кластеров при анализе 18S рДНК (рис. 4): клада N5 с клоном M5-6BR из губки *B. recta* и *Piscinodinium* sp., клада N6 с видами рода *Symbiodinium* и родственными им *Gymnodinium*

beii и *Gymnodinium corri*, клада N7 с группой клонов из байкальских губок (рис. 5).

Исследуемые в работе губки собраны в одно и то же время и в одном месте. Они принадлежали двум родам сем. Lubomirskiidae: *Baikalospongia* (два вида) и *Lubomirskia* (один вид). Байкальские динофлагелляты из клады N7 (порядок Suessiales) найдены во всех трёх губках (рис. 4 и 5). В то же время динофлагелляты из клады N5 (рис 4 и 5) этого же порядка не выявлены в *L. incrustans* (согласно ПДРФ анализу и структуре последовательностей ДНК). Другие клонированные последовательности динофлагеллят представлены во всех губках примерно в равной пропорции. Среди них наиболее распространены члены клады N2 (рис. 4). Хотя *Gymnodinium baicalense* – самый массовый вид среди динофлагеллят планктона, сходные с ним последовательности ДНК в губках встречались редко. Это может быть

связано со временем сбора губок (летом, в то время как *G. baicalense* цветет подо льдом весной) или с колебанием численности динофлагеллят.

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени сообщалось о следующих динофлагеллятах в планктоне озера Байкал: *Gymnodinium baicalense*, *Gymnodinium coeruleum*, *Glenodinium* sp., *Peridinium baicalense*, *Peridinium aciculiferum*, *Peridinium* sp. (Kozhova, Izmet'seva, 1998). По мнению (Rengefors, Meyer. Phycologia. 1999. **37**: 284) в Байкале обитает также *Peridinium eurycerps*. В целом, динофлагелляты озера не изучены современными методами, поэтому невозможно судить о степени их разнообразия и уникальности. Чтобы изучить этот вопрос, мы провели описанные выше исследования, что позволило разделить динофлагеллят Байкала на следующие группы.

Байкальские динофлагелляты порядка Suessiales. Ряд расшифрованных последовательностей динофлагеллят из изученных губок группировался вместе с представителями порядка Suessiales (рис. 4, 5). В этот порядок входит небольшое число свободноживущих видов (6 морских, включая *Woloszynskia halophila* и *Biecheleriopsis adriatica*, известный как *Gymnodinium corii*, и 4 пресноводных вида) и большинство описанных динофлагеллят симбионтов (множество видов) морских беспозвоночных, включая губок (Siano et al. Protist. 2010. **161**: 385). Обнаружение в байкальских губках фрагментов ДНК, принадлежащих Suessiales, означает, что байкальские динофлагелляты могут быть вовлечены в симбиоз с этими губками. Динофлагеллят из этого порядка ранее не выявляли в Байкале, также и среди расшифрованных нами планктонных нуклеотидных фрагментов не было найдено принадлежащих этой группе. Губки исследованного сем. Lubomirskiidae не близкородственны морским видам губок (Itskovich et al. J. Mol. Evol. 2008. **67**: 608), в будущем необходимо изучить, как они оказались ассоциированы с динофлагеллятами из Suessiales, и насколько такие динофлагелляты распространены в пресных водах. Следует отметить, что о присутствии Suessiales в пресноводных, а не в морских беспозвоночных ранее не сообщалось. Внутри группы Suessiales часть байкальских фрагментов ДНК кластеризовалась с *Woloszynskia halophila* (клада N7, рис. 4), образуя сестринскую группу по отношению к видам рода *Symbiodinium* (плюс *Gymnodinium béii* и *G. corii* при анализе ITS2, рис. 5). Остальные фрагменты сформировали достоверную кладу (N5, рис. 4 и 5) вместе с пресноводным паразитом рыб *Piscinoodinium* sp., филогенетически близким к морским динофлагеллятам из порядка Suessiales (Levy et al. J. Parasitol. 2007. **93**: 1006). В дальнейшем степень ассоциации динофлагеллят и губок, как и её направленность, следует изучить дополнительными методами.

Анализ участка 5.8S–ITS2–28S рДНК показал меньшую дивергенцию фрагментов клады N7 (рис. 5), чем анализ на основе фрагментов 18S рДНК (рис. 4). Возможно, это связано с тем, что данный участок менее различен у этих динофлагеллят. В то же время то, что последовательности из клады N7 (рис. 5) практически идентичны, может быть связано с артефактами амплификации, как это описано для рода *Symbiodinium* (Thornhill et al. Mol. Ecol. 2007. **16**: 5326).

Байкальские динофлагелляты, филогенетически близкие сем. Pfiesteriaceae.

Считалось, что Pfiesteriaceae обитают в морях, могут заходить в дельту рек (Miller, Belas. Res. Microbiol. 2003. **154**: 85). Недавно было показано, что пресноводный *Tyrannodinium berolinense* относится к этому семейству (Calado et al. J. Phycol. 2009. **45**: 1195), а пресноводный *Peridinium aciculiferum* филогенетически близок к нему (Logares et al. Environ. Microbiol. 2008. **10**: 1231). Выявление байкальских организмов, близких к членам данного семейства (рис. 4 клада N2; рис. 2, клада X), ещё более расширяет географию распространения динофлагеллят родственных роду *Pfiesteria*.

Во-первых, как и в европейских озерах, в Байкале, по всей вероятности, обитает холодолюбивый *P. aciculiferum*: мы выявили в планктоне фрагменты рДНК этого вида и, кроме того, *P. aciculiferum* упомянут в списках водорослей Байкала, хотя его морфологические исследования не велись. Согласно (Logares et al., 2008) этот вид недавно перешел к пресноводному образу жизни, что отличает его от большинства пресноводных динофлагеллят. Во-вторых, фрагменты ДНК, близкие к типовому для семейства роду *Pfiesteria*, хотя и с невысокой степенью достоверности, обнаружены в байкальских губках. При этом клада N2 (рис. 4) включает в себя ряд генетических вариантов таких последовательностей, что свидетельствует о довольно длительной эволюции данных динофлагеллят в Байкале. Возможно, мы имеем дело с ранее невыявленными планктонными организмами, накопленными за счёт фильтрации в губке, однако в изученной пробе планктона они отсутствовали. Учитывая, что многие виды сем. Pfiesteriaceae гетеротрофны, а *Paulsenella vonstoschii*, расположенная на рис. 4 в одной кладе (N2) с клонами из губки, ведет паразитический образ жизни (Kühn, Medlin. Protist. 2005. **156**: 393), оправдано предположение о существовании гетеротрофной, возможно, связанной с губками группы динофлагеллят в Байкале.

Ряд представителей сем. Pfiesteriaceae токсичны для рыб и даже людей (Burkholder, Glasgow. Limnol. Oceanogr. 1997. **42**: 1052), а значит и обнаруживаемые пресноводные члены семейства могут оказаться способными производить токсичные вещества. Уже показано, что *P. aciculiferum* – один из трёх пресноводных динофлагеллят, оказывающих токсичное воздействие (Rengefors, Legrand. Limnol. Oceanogr. 2001. **46**: 1990). Токсичность некоторых морских динофлагеллят зависит от места обитания (Taylor et al. Biodivers. Conserv. 2008 **17**:407). В свете этого, обнаружение *P. aciculiferum* в таком обособленном водоеме, как Байкал, полезно для изучения данного феномена в пресных водах.

Байкальские динофлагелляты вида *Gymnodinium baicalense*. Этот вид отнесен к роду *Gymnodinium* согласно данным оптической микроскопии (Антипова, 1955). Мы показали, что это фотосинтетик, массово цветущий подо льдом, мигрирующий к свету, и провели промеры его клеток, аналогичные проведенным Антиповой. Наши данные по апрельским популяциям 2008 и 2009 гг. сопоставимы с её данными по *G. baicalense* var. *minor*, хотя по очертанию это типичные *G. baicalense*. Упомянутые Антиповой особи длиной в 90 мкм нами не обнаружены. Сегодня считается, что Gymnodiniales – полифилетический порядок, и многие организмы отнесены к нему ошибочно. В недавней работе авторы (Daugbjerg et al. Phycologia. 2000 **39**: 302) существенно ограничили

род *Gymnodinium*, отнеся к нему лишь пресноводных *G. fuscum* (типовой вид для рода) и *G. palustre*, морских *G. aureolum*, *G. catenatum*, *G. impudicum*, *G. nolleri*, *G. cf. placidum* и *G. chlorophorum* (переименован в *Lepidodinium chlorophorum* из-за особенностей морфологии (Hansen et al. Phycol. Res. 2007. **55**: 25)). Как следует из анализов трех генных маркеров, *G. baicalense* кластеризуется именно с этими видами, то есть филогенетически относится к истинным гимнодиниумам.

Самым близким к *G. baicalense* является неизвестный динофлагеллят, живущий в арктическом льду в районе Шпицбергена. Оба этих вида также сближает их приуроченность к ледовому покрову. Второй вид, близкий к байкальскому – это морской эвригалитный *G. aureolum*, вызывающий "цветение" воды. Пресноводный *G. fuscum* оказался в меньшей степени схож с байкальским видом (рис. 1). Мы полагаем, что *G. baicalense* относительно недавно проник в озеро из океана, возможно, являясь реликтом, сохранившимся на Байкале после того, как ушел ледник, с конца плейстоцена покрывавший континент. Рисунок 2 показывает, что в планктоне присутствуют различные последовательности, близкие к *G. baicalense*, поэтому в будущем понадобится уточнение, обитает ли в Байкале один вид рода *Gymnodinium* или несколько близких. Крайне интересно также сравнить арктических и байкальских гимнодиниумов: вероятно, что байкальский вид приобрел некие локальные адаптации.

Байкальские динофлагелляты рода *Gyrodinium*. При анализе библиотек клонов на основе ДНК из планктона выявили фрагмент 18S рДНК (рис. 2, клада N3), идентичный ДНК гетеротрофного вида *Gyrodinium helveticum* из японского пресноводного озера Шикотсу. Из байкальских губок также выделили фрагменты, практически идентичные этому виду (клоны M5-3BI и M5-14BR из клады N3, рис. 4). Учитывая, что при микроскопическом исследовании планктонных проб найден гетеротрофный динофлагеллят, чьи очертания и размеры соответствовали виду *G. helveticum*, мы соотнесли расшифрованные последовательности именно с ним. Таких динофлагеллят Антипова описала как *Gymnodinium coeruleum*, упомянув об их схожести с *G. helveticum*. По её мнению, различием между ними является более короткая продольная борозда, остроконическая без выростов верхушка и голубая окраска *G. coeruleum* (Антипова, 1955). Однако, накопленные на сегодня наблюдения свидетельствуют, что окраска не может являться важным отличием: часть байкальских особей, также как и ряд представителей японского варианта *G. helveticum*, бесцветны. Описаны варианты клеток *G. helveticum*, включающие характерные для байкальских особей «шапочки» (Takano, Horiguchi, 2004). Всё это, в совокупности со 100% генетическим сходством по рассмотренному нами маркеру, позволяет отнести представителя гетеротрофных байкальских динофлагеллят к роду *Gyrodinium*. Вероятнее всего, мы имеем дело с байкальским вариантом вида *G. helveticum*, космополитного для пресных вод умеренного климата и активного в течение всего теплого сезона. Размеры клеток промеренного нами *G. coeruleum* и японского *G. helveticum* совпадают.

Байкальские динофлагелляты без определенной аффилиации. Часть последовательностей и из планктона, и из тканей губок кластеризовалась с низкой достоверностью с последовательностями известных динофлагеллят. Это относится к несколь-

ким последовательностям из губок, группирующимся с кладой гиродиниумов (N3, рис. 4,) и гимнодиниумов (N4, рис. 4), но отличных от байкальских планктонных *Gyrodinium helveticum* и *Gymnodinium baicalense*. Такие нуклеотидные фрагменты могут принадлежать еще неизученным байкальским динофлагеллятам, в том числе бентосным видам. Пресноводные бентосные динофлагелляты практически не известны: описан лишь один вид (Taylor et al. 2008). При анализе пробы планктона кроме последовательностей, идентичных известным планктонным динофлагеллятам (*G. baicalense*, *Peridinium aciculiferum*), мы выявили спектр нуклеотидных фрагментов, близких к первым, но имеющих некоторые замены (клада X, рис. 2). Они могут принадлежать двум выше названным видам: отражать либо их внутривидовые вариации, либо полиморфизм рДНК у отдельных особей этих двух видов. Но наиболее вероятным можно считать то, что эти фрагменты принадлежат видам, которые нельзя различить с помощью выбранного маркера (18S рДНК). Это подтверждается тем, что с помощью оптической микроскопии в данной пробе был замечен *Peridinium baicalense*, то есть часть найденных фрагментов должна принадлежать этому виду.

Замечания по эволюции байкальских динофлагеллят. Проведенный анализ выявил присутствие в Байкале нескольких филогенетически далеких друг от друга групп динофлагеллят. Некоторые из них более близки к известным морским видам (см. N2, N3, N4, N7, рис. 4). Также в озере обитают *Gyrodinium helveticum* и *Peridinium aciculiferum* (рис. 2), относимые к динофлагеллятам, поздно освоившим пресные воды (Logares et al., 2007). Это указывает на сравнительно недавнюю колонизацию Байкала данными группами. Другие выявленные последовательности не имеют выраженного сходства с известными линиями (например, часть клонов из клады N3 и клон M5-33L1 из клады N4, рис. 4). Лишь один генетический вариант динофлагеллят Байкала, несомненно, группировался с другими пресноводными видами (клада N1, рис. 4). Обнаружение в Байкале линий, родственных морским динофлагеллятам, не было ожидаемым, так как ранее анализируемые морские и пресноводные виды в целом не были достаточно близкими (Logares et al., 2007). Выявлено несколько гетерогенных кластеров байкальских клонов (например, N2 и N5, рис. 4), что позволяет предположить активно продолжающуюся эволюцию таких динофлагеллят в озере. Таким образом, по-видимому, виды динофлагеллят имеют различное время появления и происхождение в Байкале. Возможно, некоторые из них эндемичны для озера, в частности динофлагелляты из губок. Схожие заключения сделаны при изучении байкальских многоклеточных (Sherbakov. Trends Ecol. Evol. 1999. 14: 92).

Исследованные губки содержали примерно одинаковый набор динофлагеллят, включая потенциально симбиотических. Это согласуется с данными об отсутствии высокой специфичности динофлагеллят в морских губках (см. Granados et al., 2008). Единственным исключением стали последовательности ДНК, близкие паразиту *Piscinoodinium* sp. и отсутствующие в *Lubomirskia incrustans*. Наши данные указывают на одновременное присутствие двух групп из порядка Suessiales в одной губке. Ситуации, когда один хозяин содержит разные виды симбиотических динофлагеллят, известны в том числе и для морских губок (Granados et al., 2008).

ВЫВОДЫ

- 1) На основе анализа специфичных последовательностей ДНК из метагеномов установлено, что динофлагелляты представлены в Байкале бóльшим количеством видов, чем считалось ранее. Помимо известных для озера двух родов *Gymnodinium* и *Peridinium*, выявлены представители других родов и семейств: *Gyrodinium helveticum*; группа, родственная семейству Pfiesteriaceae; две группы порядка Suessiales; динофлагеллят, кластеризующийся с известными пресноводными видами (*Woloszynskia pascheri*, *Cystodinium phaseolus*) и ряд последовательностей динофлагеллят без определенной родовой принадлежности.
- 2) На основании анализа трёх молекулярных маркерах (фрагменты генов 18S рНК и *cox1*, участок 5.8S-ITS2-28S рДНК) установлено, что вид *Gymnodinium baicalense*, ведущий подледный образ жизни, занимает филогенетическое положение среди истинных представителей рода *Gymnodinium*. Наибольшее родство он проявляет к динофлагелляту из арктических льдов Шпицбергена (99 VI и 98 ML), что, вероятно, указывает на его морское происхождение. Возможно, *G. baicalense* попал в Байкал во время последнего ледникового периода из Северного Ледовитого океана.
- 3) При генетическом исследовании пробы весеннего планктона Байкала, содержащей не менее 4 различных морфовидов динофлагеллят, выявлен спектр нуклеотидных фрагментов, слабо отличающийся от ДНК видов *Gymnodinium baicalense* и *Peridinium aciculiferum* и кластеризующийся с низкой достоверностью со свободноживущими, преимущественно морскими динофлагеллятами.
- 4) В планктоне Байкала выявлен фрагмент 18S рДНК космополитного вида *Gyrodinium helveticum*. Высказано предположение, что этот вид в Байкале ранее был описан как эндемик *Gymnodinium coeruleum*, для которого в ходе работы определили некоторые фенотипические признаки.
- 5) В пресноводных губках сем. *Lubomirskiidae* обнаружены последовательности ДНК динофлагеллят, неизвестных для байкальского планктона. Это две группы из порядка Suessiales; гетерогенная группа, близкая сем. Pfiesteriaceae; а также последовательности, кластеризующиеся с низкой достоверностью с родом *Gyrodinium*, и последовательность динофлагеллята, родственного типичным пресноводным видам (*Woloszynskia pascheri*, *Cystodinium phaseolus*).
- 6) Две группы динофлагеллят из байкальских губок могут рассматриваться как потенциальные симбионты данных животных, так как филогенетически они относятся к порядку Suessiales, содержащему большинство симбиотических динофлагеллят беспозвоночных, в том числе морских губок.
- 7) Во всех трех исследованных губках (*Baikalospongia intermedia*, *Baikalospongia recta* и *Lubomirskia incrustans*) выявлено сходное разнообразие динофлагеллят. Возможным исключением является одна из групп порядка Suessiales, близкая к пресноводному паразиту *Piscinoodinium* sp.: она не обнаружена в *L. incrustans*.
- 8) Современные динофлагелляты Байкала относятся, по меньшей мере, к двум эволюционным и историческим линиям. Большинство групп филогенетически ближе к морским, а не к известным на данный момент пресноводным видам, что свидетельствует об их относительно недавнем появлении в Байкале. По-видимому, лишь некоторые виды представляют динофлагеллят, давно перешедших к пресноводному образу жизни.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

(* - публикации в изданиях, рекомендуемых ВАК)

- 1) ***Annenkova N.V.**, Lavrov D.V., Belikov S.I. Dinoflagellates associated with freshwater sponges from the ancient Lake Baikal // Protist. 2010. Published online on 3 September 2010. doi:10.1016/j.protis.2010.07.002.
- 2) ***Анненкова Н.В.**, Беликов С.И. Обнаружение в озере Байкал динофлагеллят, филогенетически близких к семейству Pfiesteriaceae // Вода: химия и экология. 2010. № 11. С. 8 – 17.
- 3) ***Анненкова Н.В.**, Белых О.И., Деникина Н.Н., Беликов С.И. Идентификация представителей динофлагеллят озера Байкал на основе молекулярно-генетических данных // Доклады Академии Наук. 2009. Т. 426. № 4. С. 559 – 562.
- 4) **Annenkova N.V.**, Belikov S.I. Freshwater dinoflagellates from Lake Baikal: free-living and sponge-associated diversity // Joint meeting of the I International Society of Protistologists and the British Society for Protist Biology: abstracts. Canterbury, UK: University of Kent, 2010. P. 17-18.
- 5) **Annenkova N.V.**, Belykh O.I., Belikov S.I. Dinoflagellate genetic diversity during spring ice-covered period in Lake Baikal // Пятая Верещагинская Байкальская конф.: тез. докл. Иркутск: Аспринт, 2010. С. 60-62.
- 6) **Анненкова Н.В.**, Беликов С.И., Белых О.И. Молекулярно-генетический и микроскопический анализ байкальского динофлагеллята *Gymnodinium baicalense*, вегетирующего в подледный период // Проблемы экологии. Чтения памяти профессора Кожова М.М.: тез. докл. межд. науч. конф. и межд. школы для молод. ученых. Иркутск: Иркутский гос. ун-т, 2010. С.195.
- 7) **Анненкова Н.В.**, Беликов С.И., Белых О.И. Обнаружение динофлагеллят рода *Gyrodinium* в фитопланктоне и губках озера Байкал путём анализа нуклеотидных последовательностей // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге: тез. докл. II всерос. конф. Сыктывкар: Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 2009. С. 219-222.
- 8) **Анненкова Н.В.**, Беликов С.И. Динофлагелляты в глубоководной байкальской губке // X Съезд Гидробиологического общества при РАН: тез. докл. Владивосток: Дальнаука, 2009. С. 495.
- 9) **Annenkova N.V.**, Danilovtseva E.N., Belikov S.I., Annenkov V.V. Nanorelief coatings with increased surface area of functional groups for DNA immobilization // Nanotechnology and Applications: proceedings of the IASTED intern. confer. Crete, Greece: ACTA Press. 2008. P. 41-46.
- 10) **Анненкова Н.В.**, Деникина Н.Н., Беликов С.И. Исследование симбиотических динофлагеллят байкальских губок // IV съезд Росс. общества биохимиков и молекулярных биологов: тез. докл. Новосибирск: Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 2008. С. 262.
- 11) Беликов С.И., **Анненкова Н.В.** Симбиотические динофлагелляты некоторых пресноводных байкальских губок. Биоразнообразие и роль животных в экосистемах // IV межд. науч. конф.: тез. докл. Днепрпетровск: ДНУ, 2007. С. 533.