

На правах рукописи



ПЕТУНИНА ЖАННА ВЛАДИМИРОВНА

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
МИКРОСПОРИДИЙ И ИХ ХОЗЯИНА – БАЙКАЛЬСКОЙ АМФИПОДЫ
GMELINOIDES FASCIATUS

03.02.08 – экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2015

Работа выполнена в лаборатории геносистематики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Лимнологического института» Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН), г. Иркутск.

Научный руководитель: доктор биологических наук, заведующий лабораторией геносистематики ЛИН СО РАН,
Щербаков Дмитрий Юрьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, заведующий лабораторией ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» СО РАН,
Константинов Юрий Михайлович

кандидат биологических наук, сотрудник ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»,
Адельшин Ренат Викторович

Ведущее учреждение: Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)

Защита состоится «24» декабря 2015 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, ауд. 219.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, б. Гагарина, 24 и на сайте: <http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=52>.

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет ИГУ. Тел./факс: (3952) 241855; e-mail: dissovet07@gmail.com.

Автореферат разослан «__» октября 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



А.А. Приставка

Общая характеристика работы

Актуальность. Исследование экологических обстоятельств видообразования абсолютно необходимо для понимания движущих сил эволюции. Роль внешних факторов в эволюции организмов выступает в высшей степени ясно. Для каждого конкретного организма изменялось не только физическое его окружение, изменялся комплекс организмов (биоценоз), с которым он связан как непосредственной пищевой связью (пищевой материал, с одной стороны, и хищники и паразиты с другой), так и различными формами конкуренции и другими косвенными зависимостями. Это изменение биотических факторов среды являлось решающим для существования тех или иных форм жизни, оно непосредственно определяло преобразование организмов и, в частности, влияло на темп их эволюции» (Шмальгаузен, 1968).

Одним из самых богатых возможностями объектов такого рода исследований является озеро Байкал – уникальный водоем нашей планеты по многим характеристикам: древний возраст, большие глубины, низкие температуры, огромные объемы пресной воды, толщина донных осадков, уровень эндемизма и высокое разнообразие флоры и фауны (Кожов, 1947, 1962, 1970; Тимошкин и др., 1995; Тимошкин, 2001; Brooks, 1950 a, b).

Амфиподы – один из наиболее интересных элементов байкальской фауны, в виду того, что они относятся к группам с наиболее глубоко выраженным эндемизмом из байкальских обитателей (Кожов, 1947, 1962, 1970; Тимошкин и др., 1995; Тимошкин, 2001; Brooks, 1950 a, b; Ogarkov et al., 2000), число их насчитывает более 347 видов из 71 рода (Тахтеев, 2000; Камалтынов, 2001). Объяснение механизма возникновения и поддержания такого большого количества видов является одной из основных задач исследования озера.

Особый интерес вызывает разнообразие паразитов, инфицирующих амфипод (Пронин, Пронина, 1986; Ринчино, 1991; Левашкевич, 2007). Паразитофауна беспозвоночных Байкала изучена слабее, чем фауна хозяев. Паразиты составляют существенную долю в видовом разнообразии практически любой экосистемы. Более того, они могут принимать участие в видообразовательных процессах у хозяев (Buckling, Rainey, 2002; Brockhurst et al., 2004; Buckling, Hodgson, 2007). Обычно число видов паразитов равно, либо сопоставимо с числом видов хозяев, населяющих данную экосистему (Hudson et al., 2006; Emelianov, 2007). Известное к настоящему времени разнообразие паразитов в Байкале является в этом смысле исключением, поскольку в Байкале существует выраженный дефицит таксономического разнообразия паразитов, и еще больший дефицит разнообразия видоспецифических паразитов (Пронин, 2001 а, б, в; Пронин и др., 2004; Русинек, 2007). Недавно было показано, что микроспоридии, известные в Байкале с шестидесятых годов (Lira, 1967, 1968), представлены у байкальских амфипод исключительно большим количеством видов (Qiu et al., 2006), которое, потенциально, может заполнить дефицит разнообразия

паразитов. Однако остается неясным вопрос о видовой специфичности микроспоридий, и связанный с ним вопрос о возможном участии этих паразитов в эволюционных процессах у хозяев.

В качестве объектов исследования выбрали представителя фауны амфипод Байкала – вид *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) (Бекман, Базикалова, 1951; Бекман, 1962; Мельник, Михайлов, 2001; Матафонов, 2003) и внутриклеточных паразитов, принадлежащих к микроспоридиям (*Microsporidia* (Balbiani, 1882)). Характер качественного и количественного распределения их между геномами хозяина может отражать эволюционные события и/или механизмы, которые привели к существующей популяционной структуре вида-хозяина. Для байкальских амфипод они могут служить «катализаторами видообразования».

Настоящая работа посвящена изучению внутривидовой генетической структуры амфиподы *Gmelinoides fasciatus* и возможному влиянию микроспоридий на эволюцию этого вида.

Цели и задачи исследования. Цель настоящего исследования – выявление взаимосвязи между разнообразием видов микроспоридий и внутривидовым разнообразием хозяина, *G. fasciatus*, в Байкале. Согласно поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определить пространственно-генетическую неоднородность внутри вида *Gmelinoides fasciatus* в Байкале по фрагментам митохондриальной ДНК (мт ДНК).
2. Установить видовое разнообразие микроспоридий, паразитирующих на различных популяциях *G. fasciatus*, по фрагменту гена малой субъединицы рибосомальной ДНК (рДНК).
3. Определить степень зараженности различных популяций.
4. Оценить возможную роль микроспоридий во внутривидовой изоляции *G. fasciatus*.

Научная новизна. Впервые подробно исследована пространственно-генетическая неоднородность байкальского вида *G. fasciatus* с помощью методов молекулярного анализа. Установлено подразделение вида как минимум на четыре популяции: юго-западную, северную, центральную, юго-восточную. Выявлено низкое генетическое разнообразие юго-западной популяции *G. fasciatus* по исследованному митохондриальному локусу CO1 (первая субъединица цитохромоксидазы с). Предложена гипотеза «бутылочного горлышка» для юго-западной популяции. Установлено, что Ангара является частично изолирующим барьером для субпопуляций юго-западной популяции *G. fasciatus*. Установлена скорость накопления замен для фрагмента митохондриального гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы *G. fasciatus*. Впервые реконструирована демографическая история исследованных популяций. Выявлено большое разнообразие видов микроспоридий в пределах одного исследуемого байкальского вида амфипод, *G. fasciatus*. Установлен видовой состав, частота встречаемости микроспоридий во всех четырех популяциях хозяина, а так же присутствие коинфицирования в юго-западной популяции *G. fasciatus*. Среди паразитов

Microsporidia встречаются не только виды-палеаркты, но и космополитные виды, поскольку паразиты распространяются очень легко. В данном исследовании у *G. fasciatus* обнаружены популяционно специфические паразиты наряду с *Dictyocoela duebenum*, который является широко распространенным. Подробное исследование амфиподы *G. fasciatus* показало относительно высокое видовое разнообразие паразитирующих на ней микроспоридий. Число видов паразита превышает таковое хозяина.

Практическое значение. Результаты исследования могут быть использованы для моделирования макро- и микроэволюционных процессов формирования репродуктивной изоляции и видового разнообразия. Полученные данные могут помочь в развитии общей теории видообразования амфипод озера Байкал. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена CO1 мтДНК депонированы в GeneBank с номерами доступа: FJ715824 – FJ715919. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена малой субъединицы рДНК микроспоридий депонированы в GenBank с номерами доступа: FJ820187 – FJ820237. Материалы диссертационной работы могут быть привлечены для установления естественных резервуаров микроспоридий и циркуляции их в Байкале. Результаты проведенных исследований используются в курсе лекций по генетике на биолого-почвенном факультете Иркутского государственного университета.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Байкальский вид *Gmelinoides fasciatus* образует четыре непрерывные популяции по берегам Байкала. Границы между популяциями не всегда соответствуют географической подразделенности озера.
2. Юго-восточная популяция *G. fasciatus* является предковой для трех других популяций этого вида амфипод.
3. Демографическая история юго-западной популяции резко отличается от истории остальных байкальских популяций. Предложена гипотеза «бутылочного горлышка».
4. *G. fasciatus* заражен шестью видами микроспоридий. Один из них, *Dictyocoela duebenum*, обнаружен во всех популяциях.
5. Юго-западная популяция отличается присутствием всех видов паразита, характерных для *G. fasciatus*, а также наличием двойного заражения, несмотря на относительно небольшую частоту встречаемости микроспоридий в этой популяции (32,18%).
6. Качественное и количественное распределение паразитов в популяциях *G. fasciatus* указывает на весьма вероятную причастность микроспоридий к формированию и/или поддержанию межпопуляционных барьеров у *G. fasciatus*.

Декларация личного участия автора. Основная часть работы выполнялась автором самостоятельно: идентификация амфипод *Gmelinoides fasciatus* частично, выделение ДНК, амплификация и очистка гена CO1 мт ДНК, статистическая обработка молекулярных данных, построение деревьев, реконструкция демографической истории популяций *Gmelinoides fasciatus*.

Определение скорости накопления замен для *Gmelinoides fasciatus* и анализ результатов были выполнены совместно с д.б.н. Щербаковым Д.Ю. Суммарное личное участие автора в работе составляет более 80 процентов.

Апробация работы и публикации. Результаты работы представлены на 12-й международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2008), на I и II Всероссийской научно-практической конференции «Развитие физико-химической биологии на современном этапе» (Иркутск, 2003, 2008), на 5-ой и 6-ой международной конференции «Speciation in Ancient Lakes, SIAL 5, SIAL, 6» (Охрид, 2009, Богор, 2012), на III международном симпозиуме «Invasion of alien species in Holarctic» (Борок, 2010), на международной конференции MolPhy-3 (Москва, 2012).

По результатам выполненной работы опубликовано 13 печатных работ, из них 2 в отечественном и 1 в международном рецензируемом журнале.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы (416 источников). Работа изложена на 156 страницах, содержит 11 таблиц и 19 рисунков.

Содержание работы

Глава 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Первая часть главы посвящена амфиподам озера Байкал, характеристике исследуемого объекта, амфиподы *Gmelinoides fasciatus*. Рассматривается эволюция амфипод в озере Байкал. Далее приводятся теоретические данные о популяционных процессах и механизмах видообразования, литературные данные о таковых для древних озер и для Байкала в частности. Во второй части литературного обзора рассматриваются механизмы аллопатрического, симпатрического и парапатрического видообразования. Вторую часть завершает описание теоретических подходов и моделей, необходимых для воссоздания демографических процессов. Далее в качестве одного из факторов симпатрического или парапатрического видообразования рассматриваются паразиты, их коэволюция с хозяином, соотношения разнообразия паразитов и хозяев. Четвертая часть главы посвящена микроспоридиям, паразитирующим на исследуемом виде байкальских амфипод *Gmelinoides fasciatus*, дается их описание, и приводятся основные методы диагностики.

Глава 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Во второй главе подробно описываются использованные методы. Глава начинается описанием методики сбора материала. Далее описаны получение нуклеотидных последовательностей и их анализ.

Сбор материала, экстракция ДНК, амплификация и секвенирование. Образцы амфипод были собраны с 38 станций, максимально равномерно расположенных в литоральной зоне по всему

периметру Байкала во время экспедиций 2001 – 2009 гг. Образцы внебайкальских представителей амфипод *G. fasciatus* собраны также с 5 станций, расположенных в литоральной зоне озера Арахлей, Финского залива в районе пос. Усть-Луга и Ольгино (любезно предоставлены Малявиным С.А., Санкт-Петербург, Зоологический Институт) и на реке Ангаре в районе Иркутской и Усть-Илимской ГЭС во время экспедиций 2008 – 2009 гг.

Сбор амфипод был проведен сачком с берега и с помощью драги на глубине 0 - 16,0 метров. После предварительной сортировки амфипод фиксировали в 96-%, затем в 70-% этаноле и хранили при 4°C до экстракции ДНК. Экстракция ДНК, амплификация и очистка ПЦР-продукта была выполнена по стандартным протоколам. Секвенирование проводилось на базе Лимнологического Института СО РАН с использованием Quick start kit (Beckman Coulter Inc.) на секвенаторе 373A (Applied Biosystems) и CEQ 8800 (Beckman Coulter Inc.), в Межинститутском Центре Секвенирования ДНК (г. Новосибирск) и на базе Биологического Института г. Лидс, Великобритания. Нуклеотидные последовательности были выровнены с помощью программы CLUSTALW версии 1.4 (Thompson et al., 1994) и проверены на наличие стоп-кодонов.

Оценка генетического разнообразия, филогеографический анализ и реконструкция демографических историй. Для анализа филогеографической (или геногеографической по Серебровскому (1928)) структуры видов использовалась программа TCS, версия 1.2.1 (Clement, M., D. Posada and K. A. Crandall, 2000). «Критерий экономности»/ максимальной экономии (Maximum Parsimony, MP) (Templeton et al., 1992) использовался для оценки максимального числа мутаций, которые разделяют гаплотипы внутри одной и той же сети. Анализ популяционной структуры, генетической изменчивости образцов, расчет индексов F-статистики, AMOVA и популяционных параметров производили с помощью программы ARLEQUIN v3.5.1.3. (Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider, 2005). Также использовали программу DnaSP v5 (Librado P. and Rozas J., 2009), чтобы вычислить частоты попарных различий между гаплотипами (mismatch distribution) и получить распределения попарных генетических расстояний для оценки гипотезы недавнего роста популяции. Для реконструкции демографической истории популяций методами Байсовского скайплота (Drummond et al., 2011) использовался пакет программ BEAST 1.7.4. (Drummond AJ & Rambaut A, 2007). Модель нуклеотидных замен для каждого набора данных была выбрана с использованием программы jMODELTEST версии 1.0 (Guindon and Gascuel, 2003; Posada, 2008), на основании информационного критерия Акаике (Akaike, 1973). Для популяций были выбраны оптимальные модели нуклеотидных замен (Hasegawa et al., 1985).

Независимая калибровка «молекулярных часов» для *Gmelinoides fasciatus* по фрагменту гена CO1 митохондриальной ДНК проведена с помощью программы Ima2 (Hey, Nielsen, 2007). Для перевода масштаба времени демографических историй для *G. fasciatus* из замен на сайт в годы

вследствие отсутствия калибровки молекулярных часов для амфипод на момент проведения анализа было использовано среднее значение скоростей дивергенции (1,6% на млн. лет), предложенных для членистоногих (Quek et al., 2004). После того, как абсолютные временные масштабы были вычислены, демографические истории были сопоставлены с палеоклиматической летописью, временные оценки для которой были произведены по калибровкам радиоуглерода осадочных кернов (Prokopenko et al., 2001; Urabe et al., 2004; Чебыкин и др., 2005).

Программа MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) использована для построения древа микроспоридий.

Различия в составе сообществ микроспоридий между популяциями хозяина *G. fasciatus* оценивали вычислением дистанций Хеллингера (Hellinger distances) с использованием R библиотеки vegan (Oksanen et al., 2007).

Глава 3: РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Популяционная структура *G. fasciatus* озера Байкал. По результатам анализа последовательностей фрагментов гена первой субъединицы цитохром оксидазы С впервые дана молекулярно-филогенетическая характеристика, выявлен внутривидовой полиморфизм байкальской амфиподы *G. fasciatus* (рис. 1). Исследование пространственной генетической структуры проводили с помощью простирающегося древа методом максимальной экономии (Maximum Parsimony, MP). Доказана адекватность данного метода для нашего набора данных.

Простирающееся древо дало нам представление о степени репродуктивной изоляции между особями, обитающими в обозначенных районах (рис. 1). Таким образом, можно выделить четыре группы *G. fasciatus*, которые образуют четыре отдельные ветви на простирающемся древе, и считать их отдельными популяциями. Группы на древе соответствуют четырем непрерывным большим географическим ареалам, обозначенным на рис. 1. По западному берегу озера от бухты Половинка до пролива Малое Море обитает юго-западная популяция *G. fasciatus*, ареал юго-восточной популяции простирается от пос. Култук до губ. Таланка, на среднем Байкале по восточному берегу от губы Таланка до Чивыркуйского залива встречается центральная популяция бокоплава. Популяционная принадлежность образцов из губы Таланка сомнительна. На всем протяжении северного Байкала, как по западному, так и по восточному берегу обитает северная популяция *G. fasciatus*. Все популяции непрерывны с географической точки зрения. Границы между этими ареалами определены с точностью расстояния между станциями сбора. Сложно картировать их более точно, так как не ясно, чем определяется ширина границ: 1) прерывистое распределение вдоль берега; 2) жизнеспособность гибридов первого поколения.

Для того чтобы оценить, отражает ли построенное нами древо популяционную структуру *G. fasciatus*, мы провели тест на дифференцированность установленных групп (уровень достоверности = 0.05) Arlequin. Тест показал достоверные различия между всеми парами групп.

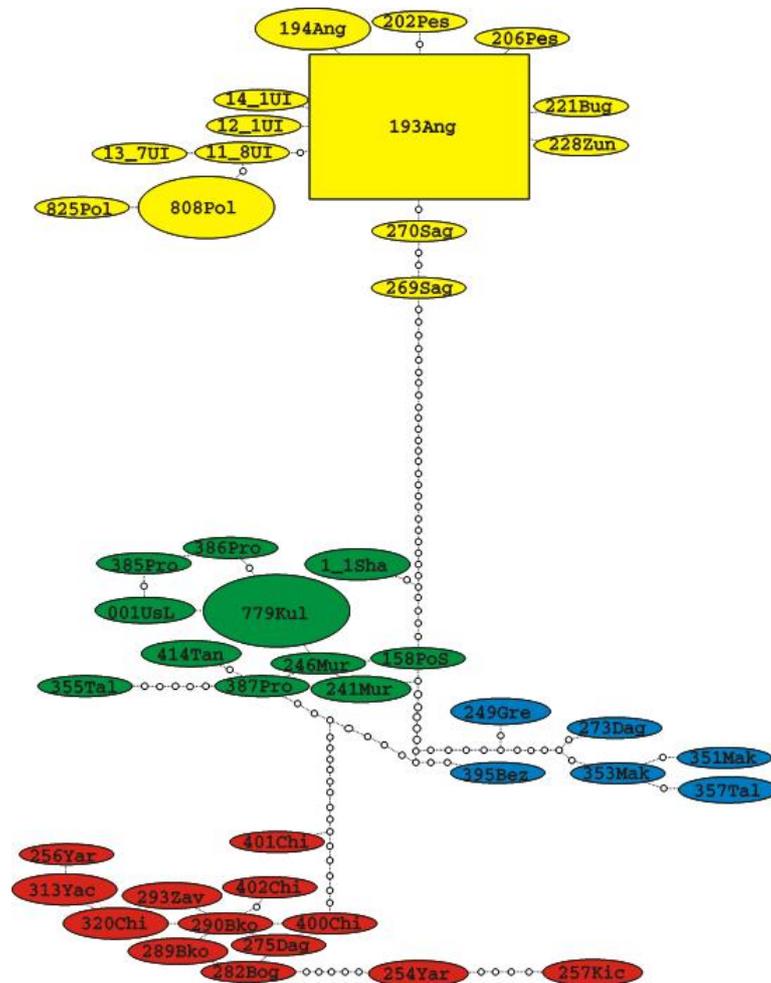


Рисунок 1. Древо, построенное методом максимальной экономии с помощью программы TCS 1.2.1 на основе 108 последовательностей фрагмента митохондриального гена CO1. Цветом выделены разные клады, соответствующие юго-западной (выделено желтым цветом), северной (красным), центральной (синим) и юго-восточной популяции (выделено зеленым цветом). Площадь пропорциональна числу наблюдающихся гаплотипов.

Таблица 1. Степень нуклеотидного разнообразия среди популяций (Φ_{ST}) (Nei, 1987; Excoffier, 1992)

Популяции	центральная	северная	юго-восточная	юго-западная
центральная	0,00			
северная	0,67	0,00		
юго-восточная	0,69	0,75	0,00	
юго-западная	0,75	0,81	0,83	0,00

Для более подробного исследования генетической подразделенности вида, мы вычислили индексы фиксации Φ_{ST} (форма нуклеотидного разнообразия) (Vossbrink et al., 1987; Walsh et al., 2005), чтобы установить, скрещиваются ли особи из разных групп с появлением жизнеспособного потомства (табл. 1). Эти индексы фиксации отражают соотношение внутри- и межгруппового полиморфизма. Для установленных групп практически нет общих гаплотипов, есть только промежуточные. Это говорит о существовании хорошей изоляции между ними. Индексы Φ_{ST} для нашего

набора последовательностей оказались очень высокими, что также свидетельствует о низком уровне обмена генами между установленными группами. То есть, несмотря на то, что ареалы обитания не изолированы, и особи *G. fasciatus* из разных клад могут скрещиваться между собой, потомство от таких скрещиваний скорее всего слабо- либо нежизнеспособно. В противном случае показатели внутри- и межпопуляционной изменчивости были бы в меньшей степени различными.

Проведенный анализ подтвердил существование нескольких отдельных популяций *G. fasciatus* в Байкале.

Таблица 2. Полиморфизм последовательностей mtCO1 и статистические тесты нейтральности для четырех популяций *Gmelinoides fasciatus*

№	Популяции	N	S	h	Pi	k	D	Fs	Θ_{Hom}
1	центральная	8	22	6	0,014	8,02	-0,37	0,45	11,53
2	северная	21	21	13	0,009	5,24	-0,43	-3,28	18,37
3	юго-восточная	28	22	13	0,007	4,09	-1,01	-2,95	4,22
4	юго-западная	50	20	14	0,004	2,24	-1,60	-5,10	1,95

N – число последовательностей; S – число полиморфных (сегрегирующих) сайтов; h – число гаплотипов; Pi – нуклеотидное разнообразие; k – среднее число нуклеотидных различий; D – Tajima's D; Fs – индекс Fu's Fs.

Оценки генетического разнообразия для каждой исследованной популяции показаны в таблице 2 (Tajima, 1983). В нашем случае, нуклеотидное разнообразие для юго-западной популяции существенно меньше нуклеотидного разнообразия остальных популяций, что может свидетельствовать об отборе, «бутылочном горлышке» или каком-то другом серьезном «стрессе», действующем на эту популяцию (табл. 2). Наши значения Tajima's D лежат в диапазоне от -2,5 до 2,5, что говорит о нейтральности замен, составляющих полиморфизм гаплотипов CO1.

Юго-восточная популяция, по-видимому, является предковой для всех других популяций вида *G. fasciatus*. Об этом свидетельствует то, что на древе все популяции формируют самостоятельные четко различимые группы, связанные только с юго-восточной популяцией (рис. 1). Более того, юго-восточная популяция наиболее разнообразна генетически. Вероятнее всего, заселение озера Байкал представителями вида *G. fasciatus* началось с восточного берега озера.

Внебайкальские представители вида *G. fasciatus* из озера Арахлей и Финского залива показали принадлежность к юго-восточной популяции вида (рис. 1). Наши результаты согласуются с литературными данными об интродукции бокоплава в 60-х годах XX в. (Матафонов, 2003) из Посольского Сора озера Байкал в другие водоемы. Следовательно, юго-восточная популяция бокоплава стала источником для *G. fasciatus*, колонизировавшего по данным 2006 года 44 водоема европейской части России, Урала, Сибири, Казахстана и Средней Азии (Верещагин, 1940).

Все *G. fasciatus*, обнаруженные за пределами Байкала, в т.ч. в р. Ангара, относятся к уже ранее установленным популяциям в озере Байкал, что

связано в первую очередь с еще очень небольшим с эволюционной точки зрения временем, прошедшим с момента интродукций и распространения. Эти события еще не успели отразиться на уровне полиморфизма.

Демографическая история популяций *G. fasciatus*

Самый низкий показатель генетического разнообразия оказался у юго-западной популяции. Значение параметра θ_{Hom} для юго-западной популяции также оказалось самым низким и составило 1,95 (табл. 2). Низкий уровень генетического разнообразия группы особей может указывать на два фактора: во-первых, на относительно маленький возраст группы и, во-вторых, на прохождение через стадию резкого сокращения численности группы («бутылочное горлышко»). Бутылочное горлышко – это генетическое явление, которое можно объяснить либо массовым вымиранием особей, либо эффектом основателя. В данном случае, низкие индексы генетического разнообразия отмечены были только у юго-западной популяции. Предположительно, бутылочное горлышко у юго-западной популяции соответствует массовому вымиранию особей.

Анализ юго-западной популяции показал, что, в отличие от других популяций, сеть гаплотипов содержит широко распространенный центральный гаплотип, окруженный большим числом единичных/синглетных гаплотипов, что также говорит о росте популяции (рис. 2).

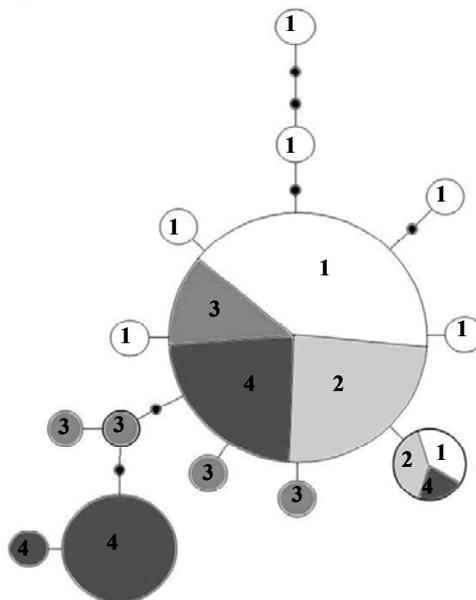


Рисунок 2. Структура юго-западной популяции *Gmelinoides fasciatus*. 1 (белый цвет) – образцы из оз. Байкал севернее устья Ангары, 2 (светло-серый) – из Ангары в районе г. Иркутск, 3 (серый) – из Ангары в районе г. Усть-Илимск, 4 (темно-серый цвет) – выделены образцы из б. Половинной оз. Байкал.

Результаты сравнительного анализа распределений попарных расстояний показаны на рисунке 3. В случае недавнего роста популяции формируется унимодальное распределение попарных различий (Sherbakov et al., 1999; Schluter, 2001). Такой график характерен для юго-западной популяции (рис. 4), где большинство попарных сравнений находится в

области малых генетических расстояний, и они показывают относительно хорошее совпадение с ожидаемыми распределениями. И наоборот, формы распределений попарных расстояний для трех остальных популяций неровные и скорее мультимодальные, большая часть попарных сравнений приходится на область бóльших генетических расстояний.

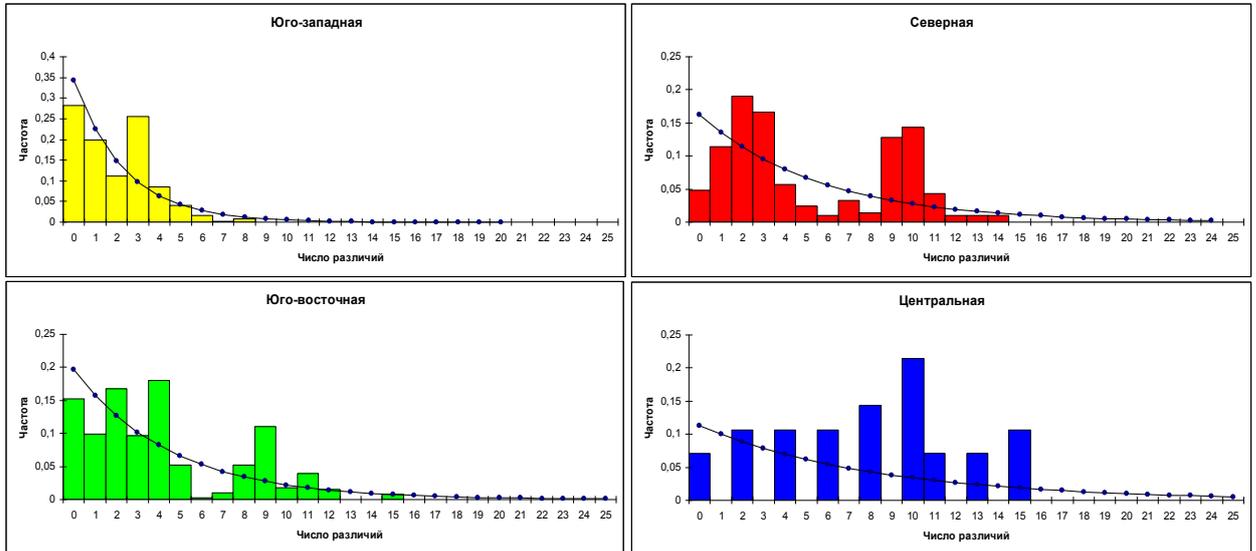


Рисунок 3. Сложная демографическая история популяций байкальской амфиподы *G. fasciatus* (mismatch distribution). Столбцы показывают наблюдаемые значения, кривая линия показывает ожидаемое попарное распределение расстояний для случая популяций с постоянной численностью (DnaSP v5).

Для северной и юго-восточной популяций *G. fasciatus* нет соответствия наблюдаемых распределений с кривой ожидаемых значений попарных дистанций, нет одномоментного расширения. По-видимому, у этих популяций более сложная динамика (история) (Seehausen, 2004). Для центральной популяции необходимо большее количество данных.

Исследование демографической истории популяций *G. fasciatus* Байкала показало умеренный рост численности особей для юго-западной популяции *G. fasciatus* (рис. 4). Тогда как результаты реконструкций для северной, юго-восточной и центральной популяций указывают на относительно постоянную численность. Возможно, увеличение численности популяции связано с восстановлением после «бутылочного горлышка». Для того чтобы проверить гипотезу «бутылочного горлышка», определили популяционные параметры θ_0 , θ_1 и τ , где θ_0 – размер, пропорциональный размеру условной предковой гаплоидной популяции, θ_1 – условный размер современной гаплоидной популяции и τ – возраст современной популяции, выраженный в единицах мутационного времени (Rieseberg et al., 2003).

В случае юго-западной популяции размер предковой популяции определяется как нулевой, размер современной популяции сравнительно велик, а τ имеет низкое значение по сравнению с другими популяциями. Это подтверждает нашу гипотезу о резком снижении численности, через которое

проходила юго-западная популяция, а также более молодой возраст юго-западной популяции по сравнению с другими группами исследуемого вида.

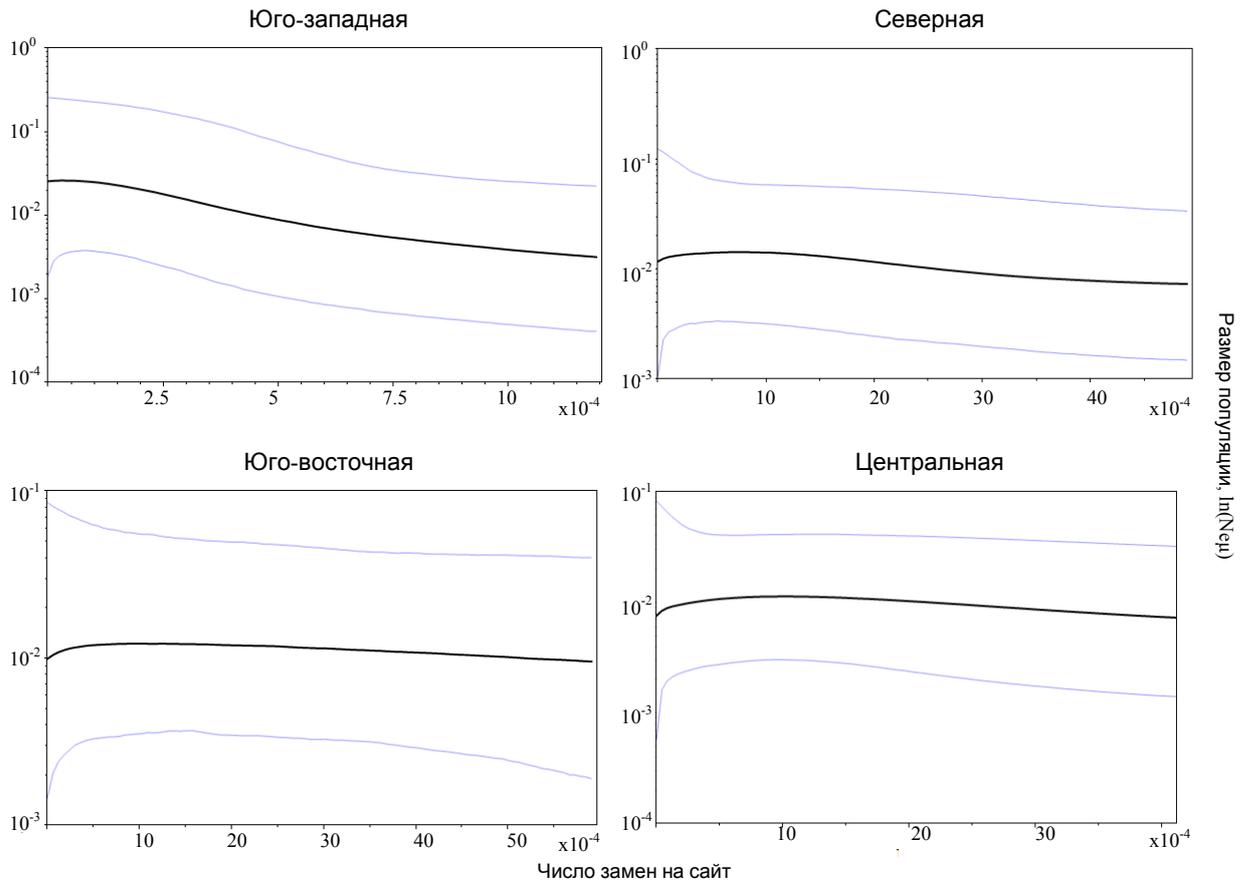


Рисунок 4. Наиболее вероятная демографическая история *G. fasciatus* (coalescence method). Время на графиках показано от настоящего к прошлому.

Анализ полных митогеномов не позволяет прийти к выводу о наличии адаптивных мутаций у предков юго-западной популяции. «Бутылочное горлышко» в данном случае может показывать как снижение эффективной численности, так и падение полиморфизма митохондрий. Падение полиморфизма митохондрий может произойти при падении численности и при отборе.

Реконструкция демографической истории для установленных в ходе исследования популяций вида *G. fasciatus* проведена впервые. Демографическая история юго-западной популяции *G. fasciatus* резко отличается от таковой остальных популяций. Она является достаточно короткой по сравнению с другими популяциями вида, а также по сравнению с другими видами беспозвоночных (Fast et al., 1999). Короткая демографическая история этой популяции *G. fasciatus* демонстрирует увеличение численности популяции (Гольдберг и др., 2005). Поэтому можно было бы предположить, что *G. fasciatus* относительно недавно колонизировал Юго-Западное побережье озера Байкал. Однако более вероятно, что эта популяция *G. fasciatus* недавно прошла через «бутылочное горлышко», а обнаруженный рост отражает недавнее восстановление численности

(Гоманенко и др., 2005). В любом случае остается непонятным, что вызвало резкое снижение численности юго-западной популяции.

После того, как была выполнена калибровка демографической истории юго-западной популяции *G. fasciatus* (Fast et al., 1999) с применением доступных скоростей молекулярной эволюции, обнаружилось, что ближайший общий предок для юго-западной популяции *G. fasciatus* относительно недавний. Реконструированная демографическая история юго-западной популяции показывает ее расширение, начавшееся примерно 25-50 тысяч лет назад, в период, отмеченный некоторым потеплением климата, относительно высоким уровнем воды и увеличением количества диатомовых водорослей, что выявлено по кернам осадков со дна озера (Гольдберг и др., 2005; Fast et al., 1999). То есть популяция *G. fasciatus* на юго-западном берегу озера Байкал начала расширение во время теплого периода с относительно высоким уровнем воды, что совпало с периодом высокого обилия диатомовых водорослей.

Итак, западный берег Байкала очень глубокий, обрывистый и там периодически происходят тектонические колебания (Мац и др., 2001). Одним из примеров является образование истока реки Ангары. Сточная прорезь в истоке Ангары, согласно Б.Ф. Луту, образование молодое, возникшее в четвертичный период, порядка 60 тысяч лет (Лут, 1978; Мац и др., 2002; Martens, 1997). Можно предположить, что в результате катаклизма в виде сброса и образования современного характера западного берега озера, произошло разрушение местообитаний вида *G. fasciatus* и его массовое вымирание. Хотя нельзя пренебрегать и биологическими причинами, например эпизоотиями. В тоже время амфипода-генералист *G. fasciatus* живет и на песчаных и на каменистых субстратах (Базикалова, 1945; Камалтынов, 2001) в большинстве участков литоральной зоны озера на глубинах между 0 и 5 метров и, более того, известно, что она легко заселяет новые местообитания и занимает места в экосистемах (Otto and Whitton, 2000; Berezina et al., 2009). Этот факт позволил виду быстро заселить вновь образовавшиеся места обитания и увеличить свою численность. Во всяком случае, увеличение численности, обнаруженное у *G. fasciatus* юго-западной популяции и стабильная численность остальных популяций, указывает на то, что факторы окружающей среды способствуют росту популяций этого вида в озере Байкал.

Остается открытым вопрос, что послужило причиной разделения экологически очень пластичного, высокоподвижного (минимальная миграционная активность составляет 2,5–5 км/мес.) (Камалтынов, 2001) вида на популяции со слабым потоком генов при непрерывности ареала обитания и отсутствии явных географических барьеров. Механизм генетической изоляции остается неясным.

Определение скорости накопления замен в митохондриальном гене первой субъединицы цитохромоксидазы с для амфиподы *G. fasciatus*. В р. Ангара обитает *G. fasciatus*, принадлежащий юго-западной популяции вида (рис. 1,2). Однако на рисунке 2 видно, что р. Ангара делит популяцию на две

группы, не полностью изолированные друг от друга репродуктивно: первая обитает в районе бухты Половинной южнее стока реки, вторая – выше стока. Причем наблюдается неполное разделение предковых линий для этих групп. По современным литературным данным общепринято, что сток вод озера Байкал через реку Ангару образовался 60 000 лет назад. (Лут, 1978; Мац и др., 2002; Martens, 1997). По нашим данным с образованием стока началось разделение между группами юго-западной популяции (мыс Половинный и территория выше Ангары). Средняя скорость накопления нуклеотидных замен в гене CO1 для членистоногих составляет 1.6% на млн. лет (Quek et al., 2004). Последнее значение и использовано в качестве начального в настоящем исследовании. Эти данные позволили нам точно определить скорость накопления замен для CO1 гена у *G. fasciatus*, которая составляет 6.3-7.5% на миллион лет.

Микроспоридии и их разнообразие у *G. fasciatus*. Одним из наиболее вероятных механизмов, объясняющих подразделенность на популяции, наблюдаемую у амфиподы *G. fasciatus*, а также, возможно, для некоторых других видов байкальских амфипод, может служить их дифференциальная зараженность микроспоридиями. То есть экологическая репродуктивная изоляция на основе различий в видовом составе и частоте встречаемости паразитирующих на *G. fasciatus* микроспоридий.

Для последовательностей, полученных в ходе нашего исследования (номера доступа в GenBank FJ820187 – FJ820237) и последовательностей, взятых из Генбанка, было построено филогенетическое древо (рис. 5). Анализ топологии древа показал, что популяции хозяина заражены как минимум шестью видами микроспоридий, достаточно далеко отстоящими друг от друга на филогенетическом древе. Большая их часть, по-видимому, эндемична для Байкала. До вида пока определен только один.

Интересно, что для паразитов вообще характерна формула: количество видов паразитов равно или превышает количество видов их хозяев (Sprague and Vavra, 1977; Lafferty et al., 2008; Schmid-Hempel, 2011). Для Байкала же до сих пор считалось характерным обратное соотношение (Русинек, 2007). В нашем исследовании подтверждается общераспространенная в мире ситуация, на один вид хозяина, *G. fasciatus*, приходится 6 видов паразитов. Видовой состав микроспоридий для каждой популяции показан на графике (рис. 6). Из этого графика видно, что вид *Dictyocoela duebenum* обнаружен во всех популяциях и является единственным для северной и центральной популяций. Относительно большая распространенность этого вида у *G. fasciatus* можно объяснить его космополитичностью и тем, что он паразитирует на *G. fasciatus* дольше, чем другие обнаруженные в настоящем исследовании виды микроспоридий.

У юго-западной популяции представлены все обнаруженные виды (характерно для обеих субпопуляций). Тот факт, что из 4 популяций *G. fasciatus* только юго-западная показывает все обилие видов паразитирующих на них микроспоридий, можно объяснить тем, что во время массового вымирания популяции, или «бутылочного горлышка» (Гоманенко и др.,

2005), амфиподы были наиболее подвержены инфицированию; некоторые из зараженных особей могли дать начало массовому инфицированию; а также стать толчком для образования новых видов этого паразита. Интересным результатом оказалось обнаружение случаев двойного заражения только у

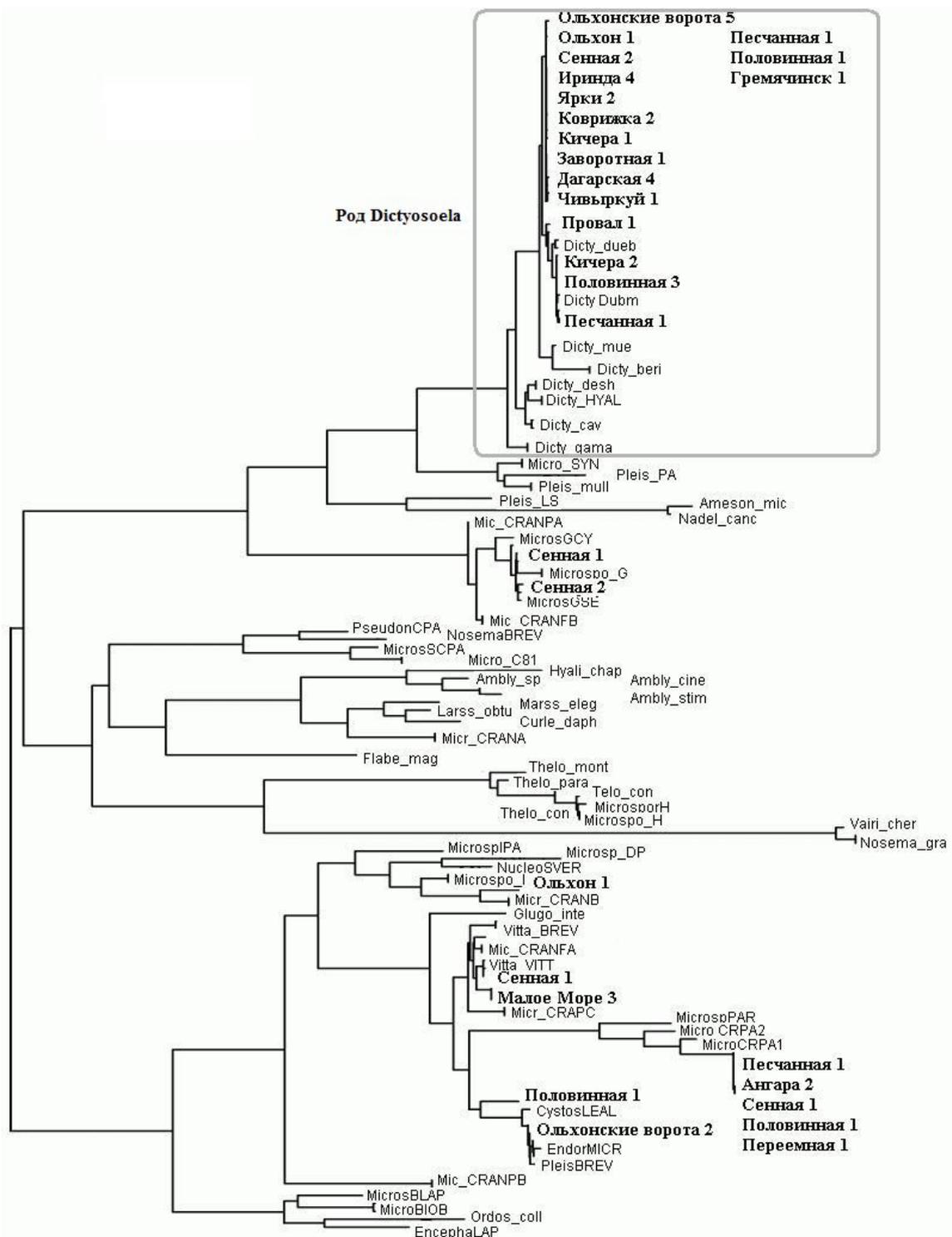


Рисунок 5. Дерево, построенное на основе последовательностей, полученных в ходе данного исследования, и последовательностей из Генбанка. Жирным шрифтом выделены последовательности микроспоридий, полученные в данном исследовании. Каждая последовательность приурочена к месту отлова *G. fasciatus*. Цифры показывают количество последовательностей. Прямоугольником выделены представители микроспоридий, принадлежащие роду *Dictyosoa*.

представителей юго-западной популяции. Присутствие большого количества видов паразитов приводит к их конкуренции и вытеснению в различные ниши. Присутствие нескольких видов паразитов в одном хозяине может говорить о наличии вертикального способа передачи микроспоридий в Байкале. Процент таких особей невелик (6,1%). Частота встречаемости микроспоридий неоднородна в пределах вида и варьирует в зависимости от популяции от 1 (для юго-восточной) до 49% (для северной популяции).

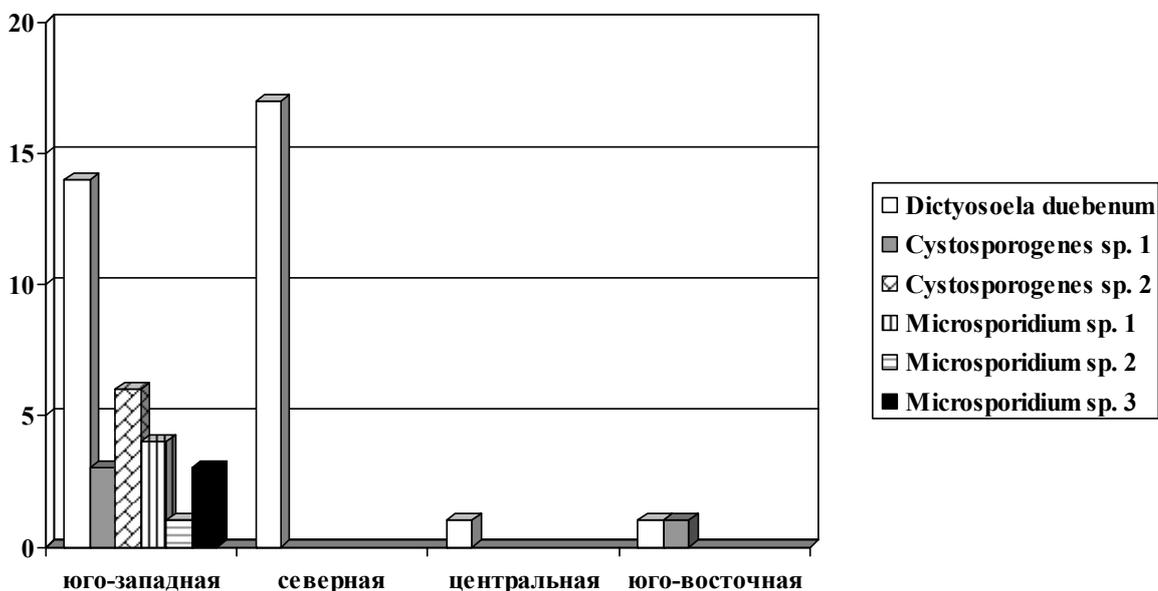


Рисунок 6. Видовой состав микроспоридий в популяциях *Gmelinoides fasciatus*. На оси x показано количество экземпляров микроспоридий каждого из обнаруженных видов.

Интересно, что юго-восточная популяция менее всего заражена исследуемыми внутриклеточными паразитами, она же, по-видимому, является исходной для всех остальных популяций. Представители *G. fasciatus*, собранные в верхнем течении Ангары, заражены микроспоридиями, тогда как у *G. fasciatus*, обитающих в районе Усть-Илимской ГЭС, микроспоридии обнаружены не были (Malavin et al., 2010).

Для того чтобы подтвердить или опровергнуть возможную роль микроспоридий в формировании межпопуляционных барьеров у хозяина, амфиподы *G. fasciatus*, в озере Байкал, мы, в первую очередь, определили, имеет ли место зависимость 1) генетической структуры популяций хозяина (индекс фиксации Φ_{ST}) и 2) состава сообществ микроспоридий, обнаруженных в ходе нашего исследования. Различия в зараженности микроспоридиями рассчитали по дистанциям Хеллингера (Hellinger distances) с использованием R библиотеки vegan (Oksanen et al., 2007). Дистанции Хеллингера основаны на квадратном корне из пропорционального избытка и отражают относительные различия в составе сообществ паразита.

Анализ относительных различий по составу сообществ паразитов позволил выявить значительные отличия между популяциями хозяина. Зависимость между составом и обилием паразитов и генетической

структурой популяций хозяина оказалась положительной, значения достоверными. Другими словами, чем выше отличия по зараженности популяций, тем более популяции разделены друг от друга. Поэтому различия в распределении микроспоридий могут решающим образом воздействовать на эволюцию репродуктивных барьеров, управляемых этим паразитом (они вызывают или ускоряют микроэволюционные процессы для *G. fasciatus* и могут играть роль в создании межпопуляционных репродуктивных барьеров). Именно эти различия могут служить причиной формирования репродуктивных барьеров между существующими популяциями и тем самым поддерживать слабый межпопуляционный обмен генами (Гоманенко и др., 2005), а также быть причиной, вызвавшей и/или поддерживающей относительные репродуктивные барьеры между популяциями.

Проведенное исследование показало, что различия в видовом составе и частоте встречаемости паразитирующих на *G. fasciatus* микроспоридий между соседними популяциями действительно существуют. Этот результат не исключает, что дифференциальное заражение микроспоридиями может быть и вторичным эффектом подразделенности вида. Однако различия по составу паразитов гораздо больше, чем генетические различия популяций хозяина. Следовательно, микроспоридии могут играть определенную роль в формировании изоляции между популяциями *G. fasciatus* и тем самым в процессе видообразования. Тем более в связи с тем, что границу между юго-восточной и юго-западной популяциями трудно объяснить с географической и палеогеографической точек зрения.

В случае если удастся продемонстрировать экспериментально репродуктивную изоляцию между представителями различных популяций, а также обнаружить диагностические морфологические различия, эти популяции можно описывать как самостоятельные виды.

Наше экспериментальное исследование демонстрирует роль коэволюции с паразитами в репродуктивной изоляции хозяина, независимо от определенного механизма, лежащего в основе дивергенции. Наши результаты, таким образом, согласуются с результатами, полученными другими исследователями (Buckling and Rainey, 2002; Brockhurst et al., 2004; Schulte et al., 2010; Berenos et al., 2012). Поскольку репродуктивная изоляция – решающий шаг по направлению к видообразованию, наши результаты еще раз подчеркивают важность экологических факторов в видообразовании (Schluter and Nagel, 1995; Funk, 1998; Jiggins et al., 2001; McKinnon et al., 2004; Rundle and Nosil, 2005; Smith and Benkman, 2007). Это указывает на то, что паразиты помимо того, чтобы отвечать за потерю биоразнообразия (Pounds et al., 2006) могут также ускорять дифференциацию и, в конечном счете, прокладывать дорогу к видообразованию.

ВЫВОДЫ

1. Впервые был применен анализ генетического полиморфизма для определения популяционной структуры амфиподы *G. fasciatus*, обитающей в Байкале и в бассейне р. Ангары. На основании сравнения

- 117 нуклеотидных последовательностей фрагментов гена CO1 митохондриальной ДНК показано, что вид образует как минимум четыре непрерывные популяции по берегам Байкала. Границы между популяциями не всегда соответствуют географической подразделенности озера.
2. Показано, что юго-восточная популяция обладает наибольшим генетическим полиморфизмом. Сделано предположение о том, что юго-восточная популяция является предковой для трех других популяций. Подтверждена ее роль в качестве источника *G. fasciatus*, интродуцированного в различные водоемы России.
 3. Демографическая история юго-западной популяции резко отличается от истории остальных байкальских популяций. Предложена гипотеза «бутылочного горлышка». Показано, что эта популяция подразделена на две субпопуляции истоком р. Ангары. Геологические данные об образовании истока Ангары позволили независимо калибровать «молекулярные часы» для этого вида по фрагменту гена CO1 митохондриальной ДНК.
 4. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена малой субъединицы рДНК микроспоридий позволило установить, что *G. fasciatus* заражен шестью видами микроспоридий. Один из них, *Dictyocoela duebenum*, является космополитным, и в Байкале он обнаружен во всех популяциях. Остальные виды микроспоридий, по-видимому, обнаружены только в Байкале.
 5. Юго-Западная популяция отличается присутствием всех видов паразита, характерных для *G. fasciatus*, а также наличием двойного заражения, несмотря на относительно небольшую частоту встречаемости микроспоридий в этой популяции (32,18%).
 6. Качественное и количественное распределение паразитов в популяциях *G. fasciatus* указывает на весьма вероятную причастность микроспоридий к формированию и/или поддержанию межпопуляционных барьеров у *G. fasciatus*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. Популяционная структура байкальского бокоплава *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) / Г.В. Гоманенко, **Ж.В. Кузьменкова** [и др.] // Генетика. – 2005. – Т. 41. – № 7. – С. 1–6.
2. **Кузьменкова Ж.В.** Разнообразии микроспоридий, паразитирующих на байкальских амфиподах *Gmelinoides fasciatus* из разных популяций / **Ж.В. Кузьменкова**, Д.Ю. Щербаков, Д.Э. Смит // Известия Иркутского государственного университета (серия биология, экология). – 2008. – Т.1. – №2. – С. 56–61.
3. When environmental changes do not cause geographic separation of fauna: differential responses of Baikalian invertebrates // Fazalova V., **Petunina J.** [et al.] // BMC Evolutionary Biology. – 2010. – № 10. – P. 320.

Тезисы конференций:

1. Филогения основных семейств амфипод / Г.В. Гоманенко, **Ж.В. Кузьменкова** [и др.] // Всероссийской научно-практической конференции «Развитие физико-химической биологии и биотехнологии на современном этапе», посвященной 25-летию кафедры физико-химической биологии ИГУ: Материалы. Спец. вып. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2003. – №7. – С. 128–129.
2. **Кузьменкова Ж.В.** Роль микроспоридий в эволюции байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) / **Ж.В. Кузьменкова**, Д.Э. Смит, Д.Ю. Щербаков // 12-я международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века»: Материалы конференции. – Пушино, 2008. – С. 302–303.
3. Microsporidian parasites of *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) in Lake Baikal, Siberia: possible mechanism of parasite driven host speciation / **J.V. Kuzmenkova** [et al.] // SIAL 5: Abstracts of the International Symposium Speciation in Ancient Lakes. – Ohrid, 2009. - P. 57–59.
4. Signals of differential impact of environmental changes on demographic histories of invertebrates from Lake Baikal / V. Fazalova, **Z. Kuzmenkova** [et al.] // SIAL 5: Abstracts of the International Symposium Speciation in Ancient Lakes. – Ohrid, 2009. - P. 24–25.
5. Malavin S.A. Phylogenetic interrelationship of three introduced populations of *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) (Crustacea: Amphipoda) inferred from molecular data / S.A. Malavin, **Zh.V. Petunina**, D.Yu. Sherbakov // III International Symposium «Invasion of alien species in Holarctic». – Borok, 2010. – P. 68–69.
6. Насколько стабильны сообщества бентосных беспозвоночных Байкала? / Д.Ю. Щербаков, **Ж.В. Петунина** [и др.] // Пятая Верещагинская байкальская конференция. – Иркутск, 2010. – С. 85–87.
7. **Petunina J.V.** Population structure and demographic history of *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) from Lake Baikal and Angara River / **J.V. Petunina**, D.Y. Sherbakov // SIAL 6: Book of abstracts. – Bogor, 2012. – P. 57–59.
8. **Petunina J.V.** Population structure of *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) from Lake Baikal and Angara River / **J.V. Petunina**, D.Y. Sherbakov, R.M. Kamaltynov // MolPhy-3: Contributions to the 3rd Moscow International Conference “Molecular Phylogenetics” – Moscow, 2012. – P. 64–65.
9. **Petunina J.V.** The evolution features of mitochondrial molecular marker COI from endemic Baikal amphipods of the familia Micruropodidae / **J.V. Petunina**, Yu.S. Bukin, R.M. Kamaltynov // The sixth Vereshchagin Baikal conference: abstracts. – Irkutsk, 2015. – P. 170–171.
10. Kovalenkova M.V. Nuclear and mitochondrial polymorphism in baikalian *Gmelinoides fasciatus* / M.V. Kovalenkova, **J.V. Petunina**, D.Y. Sherbakov // VIIIth international symposium «МАРЕЕГ»: book of abstracts. – Vladivostok, 2015. – P. 43.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность д.б.н. Д.Ю.Щербакову за чуткое руководство. Огромная благодарность коллегам из лаборатории геносистематики ЛИН СО РАН за сотрудничество и теплую рабочую обстановку. Большое спасибо Кондратову И.Г. за ценные замечания по работе. Различные этапы работ выполнялись при поддержке грантов РФФИ (№ 03-04-63157к, 04-04-48970, 04-04-48945а, 04-04-48549; 07-04-01410-а, 09-04-09436-моб_з), гранта Marie Curie Fellowship 2008 г., гранта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры ...» (2009 – 2013) «Исследование динамики популяций байкальских организмов» (соглашение от 23.07.2012 г. № 8099).