

На правах рукописи

МАЙКОВА Ольга Олеговна

**Особенности организации и эволюции митохондриальных
геномов байкальских губок (Lubomirskiidae)**

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2013 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Лимнологическом институте СО РАН

Научный руководитель:

Беликов Сергей Иванович д. б. н., профессор,
зав. лабораторией аналитической биоорганической химии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

Официальные оппоненты:

Дымшиц Григорий Моисеевич, д. б. н., профессор,
зав. кафедрой естественных наук СУНЦ при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Омельянчук Леонид Владимирович, д. б. н.,
зав. лабораторией генетики клеточного цикла, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

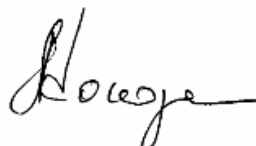
Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии РАН, г. Москва.

Защита состоится: _____ 2013 г. на заседании совета Д 003.045.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8/2.
Тел: +7- 952-916-7858. e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН
Автореферат разослан « ____ » _____ 2013г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.



Е. Б. Кокоза

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению различных аспектов биологии губок. Рост интереса к исследованиям этих животных обусловлен, прежде всего, их экологической значимостью: губки являются биофильтраторами, и, как следствие, биоиндикаторами состояния водной среды. Кроме того, губки представляют собой уникальный объект для изучения процессов микро- и макроэволюции, поскольку являются начальным звеном эволюции многоклеточных животных на Земле. В последние десятилетия возросло количество работ, посвященных молекулярно-филогенетическим и эволюционным исследованиям митохондриальной ДНК (мтДНК). К настоящему времени эволюция митохондриального генома губок на высоких таксономических уровнях достаточно хорошо изучена. Однако большинство исследованных митохондриальных геномов губок класса Demospongiae принадлежат к отдаленным видам (Wang, Lavrov, 2007, 2008; Lavrov, 2005, 2010; Lavrov, Lang, 2005; Erpenbeck, 2007; Eve et al., 2010; Belinky et al., 2008). Поэтому к настоящему времени изменения в мтДНК на близкородственном уровне остаются малоизученными. Чтобы понять, какие первичные мутации происходят в мтДНК в процессе эволюции, необходимо провести сравнение нескольких геномов близкородственных видов губок. В связи с этим виды байкальского эндемичного семейства Lubomirskiidae представляют собой интересный объект для изучения микроэволюционных процессов. Исследование полных митохондриальных геномов байкальских губок интересно не только для понимания глобальных эволюционных процессов, но и направлено на решение таких актуальных в настоящее время проблем, как филогенетические отношения внутри семейства Lubomirskiidae и идентификация видов. Данное исследование также позволяет углубиться в понимание механизмов эволюции и функционирования митохондриальной ДНК в целом.

Цель и задачи исследования.

Изучить особенности организации и эволюции митохондриальных геномов байкальских эндемичных губок семейства Lubomirskiidae.

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1) Определить нуклеотидные последовательности полных митохондриальных геномов губок семейства *Lubomirskiidae*, принадлежащих к разным родам: *Rezinkovia echinata*, *Swartschewska papyracea*, *Baikalospongia intermedia* morpha *profundalis*. Провести сравнительный анализ их нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей с аналогичными последовательностями байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* и космополитного вида *Ephydatia muelleri* из базы данных

2) Провести сравнительный и филогенетический анализы последовательностей митохондриальных геномов байкальских губок с последовательностями митохондриальных ДНК других губок класса *Demospongiae*.

3) Установить относительные скорости эволюции митохондриальной ДНК байкальских губок с помощью филогенетического анализа.

4) Вычислить скорости накопления нуклеотидных замен в кодирующих последовательностях мтДНК байкальских губок с учетом палеонтологических данных о времени дивергенции семейства *Lubomirskiidae* около 25-30 млн. лет назад.

5) Провести анализ эволюционной истории губок семейства *Lubomirskiidae* на основе нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей мтДНК.

6) Исследовать особенности организации и эволюции межгенных спейсеров митохондриальной ДНК байкальских губок

Научная новизна.

Впервые в результате проведенной работы определены нуклеотидные последовательности полных митохондриальных геномов представителей разных родов байкальского семейства *Lubomirskiidae*: *Baikalospongia intermedia profundalis*, *Rezinkovia echinata* и *Swartschewska papyracea*. На основе анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей впервые выявлены особенности организации и эволюции мтДНК байкальских губок: разная скорость эволюции последовательностей мтДНК среди исследованных видов *Lubomirskiidae*. Также на примере байкальских эндемичных губок впервые показана быстрая эволюция межгенных спейсеров на близкородственном уровне.

Впервые на основе существующих палеонтологических данных о времени дивергенции семейства *Lubomirskiidae* с помощью

молекулярно-филогенетических методов реконструирована эволюционная история трех видов байкальских губок.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Настоящая работа вносит существенный вклад в понимание механизмов эволюции и функционирования митохондриального генома животных в целом и процесса эволюции семейства *Lubomirskiidae* в частности.

Материалы диссертационной работы могут быть полезны при проведении таксономической ревизии байкальских эндемичных губок.

Апробация результатов.

Материалы диссертации были представлены: на IV международной научной конференции «Биоразнообразие и роль животных в экосистемах» (Днепропетровск, 2007), на X съезде гидробиологического общества при РАН (Владивосток, 2009), на ежегодном съезде «Общества общей и сравнительной биологии» (США, Сиэтл, 2010), на восьмой международной конференции по губкам «VIII World Sponge Conference» (Гирона, Испания, 2010), на V Верещагинской Байкальской конференции (Иркутск, 2010), на II международной научной конференции «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии» (Улан-Удэ, 2011), на II международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (Новосибирск, 2011), на 3-й Московской международной конференции «Молекулярная филогенетика MolPhy-3» (г. Москва, 2012).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. К особенности организации митохондриального генома байкальских эндемичных губок относится быстрая экспансия межгенных районов, вызванная внедрением и распространением множества инвертированных последовательностей.

2. Виды семейства *Lubomirskiidae* обладают разной скоростью накопления нуклеотидных замен в мтДНК, но в среднем в несколько раз ниже скорости эволюции мтДНК других групп животных.

3. Глубоководный вид *B. intermedia profundalis* является представителем наиболее древней эндемичной спонгиофауны. Время дивергенции видов *L. baicalensis* и *R. echinata* не превышает 5 миллионов лет.

Личный вклад соискателя. Выделение ДНК, амплификация и создание библиотек клонов фрагментов митохондриальных геномов, определение нуклеотидных последовательностей межгенных районов мтДНК, а также анализ полученных данных выполнены автором самостоятельно.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа включает следующие разделы: введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключение, выводы, список используемой литературы и приложение. Работа изложена на 127 страницах, иллюстрирована 29 рисунками и 12 таблицами. Список литературы содержит 8 отечественных и 147 зарубежных источников.

Благодарности.

Автор выражает благодарность своему руководителю д. б. н., профессору С. И. Беликову. Автор глубоко признателен профессору Д. В. Лаврову, в чьей лаборатории было проведено определение нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов губок. Огромную благодарность автор выражает д. б. н. Д. Ю. Щербакову за помощь в обработке данных и ценные замечания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения полных нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов были выбраны образцы губок байкальского семейства *Lubomirskiidae*, относящихся к разным родам: *Rezinkovia echinata*, *Swartschewska papyracea* и *Baikalospongia intermedia* morpha *profundalis*.

Амплификацию митохондриальных геномов проводили в виде пяти фрагментов длиной от 3 до 8 т.п.н. с помощью специфических праймеров, сконструированных на основе последовательности мтДНК байкальской губки *L. baicalensis*, гомологичных консервативным участкам белок-кодирующих генов: lb-cob-f1 (GGATTAGTGTCTCAAATGCAAC), lb-cob-r1 (TTTGATCCATCCTCATGTAAAGC), lb-cox1-f1 (GATAGGTACAGCATTTAGTATGC), lb-cox1-r1 (CATACAAATAATGGCAGTCTATCC), lb-cox2-f1 (TGTTCCSTATACAAACACAAGTGC), lb-cox2-r1 (TTAACTGATAGGGATGGAACAGC), lb-nad5-f1

(СТАТТАТГТТТААТТГААТТССГГТАС), lb-nad5-r1
(АТТАГГССГТССАСТААТАААССАГ), lb-rns-f2 (ССТГАААГ
АГТАССАТССА), lb-rns-r1 (ТААГГАССТГАССАТССАТСС).

Амплификацию и секвенирование фрагментов межгенных районов мтДНК проводили с использованием специфических праймеров: (trnY-trnM_L) 5'-GATGGCAGAGCGGТААТСС-3', (trnM-trnY_R) 5'-GТАГГТТССАГТССТССАТСС-3'. Сбор консенсусных последовательностей трех митохондриальных геномов байкальских губок осуществляли при помощи программ STUDEN (Staden, 1996), MAFFT и BioEdit.

Скорости синонимичных (dS) и несинонимичных замен (dN), а также их соотношение (dN/dS) для каждого митохондриального гена и всей кодирующей последовательности определяли при помощи программы PAML (Yang, 1997). Модели вторичных структур межгенных районов мтДНК были получены с помощью Mfold (версия 3.2) (Zuker, 2003) (при температуре 4° С) и пакета программ Vienna RNA (RNAfold, RNAalifold) (Hofacker, 2003).

Для проведения филогенетического анализа модели нуклеотидных и аминокислотных замен для каждого гена определяли с помощью программ jModelTest (Posada 2008) и ProtTest (Abascal et al., 2005) соответственно, согласно критерию Akaike (AIC). Филогенетические деревья строили байесовским методом (Bayesian method, MB), используя программу MrBayes версии 3.2. (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Для оценки предположительного времени кладогенетических событий в эволюции байкальского семейства Lubomirskiidae применяли анализ «молекулярных часов», основываясь на палеонтологических данных о дивергенции семейства Lubomirskiidae около 30 млн. лет назад (Мартинсон, 1940).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение нуклеотидных последовательностей

Определены последовательности трех полных митохондриальных геномов байкальских губок, принадлежащих к разным родам байкальского эндемичного семейства Lubomirskiidae: *Rezinkovia echinata*, *Swartschewsikia papyracea*, *Baikalospongia intermedia* morpha *profundalis* (глубоководная губка). Для анализа внутривидовой и межвидовой вариабельности межгенных районов митохондриального генома байкальских губок выбраны

протяженные участки между генами тРНК-Met и тРНК-Pe, тРНК-Pe и тРНК-Tyr. Последовательности районов между генами тРНК-Met и тРНК-Pe, тРНК-Pe и тРНК-Tyr определены для 36 образцов губок из семейств Lubomirskiidae и Spongillidae, включая губок из озер Чагытай и Топе-Холь (Тува). Из 36 полученных последовательностей 31 принадлежит байкальским эндемичным губкам (Lubomirskiidae, 8 видов) и 5 – космополитным губкам (Spongillidae, 3 вида).

Структура митохондриального генома байкальских губок

Длина последовательностей митохондриальных геномов составила у *S. papyracea* 26518 п.н., у *B. intermedia profundalis* – 28227 п.н. и у *R. echinata* – 28614 п.н. В анализ также включены последовательности митохондриальных геномов видов *L. baicalensis* (Lubomirskiidae, род *Lubomirskia*) (Lavrov, 2010) и вида *E. muelleri* (Wang, Lavrov, 2008), представителя космополитного семейства Spongillidae. Длина последовательностей составила 28958 п.н. и 23929 п.н. соответственно. Увеличение размера митохондриальной ДНК байкальских губок обусловлено главным образом удлинением межгенных районов, протяженность которых, включая вид *L. baicalensis*, варьирует от 7633 п.н. до 9707 п.н., что составляет от 28,8% до 35,5% от общей длины генома. Митохондриальный геном байкальских губок имеет набор и порядок расположения генов, идентичный таковому у *E. muelleri* и включает 2 гена рРНК (rnl, rns), 25 генов тРНК и 14 белок-кодирующих генов (atp6, atp 8-9, cob, nad-6, 4L, cox1-3).

Эволюция кодирующих последовательностей митохондриальной ДНК байкальских губок

Последовательности митохондриальных генов среди видов Lubomirskiidae обладают высоким генетическим сходством, не позволяющим применять эти гены по отдельности в качестве молекулярных маркеров для филогенетических реконструкций эндемичного семейства.

Для видов *R. echinata*, *S. papyracea*, *B. intermedia profundalis*, *L. baicalensis* и *E. muelleri* проведены попарные вычисления скоростей синонимичных (dS) и несинонимичных (dN) замен по каждому гену относительно последовательности отдаленной пресноводной губки *Corvomeyenia* sp. (неопубликованная последовательность этой губки предоставлена лично Д.В. Лавровым). В результате выявлено, что ускорение темпов накопления нуклеотидных замен у

байкальских губок происходит как по синонимичным, так и по несинонимичным сайтам. Такая тенденция наблюдается у всех байкальских губок в генах *cox2*, *atp8*, *atp6*, *cob*, *nad4*, *nad6*, *nad3*, *nad1*, *nad2* и *nad5*. В генах *cox3*, *nad4L* и *cox1* ускорение темпов накопления нуклеотидных замен по несинонимичным позициям кодона наблюдается только у вида *S. papyracea*. Максимальные относительные значения ускорения эволюции последовательностей мтДНК как по синонимичным, так и по несинонимичным позициям кодона обнаружены у вида *S. papyracea* по гену *cob*.

В результате подсчета соотношения несинонимичных замен к синонимичным (dN/dS) можно говорить о том, что все белок-кодирующие гены мтДНК четырех видов байкальских губок находятся под действием стабилизирующего отбора.

Эволюция индивидуальных видов байкальских губок

Анализ нуклеотидных последовательностей 14 кодирующих генов мтДНК байесовским методом с 95% вероятностью показал ускорение темпов накопления нуклеотидных замен у *S. papyracea* (95% НРД интервал > 1 , $Var > 1$), тогда как ускорение эволюции мтДНК видов *R. echinata*, *B. intermedia profundalis* и *L. baicalensis* не выявлено (95% НРД интервал < 1). С помощью молекулярно-филогенетического анализа (Рис. 1) на основе палеонтологических данных о дивергенции семейства *Lubomirskiidae* около 30 млн лет назад показано, что скорость накопления нуклеотидных замен мтДНК видов *R. echinata*, *B. intermedia profundalis* и *L. baicalensis* составляет около $0,055 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год, тогда как у *S. papyracea* этот показатель увеличен почти вдвое – $0,13 \times 10^{-9}$. Такая скорость эволюции мтДНК в 2,6-9 раз ниже скорости накопления нуклеотидных замен в мтДНК растений (0.34) и кораллов (0.5) (Hellberg, 2006; Lynch et al., 2006).

Поскольку скорость эволюции в разных ветвях байкальских губок существенно различается (Рис. 1), а именно скорость накопления нуклеотидных замен в мтДНК вида *S. papyracea* в два раза превышает скорость эволюции мтДНК *R. echinata*, *B. intermedia profundalis* и *L. baicalensis*, не представляется возможным применять гипотезу о молекулярных часах для всех этих четырех видов.

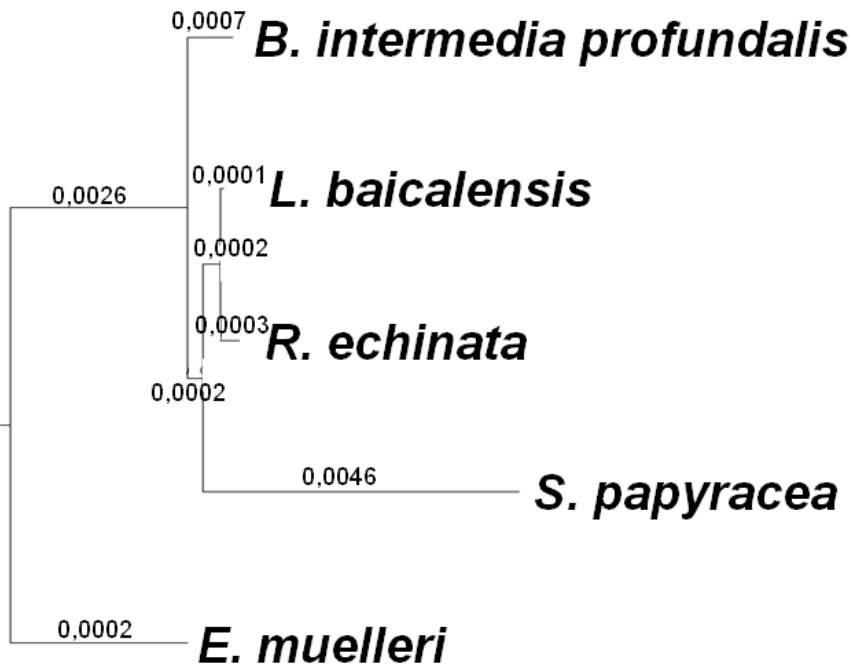


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное байесовским методом на основе нуклеотидной последовательности 14 митохондриальных генов, цифрами показаны длины ветвей.

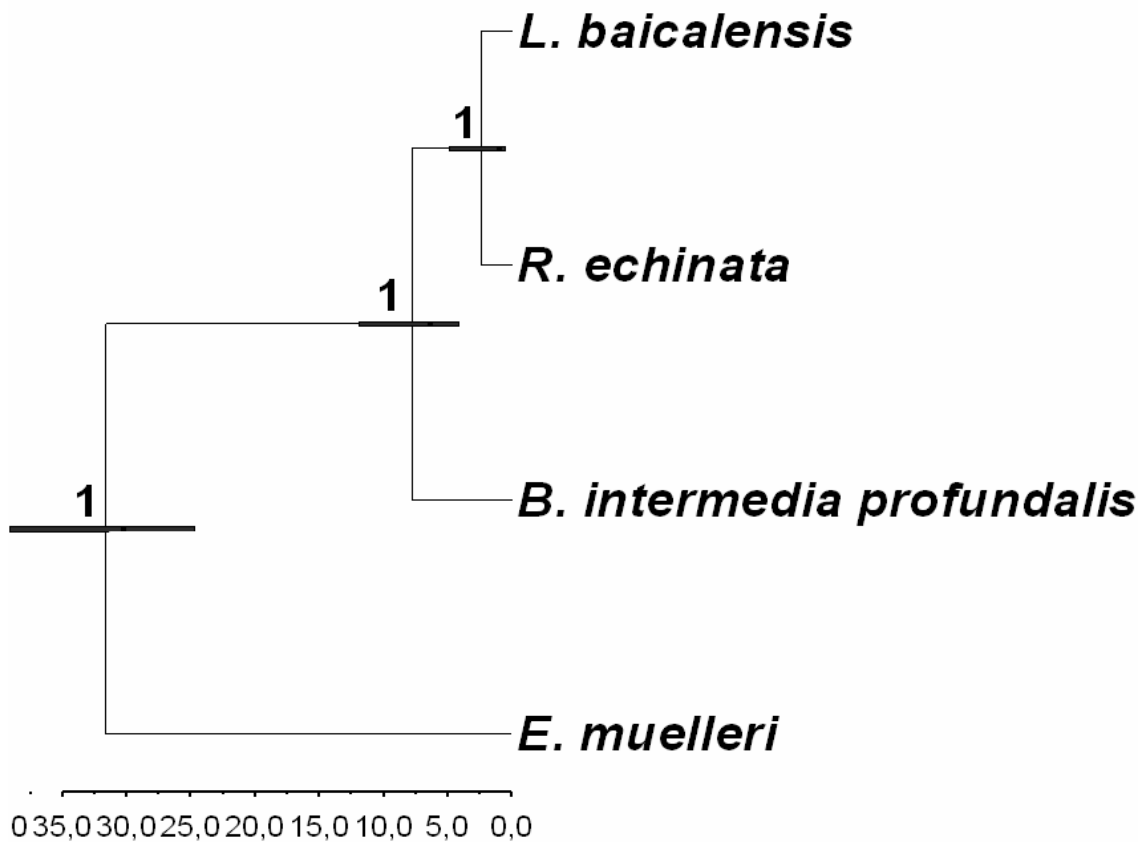


Рис. 2. Байесовское древо построено с предположением о верности гипотезы молекулярных часов на основе нуклеотидной последовательности 14 митохондриальных генов. Черными линиями показаны значения 95% доверительного интервала, на линейке цифрами обозначены миллионы лет.

Поэтому дальнейшее построение филогенетического древа с целью определения кладогенетических событий проводили без вида *S. papyracea*. В результате молекулярно-филогенетического анализа, на основании оценки времени дивергенции Lubomirskiidae ~25-30 млн. лет назад показано, что около 12-4,3 млн. лет назад от общего предка байкальских губок отделился предок современного глубоководного вида *B. intermedia profundalis*. Виды *L. baicalensis* и *R. echinata* образуют молодую кладу, отделившуюся в плиоцен-плейстоцене около 4,8-0,4 млн. лет назад (Рис. 2).

Филогенетический анализ губок на основе белок-кодирующих генов

Для филогенетического анализа были использованы последовательности 20 митохондриальных геномов Demospongiae из базы данных. В качестве внешней группы использована последовательность хоанофлагеллята *Monosida brevicollis* (NC 004309) (King, 2008).

В результате филогенетических реконструкций на основе предсказанных аминокислотных последовательностей 14 митохондриальных генов подтверждена монофилетичность семейства Lubomirskiidae, а также ближайшее родство байкальских губок с сестринским космополитным видом *E. muelleri*.

Анализ межгенных районов мтДНК байкальских губок

Общая длина межгенных районов составила 7790 п.н. (29.4%) для *S. papyracea*, 9002 п.н. (32%) для *B. intermedia profundalis* и 8970 п.н. (32%) для *R. echinata*, в то время как для *L. baicalensis* и *E. muelleri* эти значения составили 9707 п.н. (33.5%) и 5220 п.н. (21.8%) соответственно.

Ранее опубликованные данные свидетельствуют о наличии в составе некодирующей мтДНК *L. baicalensis* множества инвертированных повторов, способных формировать устойчивые шпилечные структуры. На основании этих данных проведен поиск и сравнительный анализ инвертированных последовательностей в межгенных районах мтДНК исследуемых нами трех видов байкальских губок. В результате было выявлено 97 таких последовательностей у *S. papyracea*, 96 – у *B. intermedia profundalis* и 144 – у *R. echinata*, тогда как у *L. baicalensis* Лавровым Д.В. было обнаружено 160 инвертированных повторов (Lavrov, 2010). Согласно ранее предложенной классификации, подразделяющей инвертированные последовательности мтДНК *L. baicalensis* на 8

классов (H1-8) (Lavrov, 2010), у видов *S. papyracea*, *B. intermedia profundalis* и *R. echinata* были обнаружены последовательности, принадлежащие ко всем этим классам. Кроме этого, обнаружен дополнительный тип повтора, имеющийся только у вида *B. intermedia profundalis*. В результате моделирования вторичных структур показано, что инвертированные последовательности способны формировать как одиночные, так и двойные шпилечные структуры.

Анализ распределения вторичных элементов в некодирующей мтДНК байкальских губок показал их таксономическую специфичность. Показано, что некоторые двойные вторичные элементы представляют собой псевдоузлы (Рис. 3). Наличие псевдоузлов в мтДНК байкальских губок свидетельствует о высокой вероятности внутримолекулярной рекомбинации, как возможного механизма распространения инвертированных последовательностей в межгенных областях.

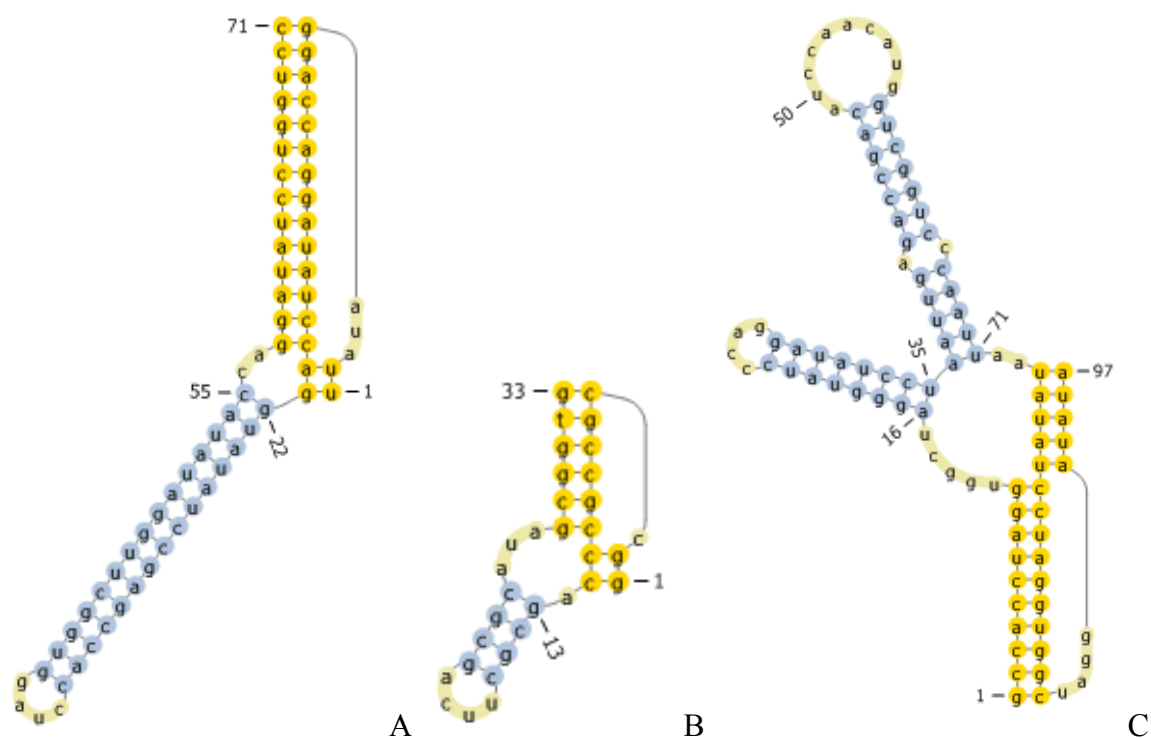


Рис. 3. Конформации потенциальных псевдоузлов: А – у *L. baicalensis*, В – у *B. intermedia profundalis*, С – у *S. papyracea*.

Многие исследования показывают, что накопление инвертированных повторов в геноме в дальнейшем может способствовать рекомбинационным событиям, способствующим реорганизации митохондриального генома (Nash et al., 2007, 2008).

В результате анализа распределения шпилечных структур, можно сказать, что эти элементы являются динамичными и быстро эволюционирующими. Мы предполагаем, что некоторые вторичные структуры представляют собой мобильные элементы (Wessler et. al., 1995).

Сравнительный анализ двух некодирующих районов мтДНК пресноводных губок

3.8.1. Вторичная структура двух межгенных районов мтДНК байкальских губок. В результате сравнительного анализа последовательностей двух межгенных районов мтДНК четырех видов байкальских губок показано наличие как одинаковых шпилек у всех губок семейств *Lubomirskiidae*, так и уникальных шпилек у отдельных видов, что может указывать на их неоднократное внедрение в митохондриальный геном байкальских губок в ходе эволюции. Интересно, что у байкальских губок, как и у разных представителей класса *Demospongiae*, большинство вторичных элементов имеют повышенный G+C-состав, который может достигать 100% (Erpenbeck et al., 2009), что также может указывать на преемственность этих структур на высоких таксономических уровнях.

Наличие консервативных по нуклеотидной последовательности и месту локализации шпилек у представителей разных родов байкальских близкородственных губок дает повод предполагать, что они могут нести функциональную нагрузку. Например, подобные шпильки с G+C-кластерами охарактеризованы как сайты рекомбинации у грибов (Raquin et al., 2000).

3.8.2 Вариабельность нуклеотидных последовательностей двух межгенных районов мтДНК губок. Для изучения внутривидовой и межвидовой вариабельности некодирующей мтДНК губок определены нуклеотидные последовательности фрагмента митохондриального генома, включающего два высоко вариабельных участка между генами тРНК-Тур и тРНК-Пе, тРНК-Пе и тРНК-Met. Из 36 полученных нуклеотидных последовательностей 31 принадлежит байкальским эндемичным губкам (*Lubomirskiidae*, 8 видов) и 5 – космополитным губкам (*Spongillidae*, 3 вида). Длина амплифицированных последовательностей варьировала от 400 п.н. у *E. fluviatilis* (*Spongillidae*) до 1000 п.н. у *L. fusifera* (*Lubomirskiidae*), что связано с присутствием множественных делеций/вставок у байкальских

губок. В результате сравнительного и молекулярно-филогенетического анализа последовательностей межгенных спейсеров показано, что их экспансия обусловлена главным образом делециями и вставками, частота появления которых в 4,5 раза превышает скорость накопления одиночных нуклеотидных замен в некодирующей мтДНК. Показано, что делеции/вставки содержат инвертированные повторы и в большинстве случаев являются таксонспецифичными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы впервые определены нуклеотидные последовательности полных митохондриальных геномов представителей трех родов байкальского эндемичного семейства Lubomirskiidae: *Baikalospongia intermedia profundalis*, *Rezinkovia echinata* и *Swartschewska papyracea*. Подробно исследованы особенности организации и эволюции мтДНК байкальских губок, отличающие их от других пресноводных губок. К таким особенностям относятся: протяженность митохондриального генома, обусловленная главным образом экспансией межгенных районов; разная скорость эволюции последовательностей мтДНК. Показано, что нуклеотидная последовательность мтДНК вида *S. papyracea* эволюционирует в два раза быстрее, чем у остальных байкальских видов. В целом же выявлена очень низкая скорость накопления нуклеотидных замен в митохондриальном геноме байкальских губок – около $0,055-0,13 \cdot 10^{-9}$ замен на сайт в год, что в 2,6-9 раз ниже скорости эволюции мтДНК растений и кораллов. Основываясь на палеонтологических данных и дивергенции Lubomirskiidae ~28-30 млн. лет назад определен порядок дивергенции четырех видов.

На примере байкальских эндемичных губок впервые показана быстрая эволюция межгенных спейсеров на близкородственном уровне. Причем обусловлено это главным образом делециями и вставками, частота появления которых в 4,5 раза превышает скорость накопления одиночных нуклеотидных замен в некодирующей мтДНК. Показано, что делеции/вставки несут инвертированные повторы. Поиск и сравнительный анализ инвертированных повторов выявил ряд интересных особенностей. Во-первых, мтДНК байкальских губок обладает необычным для губок большим количеством инвертированных повторов,

способных формировать шпильки. Во-вторых, обнаружена преемственность этих структур не только среди представителей *Lubomirskiidae*, но и с космополитным видом *E. muelleri*. Наибольшее сходство в их распространении и локализации обнаружено у филогенетически наиболее близких видов. В результате подробного сравнительного анализа инвертированных повторов показано, что они могут формировать не только одиночные, но и двойные шпильки, схожие с таковыми у ряда других организмов в мтДНК, где они описаны как мобильные элементы. Механизм распространения инвертированных повторов не ясен. Однако показано, что некоторые двойные шпильки представляют собой псевдоузлы. Это указывает на то, что возможным механизмом распространения повторов может являться внутримолекулярная рекомбинация.

ВЫВОДЫ

1. Байкальские эндемичные губки обладают самым протяженным среди представителей класса *Demospongiae* митохондриальным геномом, что вызвано не изменением в геномном составе, который является консервативным для байкальских губок, а увеличением размеров межгенных районов.

2. Показано, что необычные для мтДНК губок эволюционные преобразования, заключающиеся в быстрой экспансии межгенных районов, происходят в результате внедрения и распространения множества инвертированных последовательностей, подобных мобильным элементам.

3. На основании сравнения полногеномных последовательностей мтДНК показано, что скорость эволюции в разных ветвях байкальских губок существенно различается. Выявлено достоверное ускорение темпов накопления нуклеотидных замен в мтДНК вида *S. papyracea*.

4. На основе палеонтологических данных о дивергенции семейства *Lubomirskiidae* около 30 млн. лет назад вычислена низкая скорость эволюции последовательностей мтДНК губок: около $0,055 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год для видов *R. echinata*, *B. intermedia profunda* и *L. baicalensis*, и около $0,13 \times 10^{-9}$ – для *S. papyracea*.

5. Анализ эволюционной истории семейства *Lubomirskiidae* на основе молекулярно-филогенетических реконструкций показал, что около 12-4,3 млн. лет назад от общего предка байкальских губок

отделился предок современного глубоководного вида *B. intermedia profundalis*. Виды *L. baicalensis* и *R. echinata* образуют молодую кладу, отделившуюся в плиоцене-плейстоцене около 4,8-0,4 млн. лет назад.

6. В результате проведенного молекулярно-филогенетического анализа последовательностей двух межгенных районов митохондриального генома губок впервые показана быстрая эволюция некодирующей мтДНК на близкородственном уровне, обусловленная главным образом вставками и делециями, частота появления которых в 4,5 раза превышает скорость накопления одиночных нуклеотидных замен в межгенных спейсерах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Майкова О.О., Беликов С.И. Некоторые особенности организации митохондриального генома байкальских губок // Вестник ТГУ. 2010. № 341. С. 209-213.

2. Майкова О.О., Ицкович В.Б., Семитуркина Н.А., Калюжная О.В., Беликов С.И. Филогенетическое положение губок озер Чагытай и Торе-Холь // Генетика. 2010. Т. 46, № 12. С. 1471-1478.

3. Майкова О.О., Степнова Г.Н., Беликов С.И. Вариабельность некодирующих последовательностей митохондриальной ДНК губок семейства *Lubomirskiidae* // Доклады академии наук. 2012. Т. 442, № 5. С. 1-3.

4. Lavrov D.V., Maikova O.O., Pett W. and Belikov S.I. Small inverted repeats drive mitochondrial genome evolution in Lake Baikal sponges // GENE. 2012. Vol. 505. P. 91-99.

5. Бурлакова (Майкова) О.О., Калюжная О.В., Ицкович В.Б., Беликов С.И. Определение филогенетического положения губок Тувинской котловины // Биоразнообразии и роль животных в экосистеме: Материалы IV международной научной конференции, Днепропетровский национальный университет. 9–12 октября 2007 г. Изд-во ДНУ. С. 55–56.

6. Бурлакова (Майкова) О.О., Ицкович В.Б., Беликов С.И., Лавров Д.В. Исследование филогенетических отношений пресноводных губок на основе анализа фрагментов митохондриального генома // X съезд Гидробиологического общества при РАН. Тезисы докладов, г. Владивосток. 28 сентября–2 октября 2009 г. Изд-во Дальнаука. С. 56–57.

7. Maikova O., Belikov S. Some features of Baikal sponge mitochondrial genome organization // VIII World Sponge conference. 20-24 september 2010. Spain, Girona. P. 261.

8. Майкова О.О., Беликов С.И. Некоторые особенности организации митохондриального генома байкальских губок // Пятая Верещагинская Байкальская конференция, ЛИН СО РАН. 4-9 октября 2010. Иркутск. Тезисы докладов, С. 77.

9. Lavrov D.V., Burlakova O.O., Itskovich V.B., Weinberg E.V., Belikov, S.I. Baikalian sponges as a model for the study of endemic speciation // Integrative and comparative biology. 2010. Vol. 50. Supplement 1. P. 98.

10. Майкова О.О., Лавров Д.В., Беликов С.И. Митохондриальный геном байкальских губок: структура и филогенетический анализ // II международная научная конференция «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии», ИОЭБ СО РАН. 20-25 июня 2011. Изд-во Бурятского научного центра СО РАН. С. 202-203.

11. Майкова О.О., Лавров Д.В., Беликов С.И. Митохондриальный геном байкальских губок: особенности организации и эволюции // II международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика», Дом ученых СО РАН, 14-17 ноября 2011. Новосибирск. Тезисы докладов. С. 137.

12. Maikova O.O., Belikov S.I. Mitochondrial genome evolution of Baikal sponges (Lubomirskiidae) // Contributions to the 3rd Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics (MolPhy-3)», Moscow, 2012. P. 24