

Изучение филогенетических связей пресноводных губок Байкала методом анализа структур гена 18S рРНК

В. Б. ИЦКОВИЧ*, С. И. БЕЛИКОВ*, С. М. ЕФРЕМОВА**, Й. МАСУДА***

*Лимнологический институт СО РАН
Иркутск, Россия

**Биологический институт Санкт-Петербургского государственного университета
Санкт-Петербург, Россия

***Медицинская школа Кавасаки
Окаяма, Япония

АННОТАЦИЯ

Определены последовательности фрагмента гена 18S рРНК 6 родов пресноводных губок, встречающихся в оз. Байкал. Отсутствие отличий во фрагменте длиной 630 пар оснований у родов *Ephydatia*, *Lubomirskia* и *Baikalospongia* указывает на вероятность их близкого родства. Согласно полученным данным, семейства Spongillidae и Lubomirskiidae являются близкородственными.

Фауна губок оз. Байкал представлена двумя семействами: эндемичным Lubomirskiidae (Rezvoy) и космополитным Spongillidae (Gray). Эндемичное семейство Lubomirskiidae включает более 10 видов, относящихся к 3 родам: *Lubomirskia* (Dybowski), *Baikalospongia* (Annandale) и *Swartschewskia* (Makuschok). Несмотря на длительное изучение, филогенетические отношения внутри семейства и его связи с космополитным семейством Spongillidae остаются невыясненными. Так, В. Дыбовский [1], Б. А. Сварчевский [2], Н. Энандль [3] и П. Д. Резвой [4] считали, что любомирскииды произошли от морских губок, и не связывали их происхождение с космополитным семейством пресноводных губок Spongillidae. Эта гипотеза основана на наличии у любомирскиид существенных морфологических особен-

ностей, таких как отсутствие геммул, более прочный кремнеугольный скелет и особое строение водоносной системы. Более поздние палеонтологические исследования Г. Г. Мартинсона [5] привели к появлению гипотезы о том, что Lubomirskiidae являются потомками мезолимнической фауны, тогда как Spongillidae, по его мнению, относятся к обычной палеолимнической, сформировавшейся значительно раньше. Однако последние сравнительно-морфологические данные [6, 7], а также наши данные по анализу структур генов рРНК [8] указывают на близкое родство между Spongillidae и Lubomirskiidae. Анализ последовательностей 18S рДНК уже применялся в работах, связанных с систематикой и филогенией некоторых морских семейств [9–11]. В настоящей работе представлены результаты определения первичных струк-

Вид	Место сбора	Глубина, м
Сем. Lubomirskiidae		
<i>Lubomirskia abietina</i> (Swarzewsky)	Бухта Варначка, Байкал	13,5
<i>Swartschewskia papyracea</i> (Dybowski)	Пос. Листвянка, Байкал	18
<i>Baikalospongia bacillifera</i> (Dybowski)	Бухта Варначка, Байкал	13,5
Сем. Spongillidae		
<i>Spongilla lacustris</i> (L.)	Мыс Тойник, Байкал	0,5
<i>Ephydatia muelleri</i> (Lieberkuhn)	Там же	3
<i>Eunapius</i> sp. (Gray)	Мыс Мужинай, Байкал	0,5
Сем. Halichondriidae		
<i>Halichondria japonica</i> (Kadota)	Тамано, Окаяма, Япония	3

тур генов 18S рРНК шести родов пресноводных губок и обсуждаются их филогенетические связи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор губок проводился при помощи водолазов или вручную на малой глубине. Место сбора указано в таблице. Проанализировано по 2 образца каждого вида губок.

Каждую губку фотографировали и описывали условия обитания. Часть образца фиксировалась в спирте для дальнейшей идентификации.

Суммарную ДНК выделяли из светлой незаселенной симбионтами внутренней части живой губки с помощью наиболее подходящего для полевых условий метода выделения ДНК с использованием цетилтриметиламмоний бромида [12].

Выбор праймеров осуществляли путем сравнения структур генов 18S рРНК морских губок, полученных из GenBank, и выявления консервативных последовательностей. Так как внутри губок обитает большое количество симбиотических бактерий и водорослей, в элаймент были взяты также структуры генов рРНК водорослей. Кроме того, в амплифицируемый фрагмент включали V4 регион рРНК, отсутствующий у прокариот. Синтез праймеров проводился Н-фосфонатным методом.

Два перекрывающихся фрагмента общей длиной 630 п.н. были амплифицированы с помощью ПЦР с праймерами:

R1 5'- TAAAAAGCTCGTAGTTGGAT-3';

R2 5'- GTAGTGGCCTACCATGGTTGC-3';

L1 5'- GGACTACGACGGTATCTGAT-3';

L2 5'- СТААТТТТТТТCAAAGTAAACGTCCCGA-3'

Амплификационная смесь объемом 25 мкл содержала: 10 × ПЦР буфер (Promega) – 2,5 мкл, Mg (25 мМ) – 3 мкл, праймеры (10 пкмол/мкл) по 0,5 мкл, НТФ – 1 мкл, ДНК – 1 мкл, Taq полимеразы (Promega) – 0,2 мкл, бидистиллированная H₂O – до 25 мкл. Параметры амплификации: первичная денатурация 94 °С – 2 мин, затем 40 циклов в режиме – 94 °С – 1 мин, 45 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин с последующей выдержкой при 72 °С в течение 8 мин. Реакцию амплификации проводили параллельно в шести пробирках по 25 мкл, очистку наработанного ПЦР-продукта проводили электрофорезом в легкоплавкой агарозе. Секвенирование проводили по двум цепям с использованием fmoI DNA Sequencing System (Promega) и альфа [33] dATP согласно протоколу. Полученные структуры были элайментированы с помощью пакета программ GeneTools [13]. Для построения филогенетических деревьев использованы пакеты филогенетических программ PHYLIP [14] и TREECONW [15]. Структура гена губки *H. japonica* была использована как аутгруппа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структуры фрагментов генов 18S rRNA представлены на рис. 1 в виде элаймента. Из рисунка видно, что отличия в первичной структуре гена у всех проанализированных образцов незначительны, исключение составляет лишь структура морской губки *H. japonica*.

На рис. 2 представлено филогенетическое дерево, полученное neighbor-joining анализом последовательностей. Анализ методом Parsytopu дает сходную топологию и поэтому не

Lubomirskia CCGGTGACGGAGAATTGGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACAT
Swartshewskia
Spongilla
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius
Halichondria A

Lubomirskia CCAAGGAAGGCAGCAGGCAGCGCAAATTACCCAATCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACAATA
Swartshewskia
Spongilla
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius
Halichondria

Lubomirskia AATAACAATGCCGGGCTATCTTTAGTCTGGCAATTGGAATGAGAACAATGTAATACCTT
Swartshewskia C
Spongilla
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius T
Halichondria - G T C C

Lubomirskia AACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAAT
Swartshewskia
Spongilla
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius
Halichondria

Lubomirskia AGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGGATTCGGGGCAGGAGGTC
Swartshewskia
Spongilla
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius
Halichondria TG . CCT . C .

Lubomirskia CCGTCCGCCGAAAGGTAGGTACTGGACGCCAGCCCTTTTCTCGAAGGCCCATCTGCTC
Swartshewskia
Spongilla T C G
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius C G
Halichondria T -- GA T . AG . C CC A GA

Lubomirskia TTCACTG-AGTGGTAGGGGAGTTCGGGACGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTCAAGG
Swartshewskia
Spongilla . T
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius T
Halichondria T C T

Lubomirskia **CAGGCCGTCGCTTGAATACGTTAGCATGGAATAATGGAATAGGACTTCGGTTCATTTTCG**
Swartshewskia
Spongilla
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius
Halichondria **TA** **C** **A** **G** **C** - **T**

Lubomirskia **TTGGTTTCTGGGACCGAAGTAATGATTAAGAGGGACAGTTGGGGCATTTCGTATTCAATT**
Swartshewskia
Spongilla
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius
Halichondria **A** **G** **TT** ---

Lubomirskia **GTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGGAAGACGAACAACCTGCCAAAGCATTTCCCAAGG**
Swartshewskia **C**
Spongilla **C**
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius
Halichondria --- **A** **T** **G**

Lubomirskia **ATGTTTTCATT**
Swartshewskia
Spongilla
Ephydatia
Baikalospongia
Eunapius
Halichondria

Рис. 1. Элаймент фрагментов 18S рРНК байкальских губок. Номера GenBank AF058947, AF058948, AF058945, AF058949, AF101237, AF101238, AF058946.

приводится. Видно, что все исследованные пресноводные губки давно отделились от морской губки *H. japonica*, что, таким образом, отвергает гипотезы о близости семейства Lubomirskiidae морским губкам. В то же время группа пресноводных губок разделяется с высокой бутстреп-поддержкой (100 %) на два кластера: кластер, в который входят типичные представители космополитного семейства Spongillidae: *S. lacustris* и *Eunapius* sp., и кластер, в который входят представители эндемичного семейства Lubomirskiidae: *S. papyracea*, *B. bacillifera*, *L. abietina*, и одна губка из семейства Spongillidae – *E. muelleri*. Ветвление внутри кластеров разрешено недостаточно, что отражено низкой бутстреп-поддержкой (43–57 %), хотя при любых анализах ветвь *Swartschewskia* отделяется от тесного кластера, состоящего из *Ephydatia*, *Lubomirskia* и *Baikalospongia*. Данный

факт подтверждается также значительными отличиями в экологии и морфологии этого вида. Губки рода *Swartschewskia* встречаются на отрицательных склонах в местах, отличающихся малым количеством света, и практически никогда не имеют в качестве симбионтов зеленые водоросли, в отличие от представителей родов *Lubomirskia* и *Baikalospongia*. Спикулы этой губки имеют характерную форму коротких и толстых стронгилей, и она является единственным из байкальских видов, идентификация которого по спикулам не вызывает затруднений. Интересным является расположение типичной спонгиллиды *Ephydatia muelleri* в кластере, состоящем из эндемичных байкальских губок. *E. muelleri* является типичным представителем космополитного семейства Spongillidae, отличающимся характерным для спонгиллид строением скелета и формой спикул. Некоторые

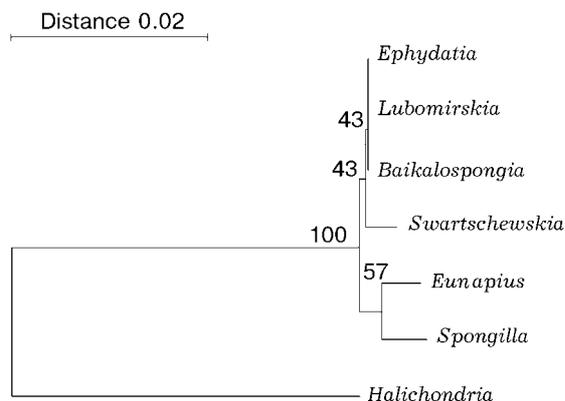


Рис. 2. Филогенетическое древо, полученное neighbor-joining анализом на основе фрагментов 18S рРНК байкальских губок. Структура *Halichondria* использовалась как аутгруппа.

морфологические особенности рода *Ephydatia* также могут указывать на близкое его родство с байкальскими губками. Так, известно, что все представители семейства Lubomirskiidae не имеют геммул и микросклер, род *Ephydatia* также характеризуется отсутствием паренхимных микросклер [4]. Описаны формы *Ephydatia* с недоразвитием геммульных оболочек [4], обнаружены они и в открытом Байкале [7].

Полученные результаты показывают, что 18S рРНК недостаточно информативна для анализа филогенетических связей между родами данных пресноводных семейств. Но, так как в сборах имеются формы, требующие расшифровки своего таксономического положения, а некоторые из них даже заслуживают статуса

новых видов [7], актуальной является проблема видовой идентификации. Ввиду отсутствия внутривидового полиморфизма по 18S рРНК анализ последовательностей этого гена может быть полезен для этой цели.

Проведенные исследования частично финансировались за счет гранта РФФИ 97-04-96172.

ЛИТЕРАТУРА

1. W. Dybowski, *Studien über die Spongien des Russischen Reiches. Mem. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg*, 1882, 7 (16), 6, 1–71.
2. Б. А. Сварчевский, *Труды Иркутского отд-ния О-ва естествоисп. СССР*, 1923, 1:1, 329–352.
3. N. Annandale, *St. Petersburg. Ann. Mus. Zool. Acad. Sc.*, St. Petersburg, 1913, 18–101.
4. П. Д. Резвой, *Фауна СССР*, М.; Л., 1936, 2, 1–125.
5. Г. Г. Мартинсон, *Докл. АН СССР*, 1958, 120:5, 1155–1158.
6. С. М. Ефремова, *Морфогенезы у губок*, Л., Изд-во ЛГУ, 1981.
7. С. М. Ефремова, *Байкал – природная лаборатория для исследований изменений окружающей среды и климата.*: Тез. докл., Иркутск, 1994.
8. V. B. Itskovich, S. I. Belikov, S. M. Efremova, et al., 5th International Sponge Symposium, Queensland Museum, Brisbane, Australia, 1998, 29–30.
9. B. Lafay, N. Boury-Esnault, J. Vacelet, et al., *Biosystems*, 1992, 28, 139–151.
10. L. West, D. Powers, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1993, 2, 71–75.
11. M. Kelly-Borges, S. Pomponi, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1994, 3, 87–103.
12. S. Gustincich, G. Manfioletti, G. Del Sal, et al., *Biotechniques*, 1991, 11:3, 298–300, 302.
13. S. M. Resenchuk, *Gene Tools*, 1991, V. 1.0.
14. J. Felsenstein, *PHYLIP*, 1995, V. 3.5 c.
15. Y. Van de Peer, *TREECONW*, 1996, V. 1.2.

Studies of Phylogenetic Relations of Fresh-water Sponges of Baikal by the Method 18S Gene rRNA Structure Analysis

V. B. ITZKOVICH, S. I. BELIKOV, S. M. EFREMOVA, Y. MASUDA

Sequences of 18S gene rRNA from 6 genera of fresh-water sponges inhabiting Lake Baikal have been determined. The absence of differences in a 630 base pair long fragment between the genera *Ephydatia*, *Lubomirskia* and *Baikalospongia* suggests the probability of their close kinship. According to the data obtained, the families Spongillidae and Lubomirskiidae are closely related.