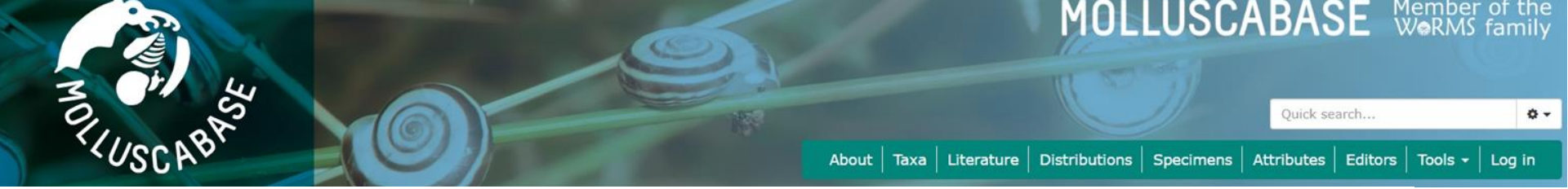
Отчет по молекулярной практике

Подготовили студенты 3 курса кафедры иммунологии

Thyasira spp.
и сложности их определения

Елизавета Заика
Даниил Кашин
Ольга Кин
Наталья Комарова
Николай Осовских



Thyasira plana (A. E. Verrill & K. J. Bush, 1898)

AphiaID 1759862 (urn:lsid:marinespecies.org:taxname:1759862)

Classification Biota > Animalia (Kingdom) > Mollusca (Phylum) > Bivalvia (Class) > Autobranchia (Subclass) > Heteroconchia (Infraclass) > Euheterodonta (Subterclass) > Imparidentia (Superorder) > Lucinida (Order) > Thyasiroidea (Superfamily) > Thyasiridae (Family) > *Thyasira* (Genus) > *Thyasira plana* (Species)

Status unaccepted > junior subjective synonym

Accepted name *Thyasira gouldii* (R. A. Philippi, 1845)

Huber M. (2015)

Thyasira perplicata C. Salas, 1996

AphiaID 141669 (urn:lsid:marinespecies.org:taxname:141669)

Classification Biota > Animalia (Kingdom) > Mollusca (Phylum) > Bivalvia (Class) > Autobranchia (Subclass) > Heteroconchia (Infraclass) > Euheterodonta (Subterclass) > Imparidentia (Superorder) > Lucinida (Order) > Thyasiroidea (Superfamily) > Thyasiridae (Family) > *Thyasira* (Genus) > *Thyasira perplicata* (Species)

Status unaccepted (original combination)

Accepted name *Channelaxinus perplicatus* (C. Salas, 1996)

IRMNG name details

Thyasira insignis (Verrill & Bush, 1898)

IRMNG_ID 11273169 (urn:lsid:irmng.org:taxname:11273169)

Classification Biota > Animalia (Kingdom) > Mollusca (Phylum) > Bivalvia (Class) > Venerida (Order) > Thyasiridae (Family) > *Thyasira* (Genus) > *Thyasira insignis* (Species)

Status unaccepted

Accepted name *Thyasira flexuosa* (Montagu, 1803)

Cat. of Life (2006)

Цель: проверить достоверность определения особей *Thyasira* spp. из музейной коллекции ББС МГУ

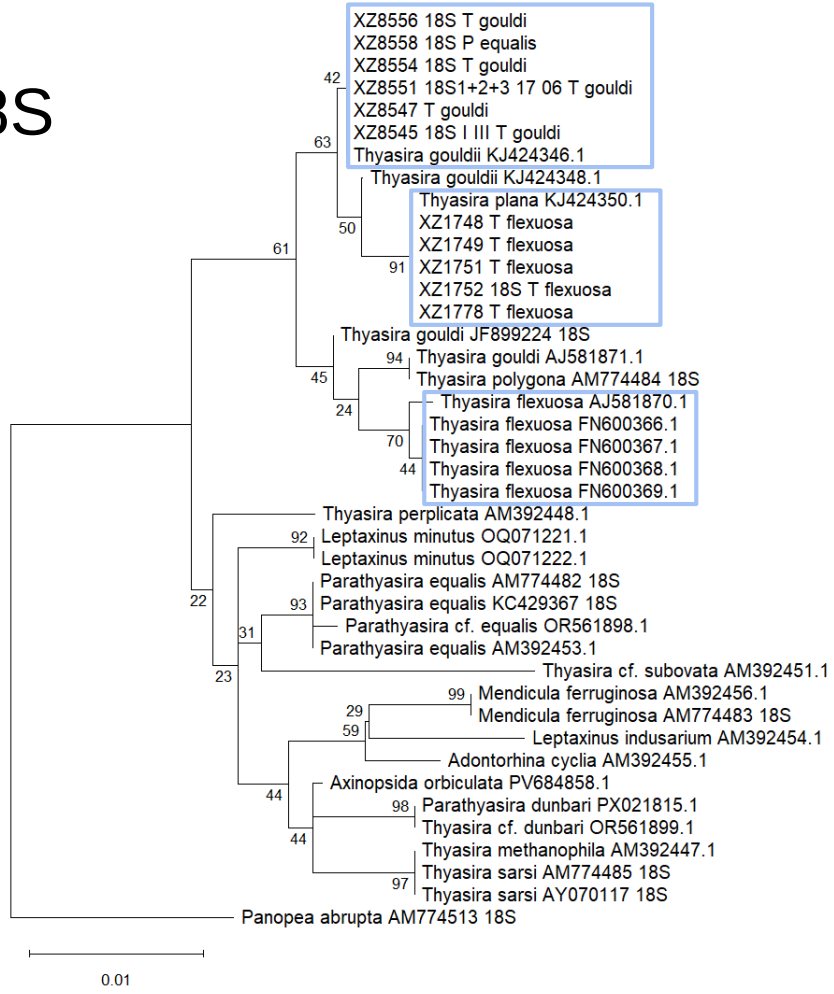
Задачи:

- выделить ДНК из музейных образцов;
- провести секвенирование по Сенгеру генов COI, 18S и 28S рРНК;
- по полученным последовательностям и сходным последовательностям из GenBank методом Maximum-likelihood построить филогенетические деревья;
- на основе секвенированных последовательностей гена COI и сходных последовательностей этого гена из GenBank построить гаплосеть.

Баркодинг - XZ	Вид, определенный по морфологическим данным	Место сбора	18S	28S	COI
8550	*Parathyasira equalis*	Белое море, Кандалакшский залив			
8558	*Parathyasira equalis*	Белое море, Кандалакшский залив	+	+	+
8543	*Parathyasira equalis*	Белое море, Кандалакшский залив		+	
8541	*Parathyasira equalis*	Белое море, Кандалакшский залив		+	
8540	*Parathyasira equalis*	Белое море, Кандалакшский залив		+	+
1748	*Thyasira flexuosa*	Карское море, Енисейский залив	+		+
1749	*Thyasira flexuosa*	Карское море, Енисейский залив	+		+
1751	*Thyasira flexuosa*	Карское море, Енисейский залив	+		
1752	*Thyasira flexuosa*	Карское море, Енисейский залив	+		+
1778	*Thyasira flexuosa*	Карское море, Енисейский залив	+		+
8547	*Thyasira gouldi*	Белое море, Онежский залив	+	+	
8545	*Thyasira gouldi*	Белое море, Кандалакшский залив		+	
8554	*Thyasira gouldi*	Белое море, Кандалакшский залив	+		
8544	*Thyasira gouldi*	Белое море, Кандалакшский залив		+	
8552	*Thyasira gouldi*	Белое море, Кандалакшский залив		+	+
8553	*Thyasira gouldi*	Белое море, Кандалакшский залив		+	
8548	*Thyasira gouldi*	горло Белого моря		+	+
8549	*Thyasira gouldi*	Белое море, Онежский залив			+
8555	*Thyasira gouldi*	Белое море, Кандалакшский залив			+
8559	*Thyasira gouldi*	Белое море, Кандалакшский залив			
8551	*Thyasira gouldi*	Белое море, Двинский залив	+		
8556	*Thyasira gouldi*	Белое море, Кандалакшский залив	+		
8557	*Thyasira gouldi*	Белое море, Кандалакшский залив		+	+
5809	*Thyasira sarsii*	Печорское море, территория острова Матвеев		+	+
5810	*Thyasira sarsii*	Печорское море, территория острова Матвеев			+

Номер образца	Вид, определенный по морфологическим данным	Место сбора
D13	*Thyasira gouldi*	Обь-Енисейское мелководье
D14	*Thyasira gouldi*	Обь-Енисейское мелководье
D15	*Thyasira gouldi*	Обь-Енисейское мелководье
D16	*Thyasira gouldi*	Енисей
D17	*Thyasira gouldi*	Енисей
D18	*Thyasira gouldi*	Енисей
D19	*Thyasira gouldi*	Юг Новой Земли
D20	*Thyasira gouldi*	Юг Новой Земли
D22	*Thyasira gouldi*	Баренцево море у Карских ворот
D23	*Thyasira gouldi*	Обь
T1	*Thyasira gouldi*	Восточно-Сибирское море, Индигирский разрез
T2	*Thyasira gouldi*	Восточно-Сибирское море, Индигирский разрез
T4	*Thyasira gouldi*	Восточно-Сибирское море, Колыма
T5	*Thyasira gouldi*	море Лаптевых
T6	*Thyasira gouldi*	море Лаптевых
T7	*Thyasira gouldi*	море Лаптевых
T8	*Thyasira gouldi*	море Лаптевых
T9	*Thyasira gouldi*	море Лаптевых
T11	*Thyasira gouldi*	море Лаптевых
T12	*Thyasira dunbari*	море Лаптевых
T26	*Thyasira gouldi*	море Лаптевых
T29	*Thyasira gouldi*	Карское море
T30	*Thyasira gouldi*	Обь
T31	*Thyasira gouldi*	Карское море
T32	*Thyasira gouldi*	Карское море

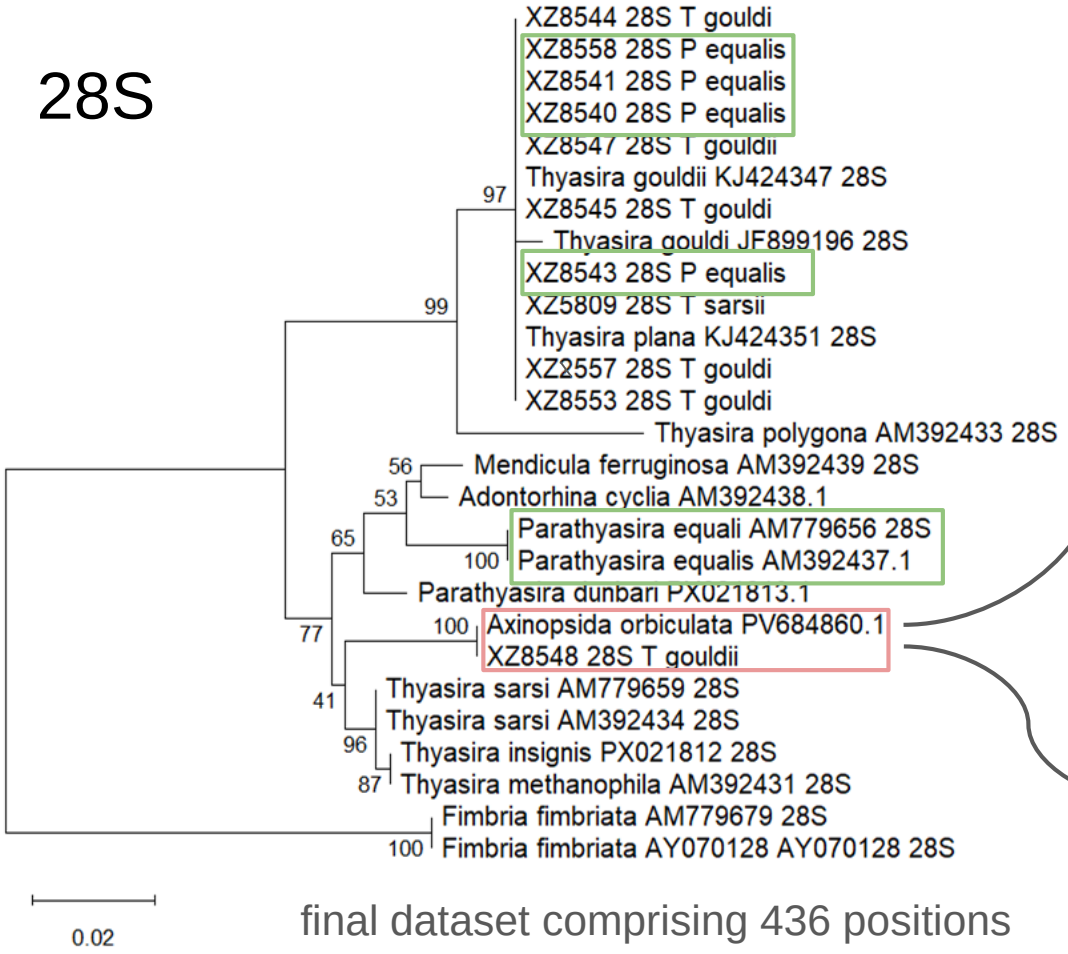
18S



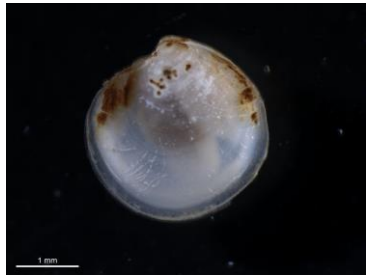
Среди наших образцов
T. flexuosa не было…

final dataset comprising 720 positions

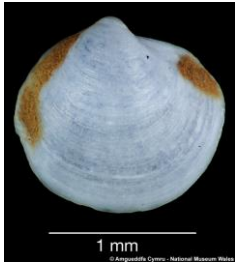
28S



final dataset comprising 436 positions

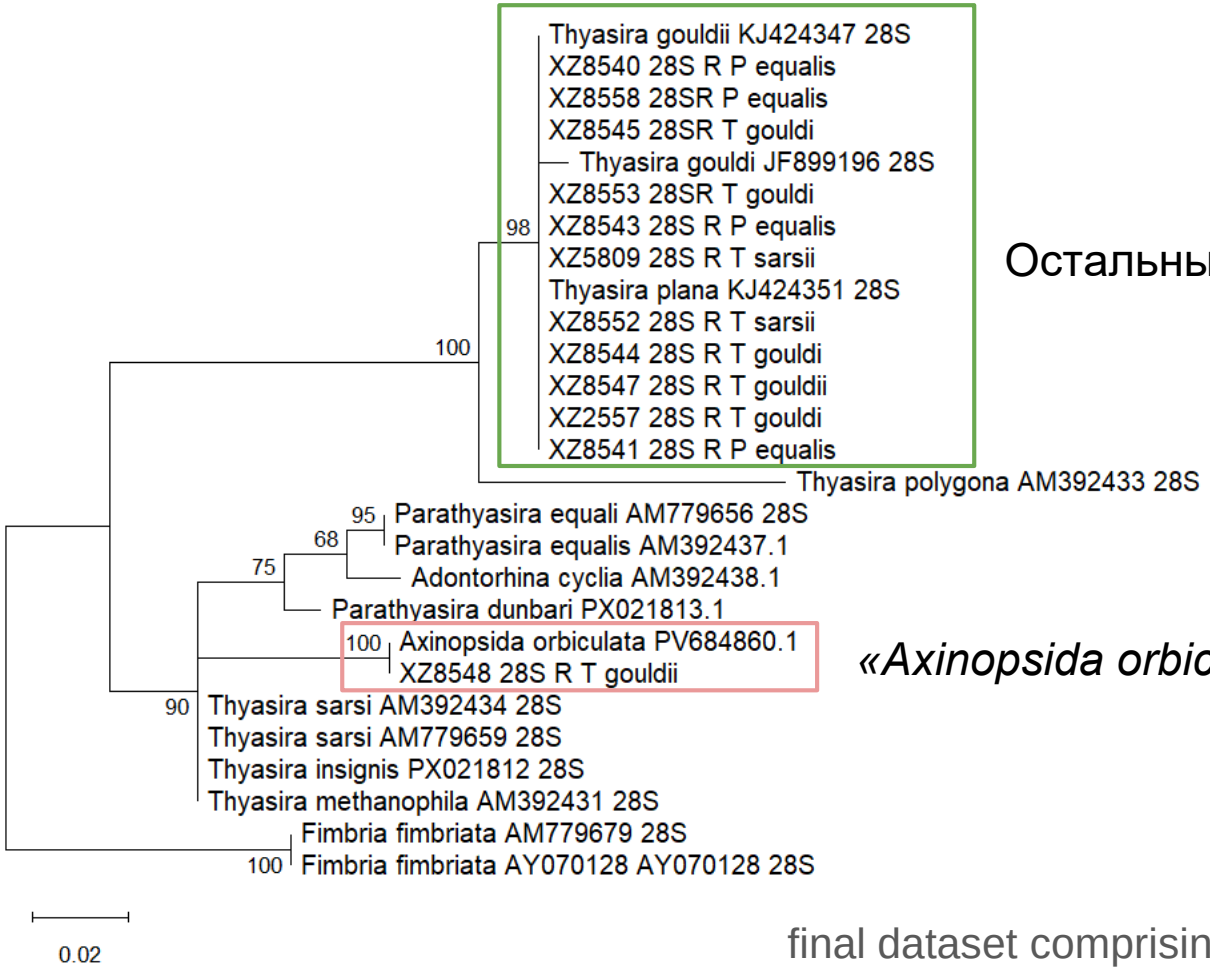


Thyasira gouldi



Thyasira gouldi (Philippi, 1845)

28_R

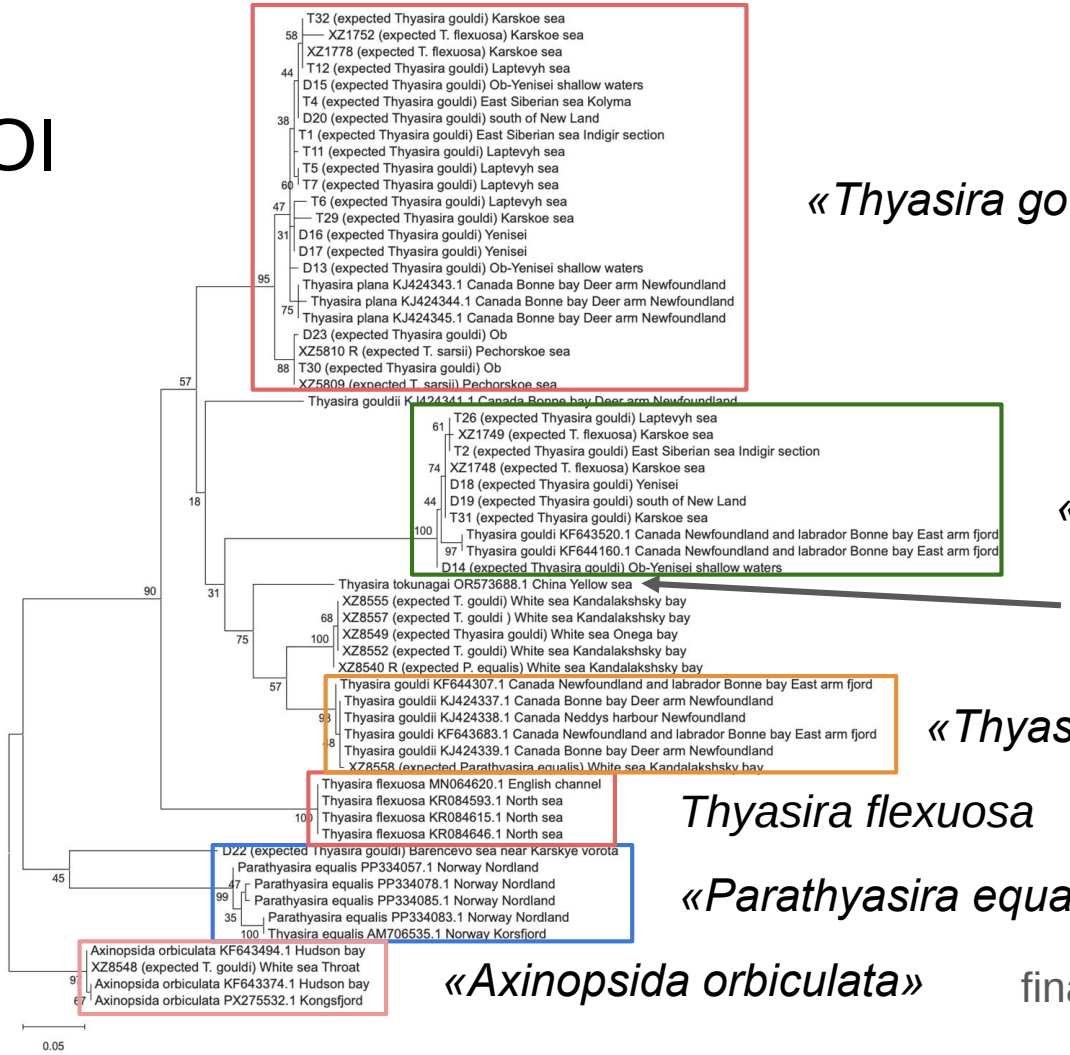


Остальные образцы

«Axinopsida orbiculata»

final dataset comprising 158 positions

COI



«Thyasira gouldi 1»

«Thyasira gouldi 2»

Thyasira tokunagami

«Thyasira gouldi 3»

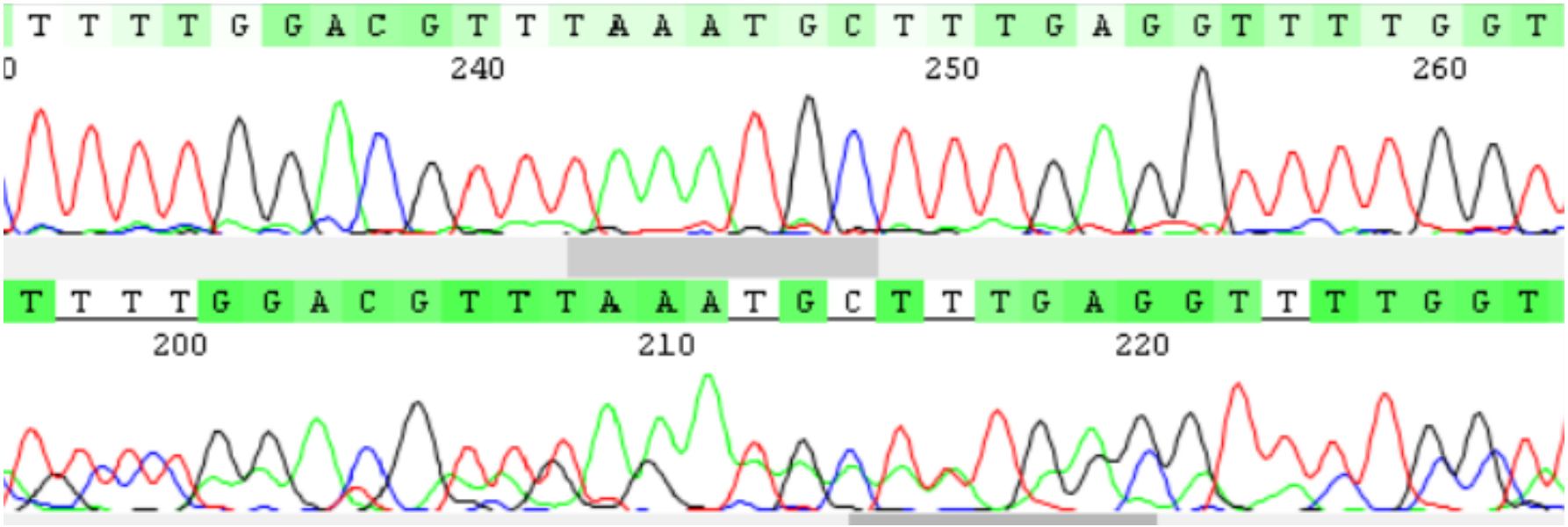
Thyasira flexuosa

«Parathyasira equalis»

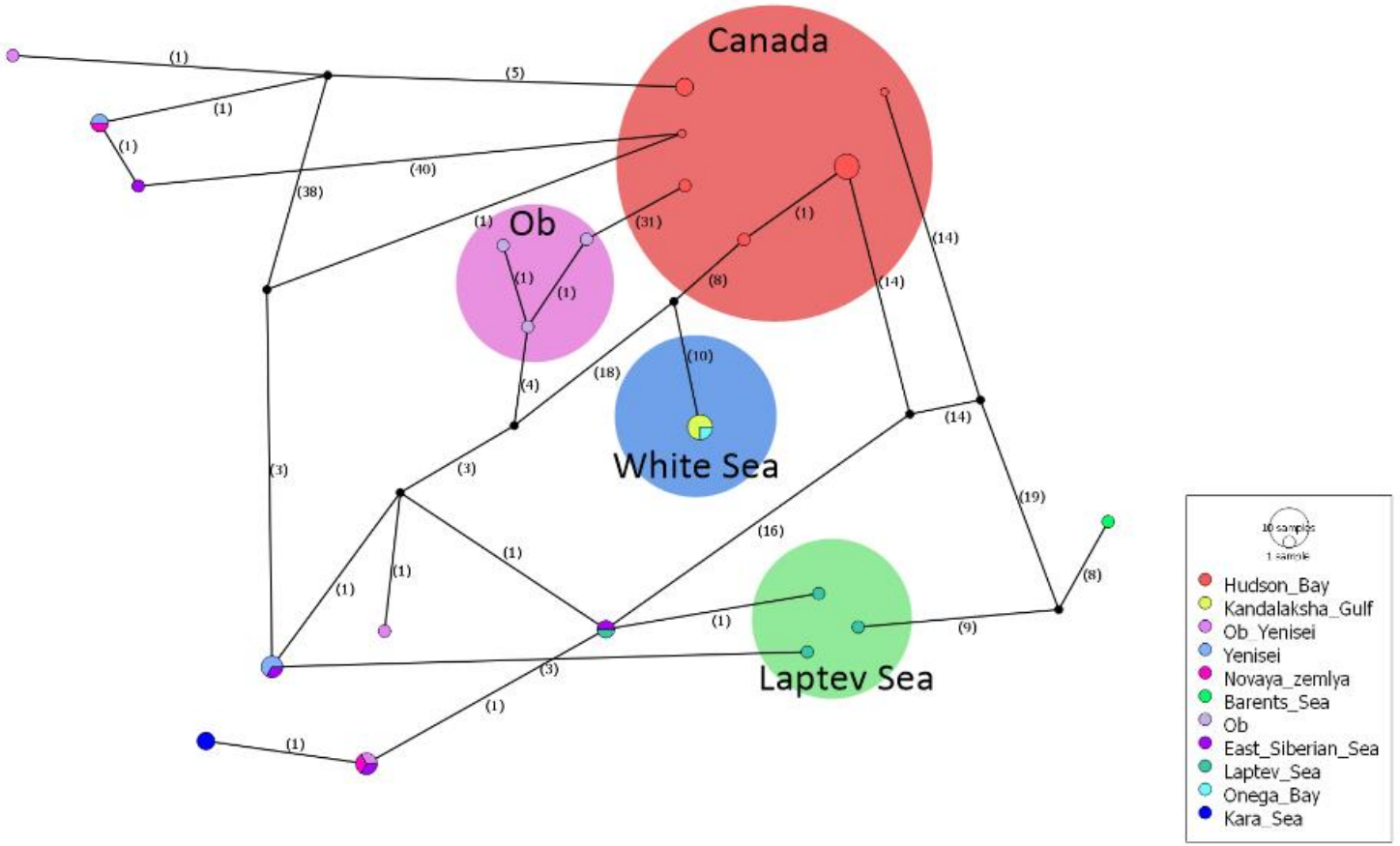
«Axinopsida orbiculata»

final dataset comprising 321 positions

Двуродительское наследование/псевдоген?



Гаплосеть, построенная по последовательности гена COI



Выводы

- Мы определили последовательности генов COI, 18S и 28S рРНК некоторых исследованных образцов.
- Среди секвенированных образцов есть генетически близкие к *T. gouldi*, некоторые из них ошибочно отнесены к другому виду или роду.
- Среди секвенированных образцов нет *T. flexuosa.*
- Один из секвенированных образцов близок к *A. orbiculata* по последовательностям генов COI и 28S рРНК.
- Во всех образцах, секвенированных нашей группой по гену COI, на хроматограммах имеются накладывающиеся пики. Это может быть связано с двуродительским наследованием митохондрий.

Crangon crangon

Цели и задачи

Цель: проверить утверждение о том, что *Crangon crangon* - вид-космополит, обитающий как в Белом, так и в Черном морях

Задачи:

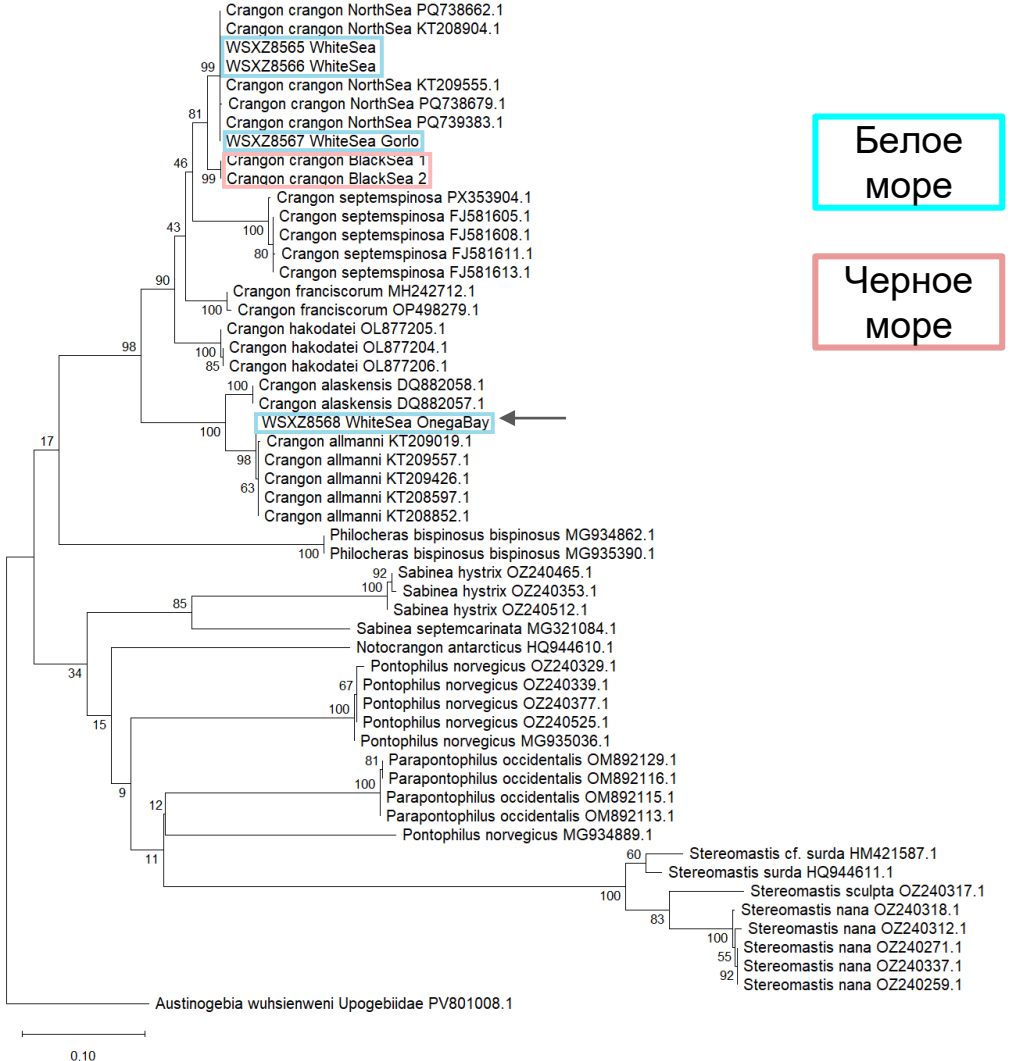
1) методом секвенирования по Сэнгеру получить последовательности генов *18S, 28S, H3, COI* беломорского *C.crangon*

2) оценить филогенетическое положение беломорского *C. crangon* по данным генам относительно представителей из Черного моря

3) выявить различия между гаплотипами представителей *C. crangon* северных и южных морей

Субъединица I цитохром-оксидазы (*COI*)

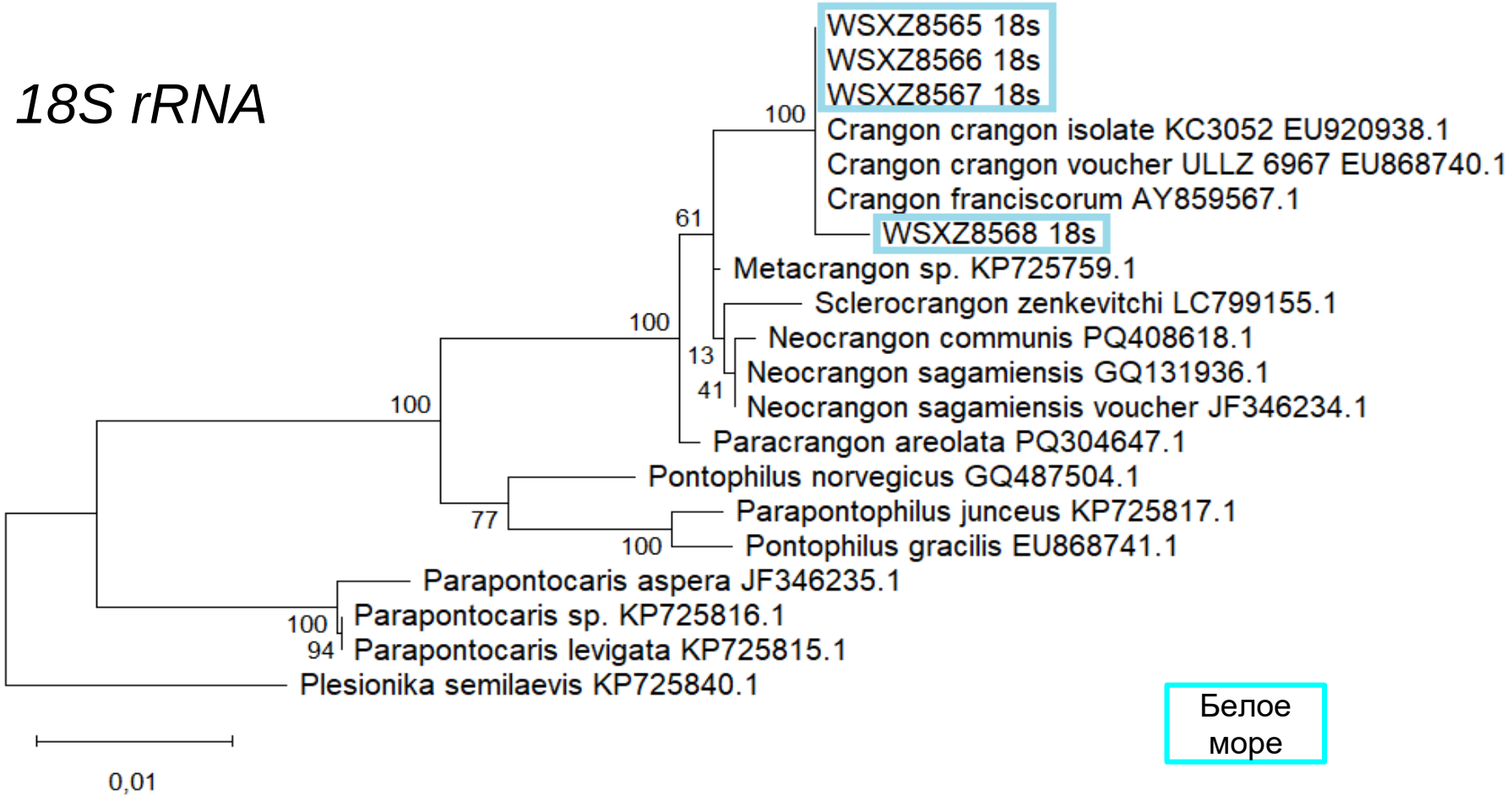
Окончательный набор данных, содержащий 498 позиций



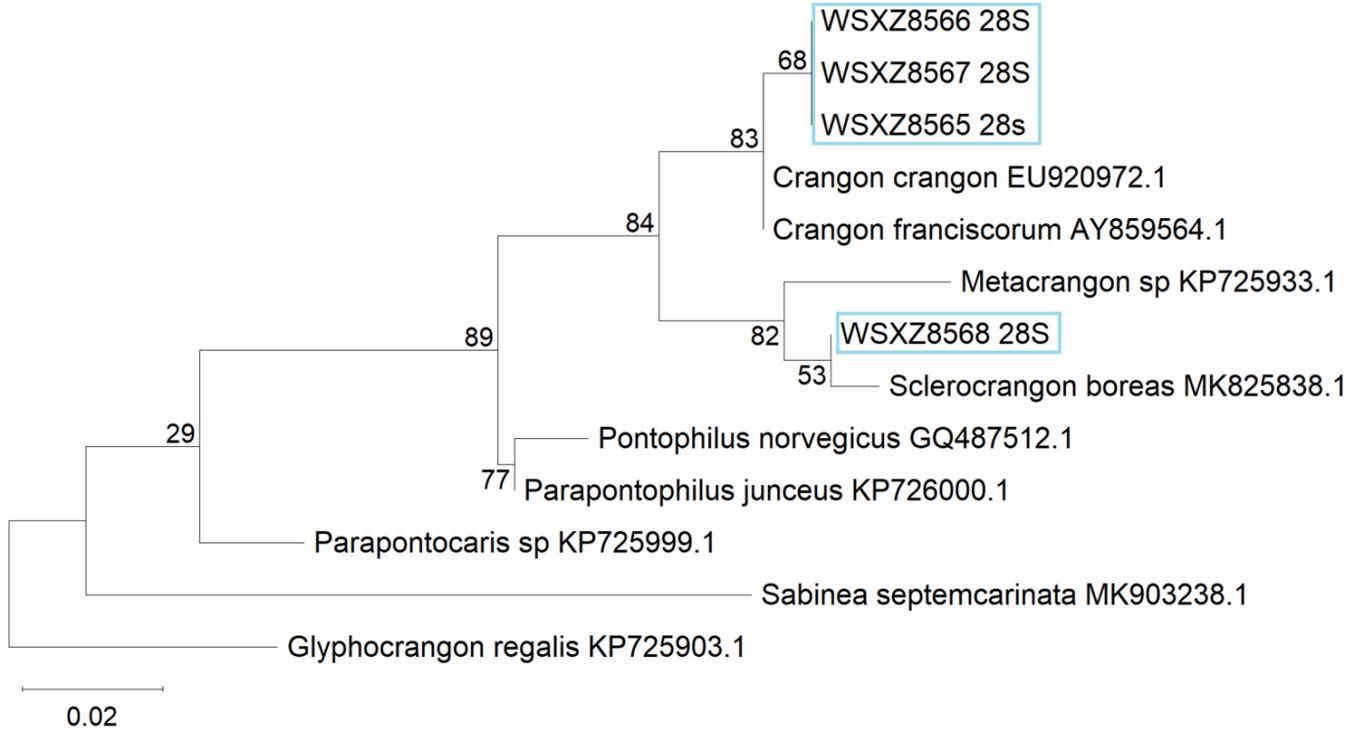
Белое море

Черное море

18S rRNA


WSXZ8565 18s
WSXZ8566 18s
WSXZ8567 18s
Crangon crangon isolate KC3052 EU920938.1
Crangon crangon voucher ULLZ 6967 EU868740.1
Crangon franciscorum AY859567.1
WSXZ8568 18s
Metacrangon sp. KP725759.1
Sclerocrangon zenkevitchi LC799155.1
Neocrangon communis PQ408618.1
Neocrangon sagamiensis GQ131936.1
Neocrangon sagamiensis voucher JF346234.1
Paracrangon areolata PQ304647.1
Pontophilus norvegicus GQ487504.1
Parapontophilus junceus KP725817.1
Pontophilus gracilis EU868741.1
Parapontocaris aspera JF346235.1
Parapontocaris sp. KP725816.1
Parapontocaris levigata KP725815.1
Plesionika semilaevis KP725840.1
100
61
100
13
41
100
77
100
100
94
0,01
Белое море

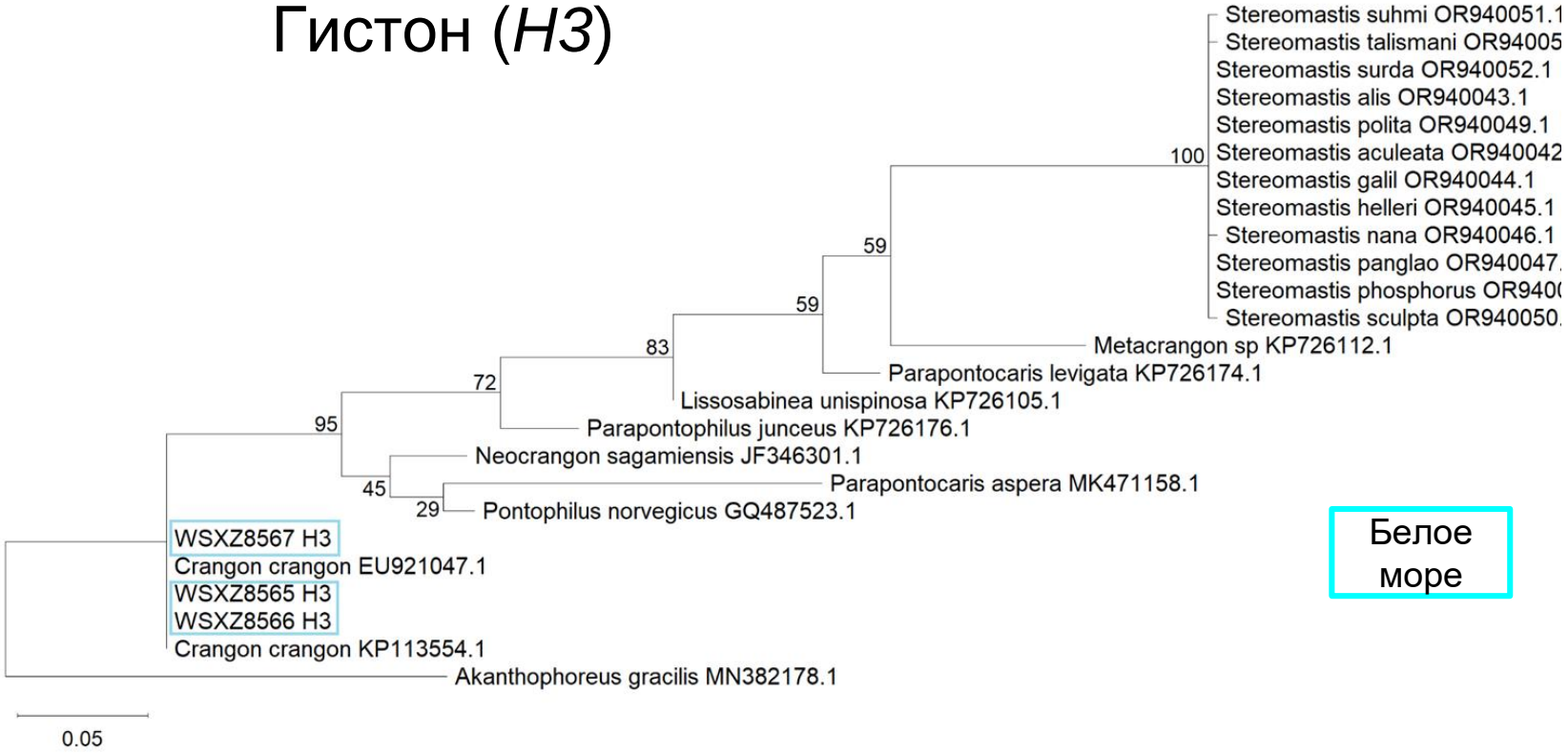
28S rRNA



Белое море

Окончательный набор данных, содержащий 295 позиций

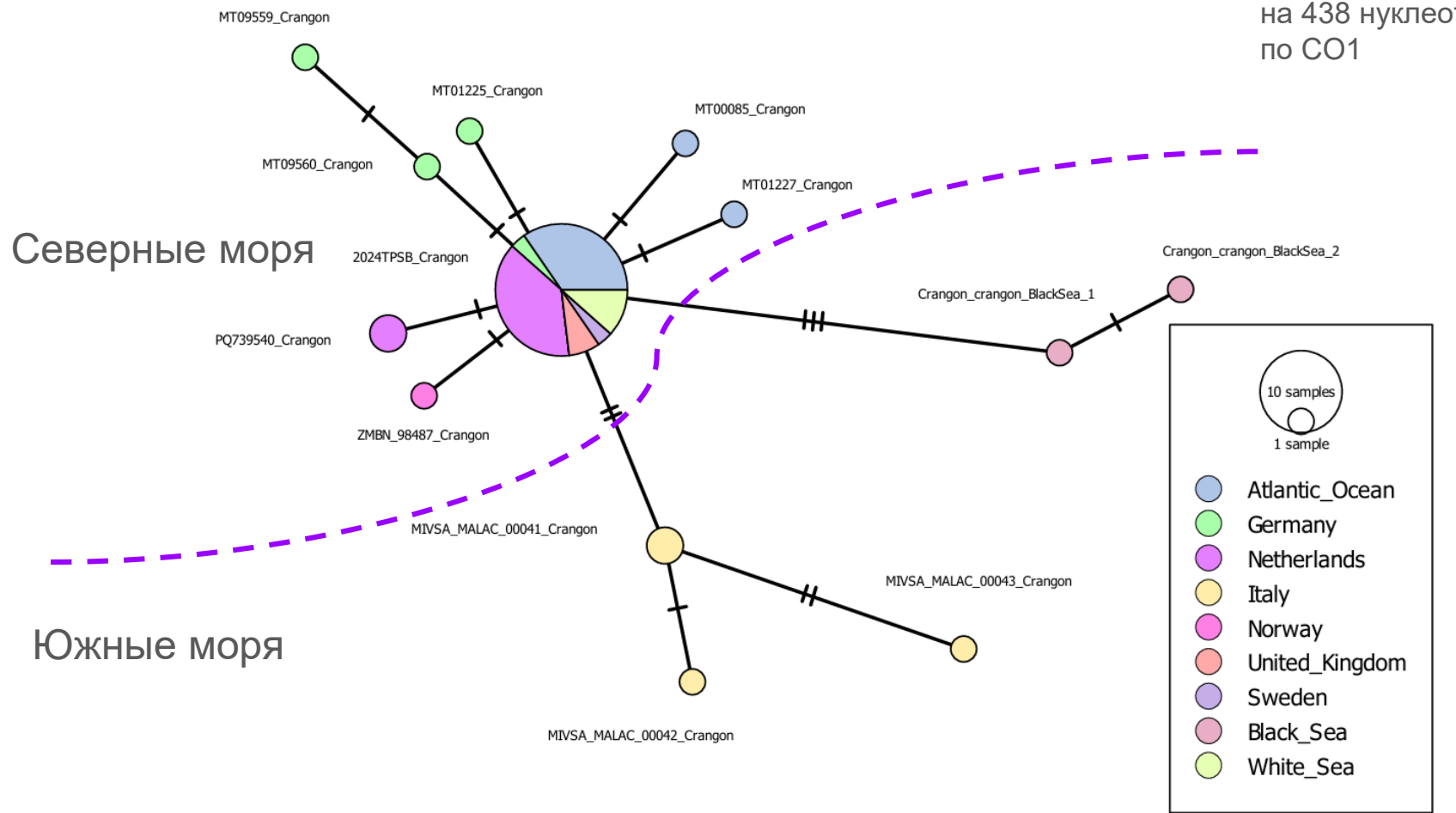
Гистон (*H3*)



Окончательный набор данных, содержащий 295 позиций

Сеть гаплотипов *Crangon crangon*

на 438 нуклеотидов
по CO1



Выводы

1) Получены последовательности генов *18S, 28S, H3, COI* четырех образцов беломорского *C.crangon*
2) Все беломорские образцы, кроме XZ8568, оказались идентичны по последовательностям всех четырех генов. Образец XZ8568 оказался отличным по последовательностям генов *18S, 28S, COI* (последовательность гена *H3* получить не удалось).
3) Филогенетический анализ последовательностей генов *18S, 28S, H3, COI* продемонстрировал расхождение популяций Белого и Черного морей
4) В ходе анализа гаплотипов выявлено наличие генетических различий популяций *C.crangon* в северных и южных морях

Dorvillea kastjani

Dorvillea rubrovittata Photo: Arne Nygren CC-BY-SA-NC

Семейство Dorvilleidae

Ophryotrocha longidentata, photo by Arne Nygren/Sjøfartsmuseet Akvariet Gøteborg

Parougia eliasoni, photo by Arne Nygren/Sjøfartsmuse et Akvariet Gøteborg

Dorvillea rubrovittata

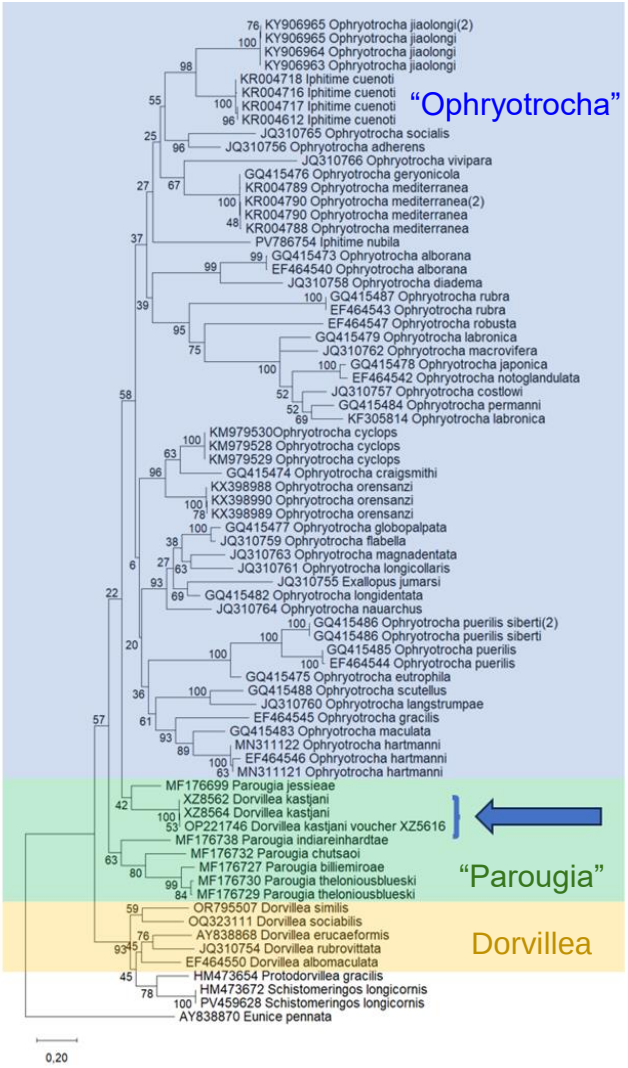
Цель и задачи

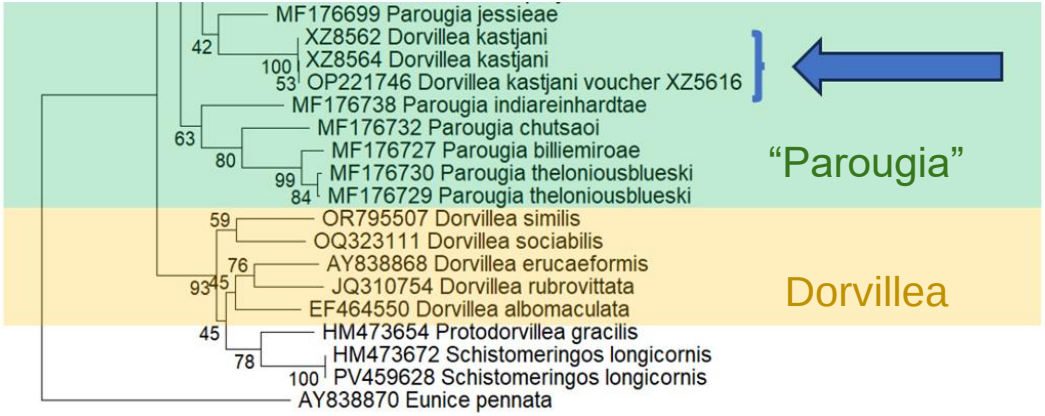
Цель: определить филогенетическое положение вида *Dorvillea kastjani* в семействе Dorvilleidae и валидировать видовую принадлежность секвенированных нами образцов.

Задачи:

1. Методом секвенирования по Сэнгеру получить последовательности генов *H3, COI, 18S rRNA, 28S rRNA*
2. Построить филогенетические деревья семейства Dorvilleidae с учетом новых данных секвенирования

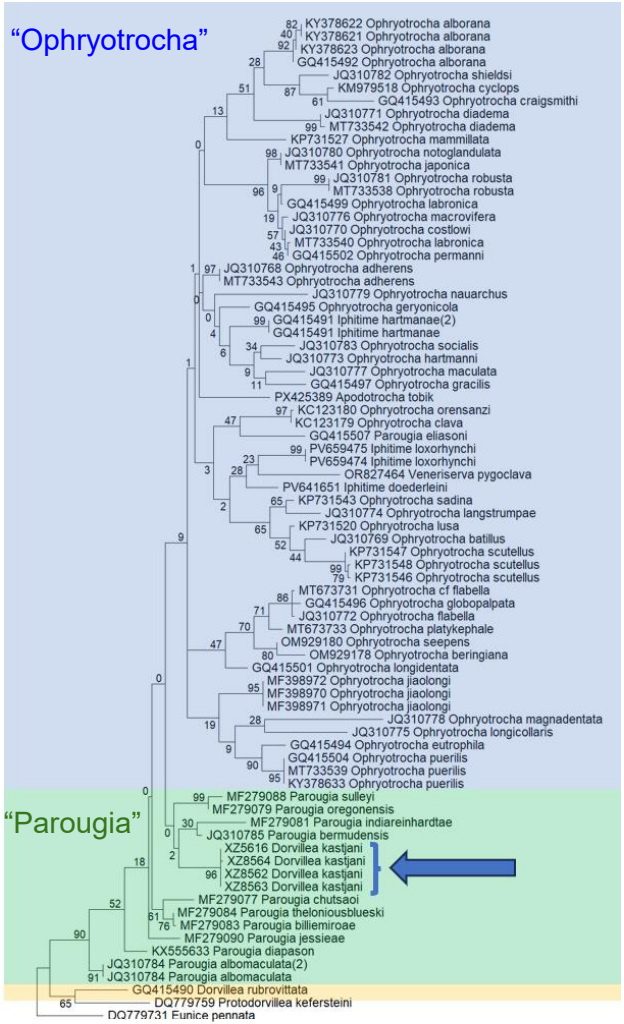
Первая субъединица цитохромоксидазы (*COI*)

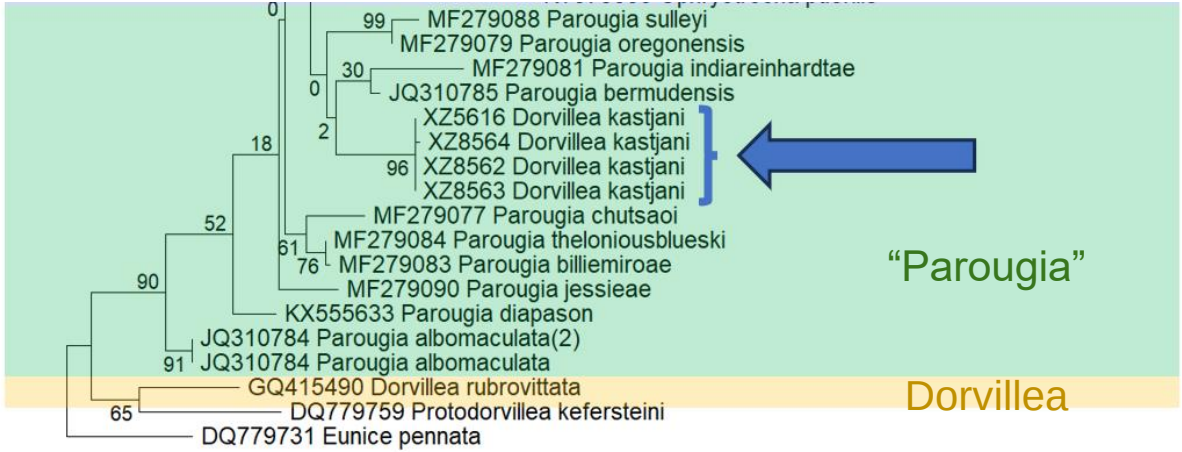




Было проведено выравнивание по 471 позиции

Гистон 3 (*H3*)



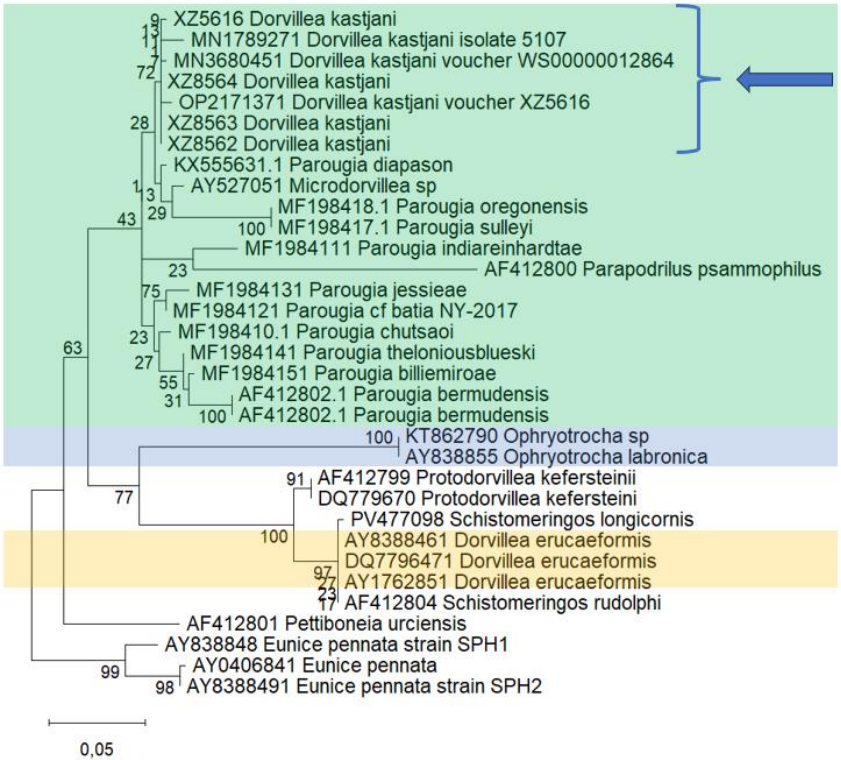


Было проведено выравнивание по 257 позициям

18S rRNA

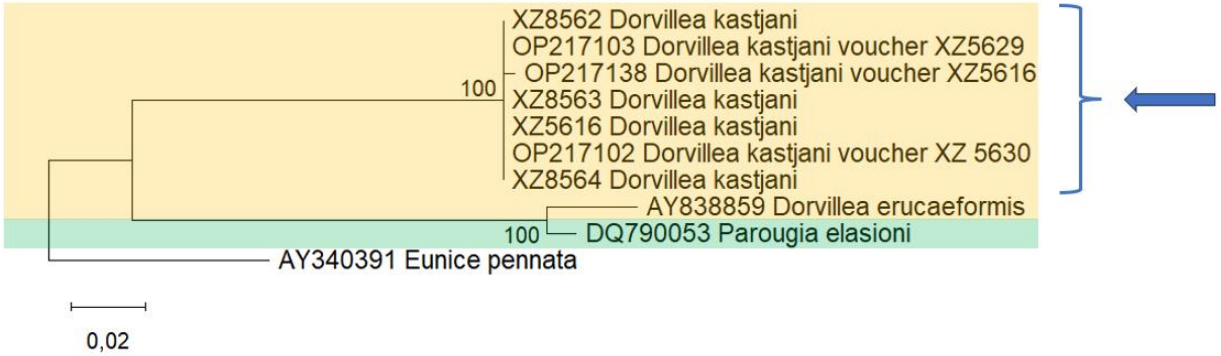
(В базе данных GenBank было найдено крайне мало последовательностей гена 18S rRNA представителей рода Ophyrotrocha)

Было проведено выравнивание по 359 позициям



28S rRNA

Участок гена 28S rRNA, который мы секвенировали, не совпал по участку с большинством опубликованных в GenBank последовательностей 28S rRNA представителей семейства Dorvilleidae.

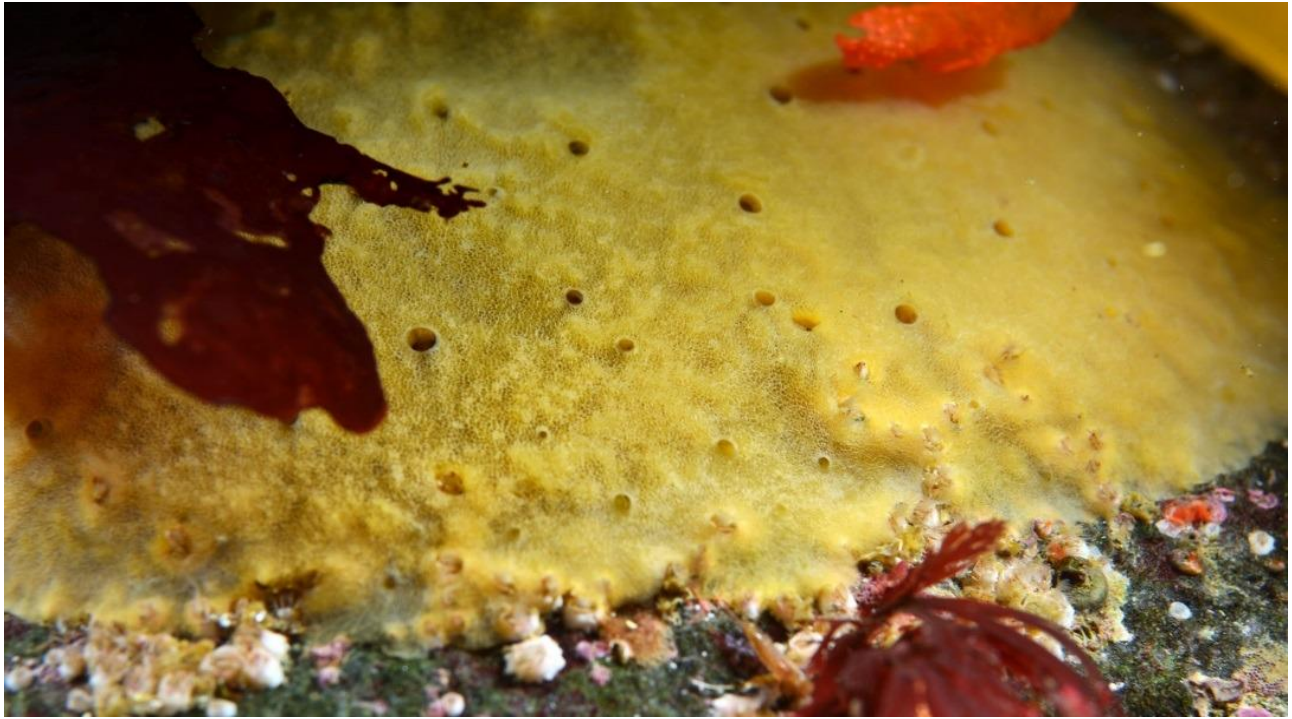


Было проведено выравнивание по 318 позициям

Результаты

1. Были получены последовательности генов *COI, 18S rRNA, 28S rRNA* и *H3* обрацов, определенных как *Dorvillea kastjani*, при этом последовательности гена *H3* для *Dorvillea kastjani* были получены впервые;
2. Филогенетический анализ последовательностей генов *COI, 18S rRNA 28S rRNA* и *H3* показал, что секвенированные нами образцы относятся к одному виду и сходны с *Dorvillea kastjani* по последовательностями генов *COI, 18S rRNA* и *28S rRNA,* опубликованным в GenBank;
3. *Dorvillea kastjani* оказался ближе к роду Parougia, чем к остальным видам рода Dorvillea.

Halichondria panicea



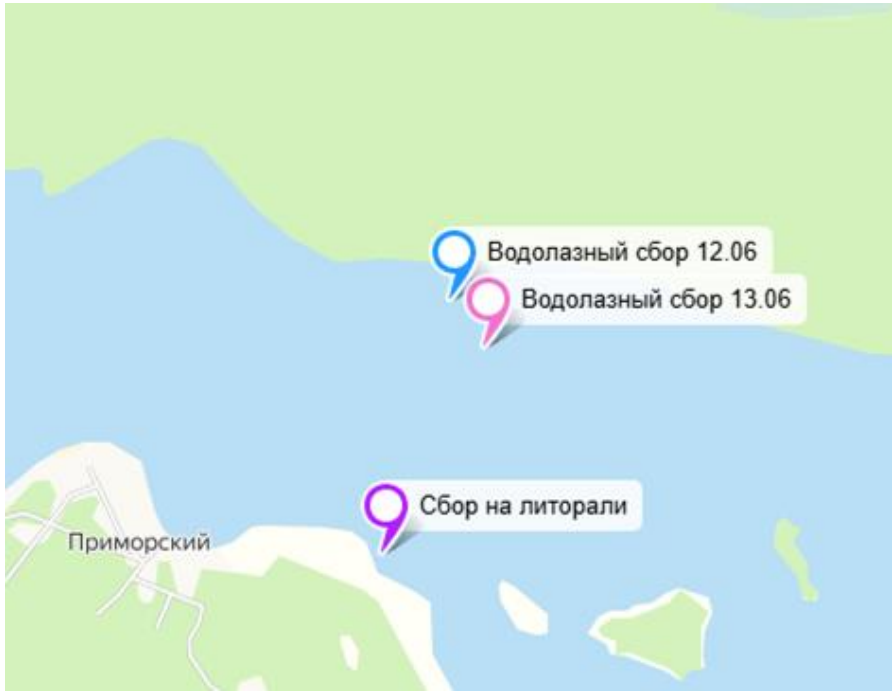
Цели и задачи

Цель: Исследовать генетические различия популяций губок *Halichondria panicea,* собранных в окрестностях ББС

Задачи:

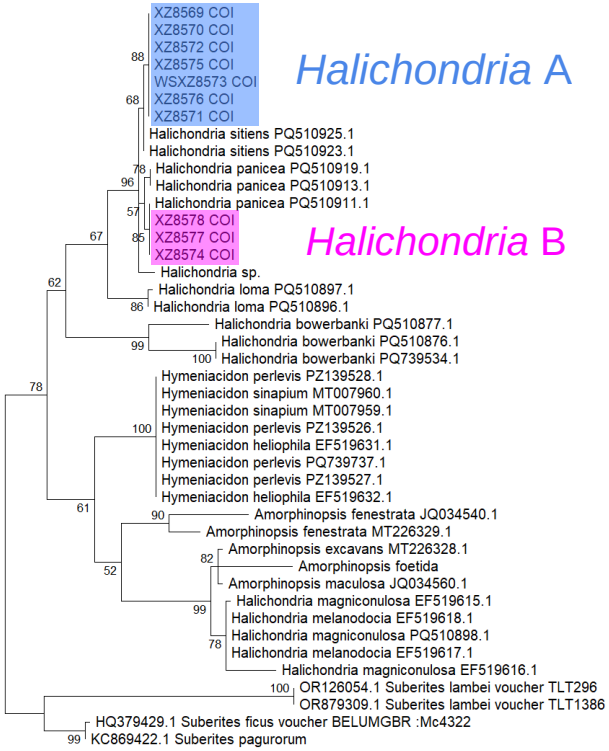
1) Секвенировать по Сэнгеру гены 28S рРНК и COX1 образцов губок *H. cf. panicea*
2) Построить филогенетические деревья для семейства Halichondriidae
3) На основе полученных данных построить гаплокарты для собранных образцов

Сбор материала

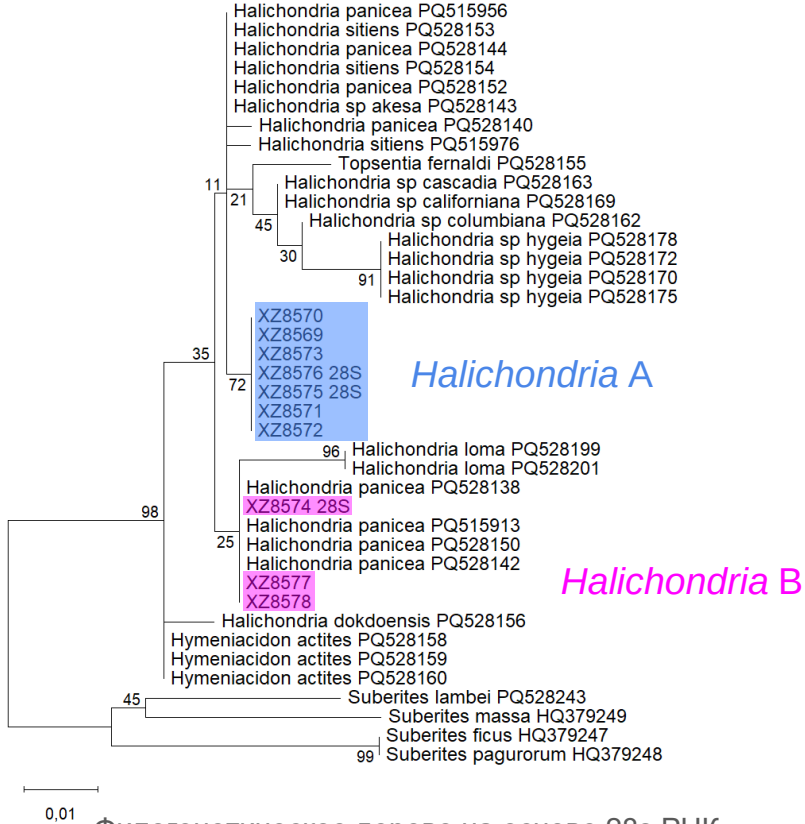


Карта сбора образцов

Филогенетическое дерево на основе последовательностей генов первой субъединицы цитохромоксидазы и 28s рРНК

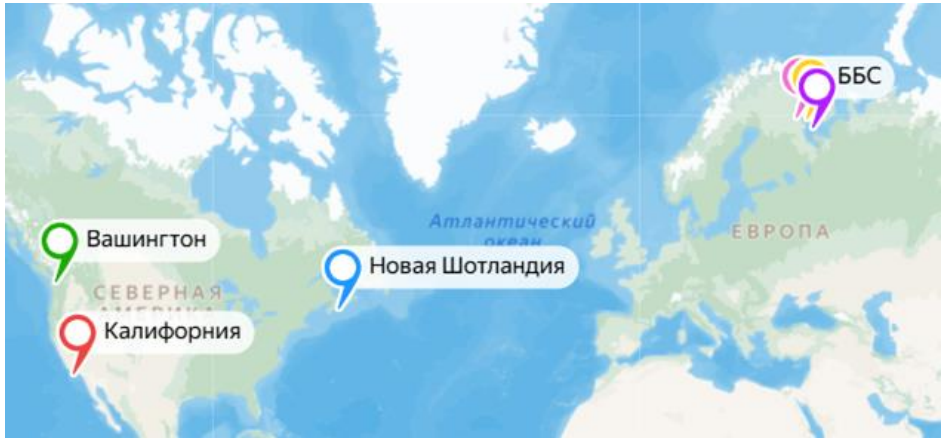


Филогенетическое дерево на основе COI (выравнивание по 322 позициям)

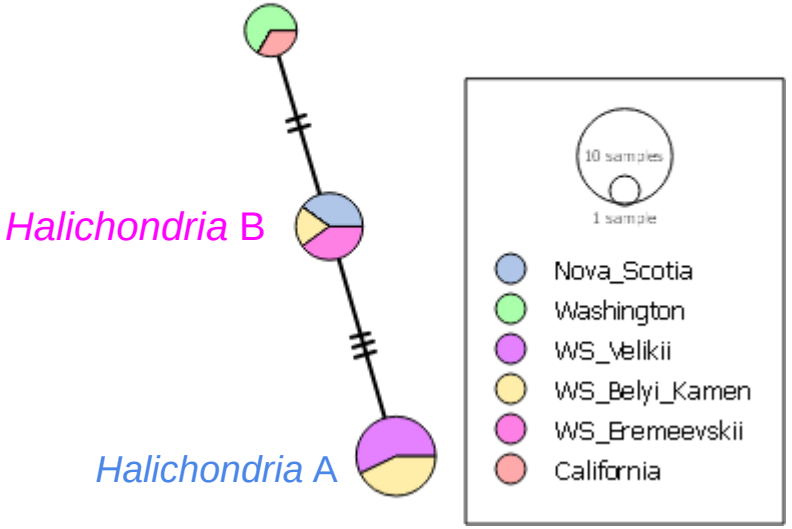


Филогенетическое дерево на основе 28s РНК (выравнивание по 302 позициям)

Гаплосеть популяций *Halichondria panicea*

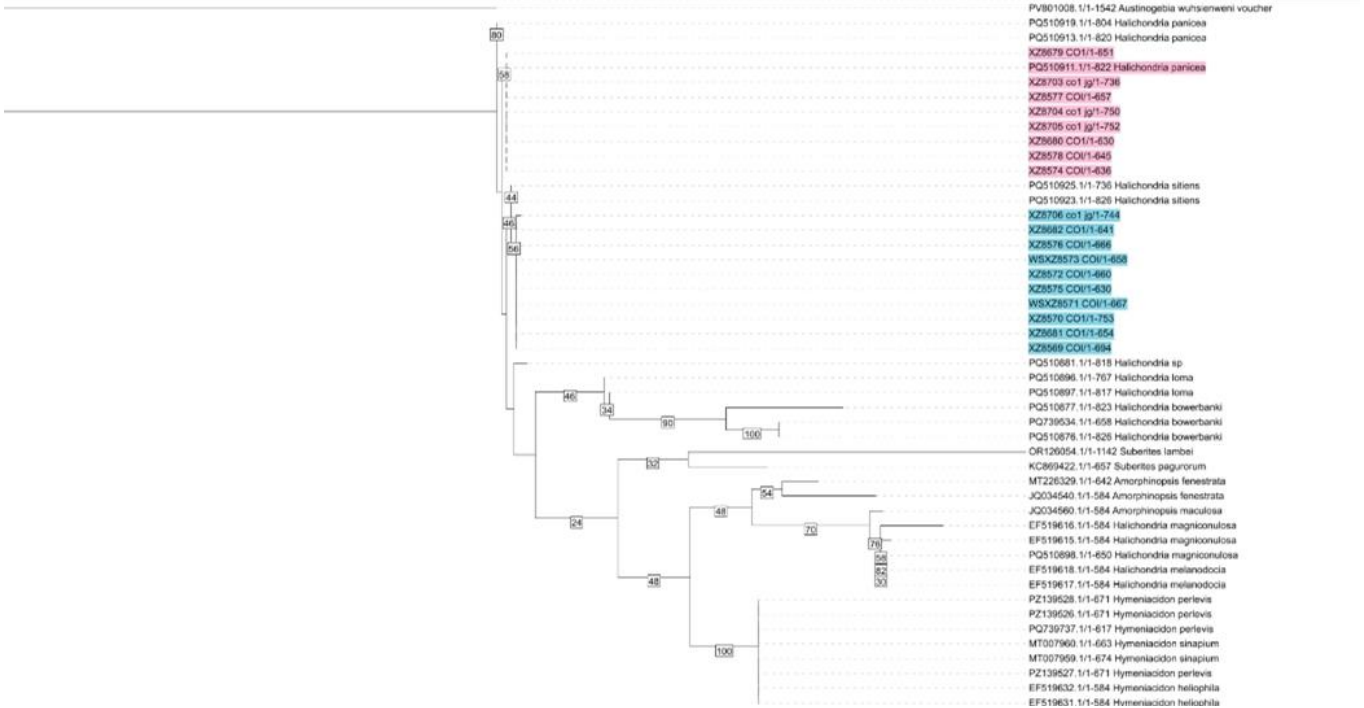


Карта популяций



Гаплосеть

Филогенетическое дерево для первой субъединицы цитохромоксидазы с образцами, полученными в августе



Результаты

1) Были получены последовательности 28S рРНК и COX1 собранных образцов
2) Были построены филогенетические деревья по COI и 28S рРНК на основе полученных последовательностей
3) Среди собранных образцов были выделены две различные клады, одна из которых ближе к *Halichondria sitiens (Halichondria A)*, чем к *H. panicea* из чего можно сделать вывод о наличии криптических видов
4) Была построена гаплокарта для собранных образцов
5) При добавлении данных, полученных в августе, разделение на группы сохранилось

Благодарности

Татьяне Владимировне Неретиной
Александре Безменовой
Маргарите Ежовой
Глафире Дмитриевне Колбасовой
Татьяне Юрьевне Неретиной
Николаю Юрьевичу Неретину
Анне Леонидовне Михлиной
Роману Миронову
Марии Андреевне Лагарьковой
Анне Сергеевне Королевой
Варваре Чаве
Андрею Игоревичу Лаврову и коллегам
Коллективу ББС