ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 4, с. 445–453

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.8:595.771/285

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ГИДРОБИОНТОВ ЛИСТВЕННИЧНОГО ЗАЛИВА ОЗЕРА БАЙКАЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МЕТАБАРКОДИНГА

© 2021 г. Л. С. Кравцова[1, *], Т. Е. Перетолчина[1], Т. И. Трибой[1], И. А. Небесных[1], А. Б. Купчинский[2], А. Е. Тупикин[3], М. Р. Кабилов[3]

[1]*Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия*

[2]*Байкальский музей Иркутского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутская область, пос. Листвянка, 664520 Россия*

[3]*Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: lk@lin.irk.ru*

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.
После доработки 07.09.2020 г.
Принята к публикации 01.10.2020 г.

Исследовано таксономическое разнообразие гидробионтов Лиственничного залива оз. Байкал с помощью ДНК-метабаркодинга. Расшифровка нуклеотидных последовательностей фрагмента гена (313 пн) митохондриальной ДНК, кодирующего первую субъединицу цитохром *c* оксидазы (*COI*), после амплификации с внутренних праймеров (mlCOIintF, jgHCO2198), проведена с использованием Illumina MiSeq. Биоинформатический анализ прочтений *COI* позволил выявить 187 ОТЕ (операционных таксономических единиц), среди которых преобладают Arthropoda, Annelida, Mollusca, Plathelminthes, на их долю приходится соответственно 52, 30, 10, 4%. В целом видовое разнообразие фауны залива по показателю Шеннона (3.2 бит) сопоставимо с другими районами Байкала. Наиболее разнообразный состав таксонов (22 ОТЕ) видового уровня приходится на личинок хирономид, что подтверждает эффективность метода для идентификации ювенильных стадий беспозвоночных животных. Результаты исследования служат первым шагом на пути совершенствования системы гидробиологического мониторинга оз. Байкал, основанного на синтезе молекулярно-генетической диагностики беспозвоночных животных и классической морфологической таксономии.

Ключевые слова: беспозвоночные животные, *COI*, ДНК-метабаркодинг, высокопроизводительное секвенирование, Байкал.

DOI: 10.31857/S0016675821040056

В настоящее время в связи с глобальным изменением климата стал актуален вопрос как будет меняться биоразнообразие природных экосистем в пространстве и времени? Отклик морских и пресноводных водоемов на изменение природно-климатических факторов регистрируют во всем мире, одним из показателей служит таксономический состав гидробионтов [1–3]. В оз. Байкал обитают 2565 видов и подвидов животных, эндемики составляют около 60% [4]. В результате глобальных климатических изменений температура воздуха в Байкальском регионе увеличилась на 1.2°С, а воды в поверхностном слое оз. Байкал (в мае–сентябре) – на 1°С [5]. В связи с нарастающим региональным потеплением климата важны методы экспресс-оценки состояния фауны Байкала для выявления изменений в ее составе, особенно в эндемичном комплексе, адаптированном к обитанию в холодноводном озере. Однако исследование фаунистического разнообразия Байкала сопряжено с трудоемким процессом идентификации видов и необходимостью привлечения большого числа специалистов-морфологов. Хотя в изучении и сохранении биоразнообразия любого водоема по-прежнему базовой остается морфология видов, для оценки современного состояния байкальской фауны мы решили апробировать современный молекулярно-генетический метод – ДНК-метабаркодинг на основе высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing – NGS). Этот метод широко применяется для исследования разнообразия пресноводных и морских экосистем, ДНК-метабаркодинг можно рассматривать как альтернативу традиционной морфологической диагностике видов [6–11].

Преимущество ДНК-метабаркодинга заключается в том, что при анализе большого набора организмов не требуется выделения ДНК из отдельных индивидуумов или клонирования. К тому же одновременно можно получить большое количество нуклеотидных последовательностей для каждого организма, смешанного с другими в одной пробе. При этом мини-баркод фрагментов гена мтДНК, кодирующего первую субъединицу цитохром *c* оксидазы (*COI*), позволяет идентифицировать виды с разрешением более 97–98% [12–14].

Цель работы заключается в исследовании таксономического разнообразия гидробионтов на основе ДНК-метабаркодинга на примере Лиственничного залива оз. Байкал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы зообентоса были собраны в 2019 г. в заливе Лиственничный. На глубинах 0.3–0.5 м донные отложения (крупная и мелкая галька с отдельными валунами) отбирали вручную с использованием сачка. На глубинах 2–5 м валуны, неокатанные обломки пород с щебнем, а также заиленный песок отбирали водолазы. Беспозвоночных животных с поверхности камней счищали щеткой в кювету с водой, из заиленного песка их извлекали путем флотации в насыщенном растворе сахара плотностью 1.12. Пробы промывали через сачок из мельничного сита № 23 и фиксировали 100%-ным этанолом. Всего было собрано 15 количественных проб зообентоса.

В лабораторных условиях пробы разбирали под микроскопом МБС-10 при увеличении 2 × 10, беспозвоночных животных очищали от остатков терригенного материала (детрита, песка), водорослей. Для выделения ДНК все организмы предварительно вымачивали (один час) в дистиллированной воде, причем от крупных особей (размерами более 5 мм) брали кусочки ткани по 2–3 мм. Беспозвоночных животных с однотипных донных отложений помещали в фарфоровую чашку и растирали пестиком с добавлением 2%-ного раствора CTAB (в пропорции: на 1 мм^3 ткани 300 мкл CTAB). ДНК экстрагировали по модифицированной методике Дойла и Диксон [15]. Всего для метабаркодинга было подготовлено пять проб геномной ДНК (не менее 20 нг в каждой) беспозвоночных животных, собранных на разных типах донных отложений.

Амплификацию проводили с набором реактивов ПЦР с HS-Taq (“Биолабмикс”, г. Новосибирск www.biolabmix.ru) в 25 мкл реакционной смеси в термоциклере Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США). Фрагмент гена *COI* амплифицировали с использованием праймеров mlCO1int F: ggw-acw-ggw-tga-acw-gtw-tay-ccy-cc [14] и igHCO2198: ta(I)-acy-tc(I)-ggr-tg(I)-ccr-aar-aay-ca [16].

Условия ПЦР при 30 циклах амплификации были следующими: денатурация 94°C – 1 мин (преденатурация – 5 мин), отжиг 50°C – 1 мин 30 с, элонгация 72°C – 1 мин 20 с (постэлонгация – 5 мин). Продукты реакции анализировали электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Фрагменты ожидаемого размера вырезали и очищали с помощью набора для элюции ДНК из агарозного геля (Biosilica, Новосибирск).

К ампликонам лигировали адаптеры с помощью набора NebNext Ultra II DNA Library Prep Kit (NEB). Полученные ДНК-библиотеки секвенировали в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН) на секвенаторе MiSeq (Illumina), используя набор Reagent Kit v3 (2 × 300, Illumina).

Полученные парные последовательности анализировали с помощью UPARSE-скриптов [17], используя Usearch v11.0.667 [18]. Биоинформатическая обработка включала перекрывание парных прочтений, фильтрацию по качеству и длине, учет одинаковых последовательностей, отбрасывание синглетонов, удаление химер и получение OTE (операционной таксономической единицы) с помощью алгоритма кластеризации UNOISE2 [19]. Таксономическую принадлежность последовательностей OTE определяли с использованием алгоритмов SINTAX [20] и референсной базы MIDORI_UNIQUE_20180221_COI_SINTAX [21], а также BLAST. Анализ репрезентативности выборок OTE проводили с помощью iNEXT 2.0.15 [22]. Все нуклеотидные последовательности выявленных OTE были протестированы на наличие стоп-кодонов с использованием программы Emboss Transeq, размещенной на сервере: www.ebi.ac.uk.

Зависимость между численностью представителей высших таксонов (экз.) в пробах (до экстракции ДНК) и количеством прочтений идентифицированных OTE оценивали по коэффициенту корреляции Спирмена. Видовое β-разнообразие фауны в Лиственничном заливе характеризовали по показателю Шеннона, а степень сходства населения разных биотопов – с помощью кластерного анализа (UPGMA), в качестве меры расстояния использовали коэффициент Жаккара. OTE, представленные менее 10 прочтениями, в расчетах не использовали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего в собранных пробах было найдено 5042 экз., из них 2803 экз. макробеспозвоночных (размеры >2 мм) и 2239 экз. мейобеспозвоночных животных (размеры <2 мм). Наиболее многочисленными были макробеспозвоночные Oligochaeta (972 экз.), Amphipoda (605 экз.), Chironomidae (546 экз.), Mollusca (225 экз.) и мейобеспозвоночные Ostracoda (642 экз.), Nematoda (588 экз.), Rhabdocoela (198 экз.). Зарегистрированы пять

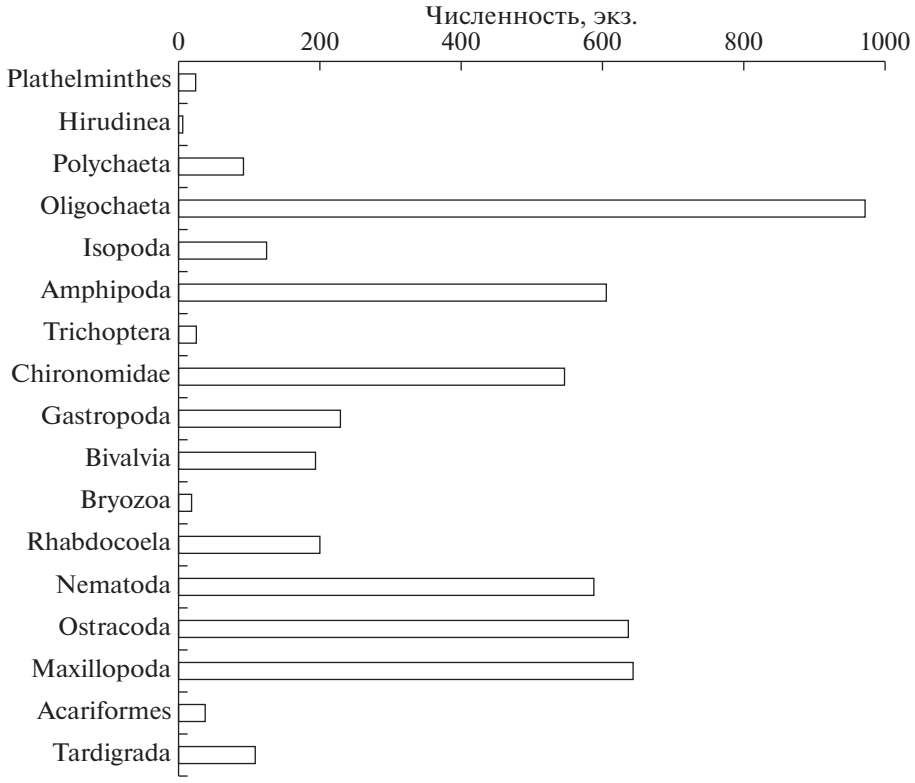

Рис. 1. Численность беспозвоночных животных в бентосных пробах из Лиственничного залива оз. Байкал до экстракции ДНК.

кладок и 62 кокона, а также фрагменты колоний губок. Всего в разобранных пробах (до экстракции ДНК) отмечены представители 17 высших таксонов (рис. 1).

В результате высокопроизводительного секвенирования для каждого образца было получено не менее 75 тыс. парных чтений. Биоинформатический анализ данных позволил выявить 251 ОТЕ на 3% уровне различий между кластерами последовательностей видового ранга. Перед оценкой таксономического разнообразия из полученного массива были удалены: 10 ОТЕ, не соответствующих длине прочтения; 5 ОТЕ, имеющих стоп-кодоны; 49 ОТЕ, не идентифицируемых BLAST из-за неопределенности таксономического статуса. Нижняя граница гомологии ОТЕ высших таксонов с референсными последовательностями GenBank была принята на уровне 80% и выше.

Среди идентифицированных таксонов Arthropoda составляют 52% от общего количества ОТЕ, Annelida – 30%, Mollusca – 10%, Plathelminthes – 4%, Nematoda – 2%, представители других типов: губки, колючеголовые черви, рыбы и растительные организмы – <1% (рис. 2,*а*). Tardigrada и Bryozoa, найденные в бентосных пробах (рис. 1), в прочтениях короткого фрагмента *COI* геномной ДНК беспозвоночных не отмечены.

Наблюдается прямая зависимость между численностью представителей высших таксонов в бентосных пробах (до экстракции ДНК) и количеством прочтений, коэффициент корреляции Спирмена составляет 0.49 ($p < 0.05$).

До видового и родового уровней (при гомологии ≥97 и ≥95% соответственно) идентифицированы 68 ОТЕ (табл. 1), на их долю приходится 55% общего количества (189497) прочтений фрагмента *COI* (табл. 2). Причем зарегистрированные по морфологии в бентосных пробах и детектированные по *COI* олигохеты рода *Nais* (Oligochaeta/Naididae), водяные ослики *Baicalasellus* (Isopoda), *Cytherissa* (Ostracoda), водяные клещи (Arachnida) не были включены в табл. 1, так как гомология с референсными последовательностями составляла от 80 до 95%.

Судя по коэффициенту Жаккара, состав фауны (по идентифицированным ОТЕ) на валунах и неокатанных обломках пород с щебнем в зоне глубин 2–5 м сходен и значительно отличается от такового на заиленных песках (рис. 3). Это соответствует общим закономерностям пространственного распределения гидробионтов в прибрежной зоне оз. Байкал.

Видовое β-разнообразие беспозвоночных животных в Лиственничном заливе по показателю Шеннона составляет 3.2 бит.

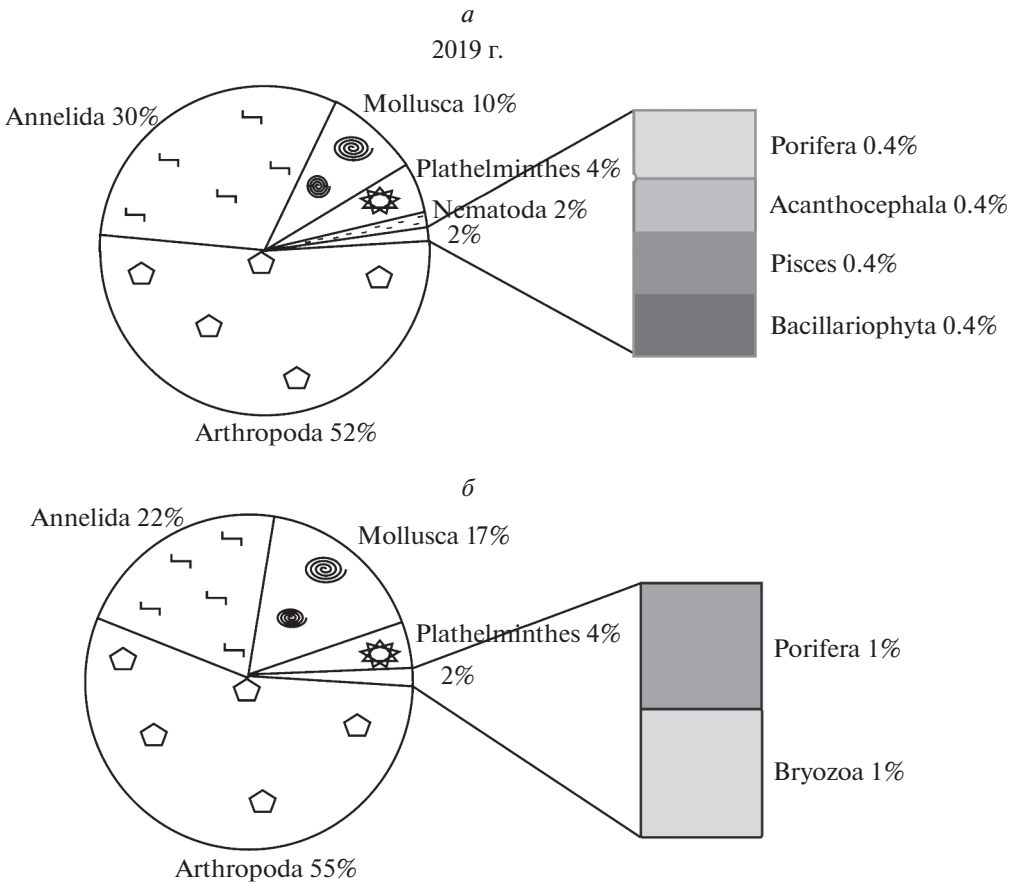

Рис. 2. Процентное соотношение надвидовых таксонов гидробионтов в Лиственничном заливе оз. Байкал. *а* – доля (%) таксонов в общем разнообразии, установленном в 2019 г. с использованием ДНК-метабаркодинга; *б* – доля (%) таксонов в общем разнообразии, установленном ранее классическими морфологическими методами [4].

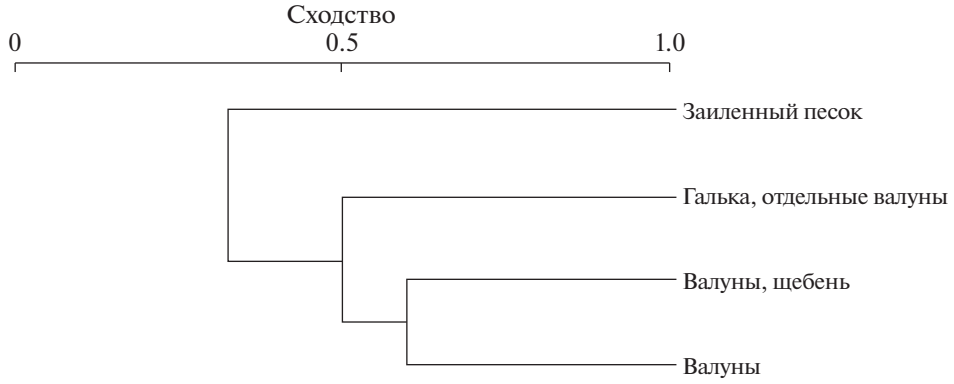

Рис. 3. Фаунистическое сходство донного населения разных биотопов Лиственничного залива оз. Байкал в летний период (2019 г.). Кластерный анализ (на основе идентифицированных OTE) проведен методом UPGMA с использованием коэффициента Жаккара в качестве меры расстояния.

ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальный ген *COI* в начале 2000 гг. был принят за стандарт таксономического баркода большинства групп животных организмов [23]. Несмотря на универсальность праймеров (LCO1490 и HCO2198) фолмеровского фрагмента митохондриального гена *COI* [24] при реконструкции филогении возникали проблемы с таксономическим статусом некоторых видов беспозвоночных животных, в частности хирономид

Таблица 1. Состав ОТЕ видового уровня, имеющих сходство с референсными последовательностями GenBank

Таксон	Вид	№ референсной последовательности из GenBank	Сходство с референсной последовательносью из GenBank, %
Porifera	*Baikalospongia intermedia* Dyb.	KF835270	99.7
Acanthocephala	*Echinorhynchus cinctulus* Porta	KP261014	98.6
Polychaeta/Fabriciidae	*Manayunkia baicalensis* (Nusb.)	KF289881	99.6
	Manayunkia godlewskii (Nusb.)	KF289841	100
	Manayunkia sp.	MK393734	95.9
	Manayunkia zenkewitschii Sit., Shcherb. et Kharch.	KF289867	98.8
Oligochaeta	*Lamprodrilus* sp.	GU328642	95
	Lamprodrilus nigrescens Mich.	GU328643	91.6
	Rhynchelmis alyonae Mart., Ferrag. et Kayg.	GU328669	98.3
	Rhynchelmis sp.	AJ577632	95
	Styloscolex chorioidalis Isoss.	AJ577636	96.2
	Baikalodrilus sp.	MK984619	95.6
	Rhyacodriloides sp.	FN796445	95
	Teleuscolex baicalensis Grube	AJ577630	99
Hirudinea/Piscicolidae	*Baicalobdella torquata* Grube	AY336018	99.3
Copepoda/Cyclopidae	*Diacyclops arenosus* (Mazep.)	KT075074	99.6
	Diacyclops incolotaenia (Mazep.)	KT075079	98.3
Amphipoda	*Eulimnogammarus vittatus* (Dyb.)	MK887750	99.7
	Baikalogammarus pullus (Dyb.)	FJ756303	99.7
	Gmelinoides fasciatus (Stebb.)	KF478573	99.7
	Linevichella vortex (Dyb.)	MN148355	99.7
	Linevichella sp.	MN148355	95.4
	Micruropus wahli (Dyb.)	AY926683	99.7
	Pallaseopsis kessleri (Dyb.)	GQ919207	100
	Pallaseopsis sp.	MG936047	95.7
	Brandtia latissima lata (Dyb.)	FJ756301	97.2
Diptera/Chironomidae	*Chironomus nipponensis* Tokun.	LC096177	99.3
	Cricotopus bicinctus (Meig.)	JN275346	99.7
	Cricotopus conf. *fuscus*	MN673037	99
	Cricotopus rufiventris (Meig.)	HQ941597	99.3
	Cricotopus sp.	JF870941	99.3
	Micropsectra radialis Goetgh.	MT048255	99.3
	Microtendipes sp.	LC329125	95
	Orthocladius conf. *ashei* Sopon.	HQ941639	98.6
	Orthocladius conf. *glabripennis* Goetgh.	LC462332	97.9
	Orthocladius gregarius Linev.	KC879234	100
	Orthocladius nitidoscutellatus Lundstr.	MT048224	98.6
	Orthocladius sp.	HM421332	95.5
	Orthocladius sp. 1	KC894910	100
	Orthocladius sp. 2	KT248920	100
	Orthocladius sp. 3	KC894908	99.3
	Orthocladius sp. 4	KC894911	99.3

Таблица 1. Окончание

Таксон	Вид	№ референсной последовательности из GenBank	Сходство с референсной последовательносью из GenBank, %
Diptera/Chironomidae	*Orthocladius* sp. 5	KC894907	100
	Pagastia orientalis (Tshern.)	KY640356	97.6
	Paratanytarsus baicalensis (Tshern.)	MT020734	99.3
	Polypedilum albicorne (Meig.)	MG949931	99.4
	Prodiamesa olivacea (Meig.)	KT248930	99
	Sergentia baicalensis Tshern.	AF116586	99.3
Trichoptera	*Baicalina bellicosa* Mart.	KR153132	99.7
	Baicalina reducta Mart.	KR153134	99.7
	Baicalinella foliata (Mart.)	KR153101	99.7
	Baicaloides ovalis (Mart.)	KR153105	99.7
	Thamastes dipterus Hag.	KR153094	99.7
Mollusca/Bivalvia	*Pisidium casertanum* (Poli)	KF483386	99.7
	Pisidium henslowanum (Shepp.)	MN913398	98.9
	Pisidium sp.	KF000182	99.4
Mollusca/Gastropoda	*Baicalancylus* sp.	KR822545	95
	Pseudancylastrum sibiricum (Gerstf.)	KR822557	100
	Maackia herderiana (Lindh.)	KY697388	99.7
	Parabaikalia dubiosa (Kozh.)	KT885121	99.7
	Pseudobaikalia contabulata (W. Dyb.)	Z92987	99.7
	Teratobaicalia duthiersii (W. Dyb)	KT885132	97.7
	Benedictia baicalensis (Gerstf.)	Z92983	99
	Choanomphalus amauronius Bourg.	Y14721	100
	Choanomphalus aorus Bourg.	Y14718	97.5
	Choanomphalus maacki Gerstf.	EF012168	99.7
	Choanomphalus sp.	Y14722	95.8
Pisces/Cottidae	*Batrachocottus baicalensis* (Dyb.)	LC125703	99.7

[25], моллюсков Gastropoda: Cypraeidae [26] и др. Для получения лучшего разрешения на дереве или филогенетического сигнала многие исследователи стали использовать разные, наиболее вариабельные участки гена *COI*. Например, для морских нематод в качестве ДНК-баркода использовали районы M1–M6 и I3–M11 [27]. В последнее время, с появлением NGS-технологии, для оценки разнообразия Metazoa стал популярен мини-баркод с внутренних праймеров (mlCOIintF в комбинации с jgHCO2198) фолмеровского фрагмента *COI* длиной 313 пн [11, 14, 16]. Проведенные нами в 2019 г. исследования также показали эффективность применения данных праймеров для беспозвоночных, населяющих Лиственничный залив (табл. 1, 2; рис. 2,*а*). Выявленное в заливе разнообразие фауны по показателю Шеннона (3.2 бит) сравнимо с таковым в других районах оз. Байкал (в бухте Большие Коты, у восточного побережья в районе р. Утулик–р. Хара-Мурина), установленным с помощью классического морфологического анализа [28, 29].

В составе донного населения Лиственничного залива преобладают, как и ранее [4], представители Arthropoda, Annelida, Mollusca, Plathelminthes (рис. 2,*а*, *б*). Наиболее разнообразен состав ОТЕ членистоногих, особенно хирономид (табл. 1), несмотря на то что среди них были многочисленны личинки младших возрастов, не поддающиеся видовой диагностике по морфологии. Размеры их составляли до 2 мм, а численность более 300 экз. Тем не менее по мини-баркоду фрагментов *COI* выявлены 22 ОТЕ видового уровня, при гомологии прочитанных последовательностей с представленными в GenBank от 97 до 100%. Аналогичная картина наблюдается у личинок ручейников, среди которых по ДНК-метабаркодингу идентифицированы пять видов с гомологией 99.7% с последовательностями из GenBank. Это свидетельствует о преимуществе ДНК-метабаркодинга по сравнению с классической таксономией. Боль-

Таблица 2. Количество прочтений фрагмента гена *COI* мтДНК для ОТЕ надвидовых таксонов гидробионтов, собранных в заливе Лиственничный (оз. Байкал, 2019 г.)

Таксон	Глубина, м			
	0.3–0.5		2–5	
	Донные отложения			
	галька, отдельные валуны	валуны	неокатанные обломки пород, щебень	заиленный песок
Porifera/Lubomirskiidae	0	104	2	0
Plathelminthes/Tricladida	0	26	101	0
Plathelminthes/Rhabdocoela	0	4	23	119
Acanthocephala	3	0	0	611
Nematoda	0	0	36	88
Annelida	12	2016	1185	83
Annelida/Polychaeta/Fabriciidae	14	4308	1968	943
Annelida/Clitellata/Hirudinea	0	37	0	0
Annelida/Clitellata/Oligochaeta	12673	19517	10966	17958
Arthropoda	26	18	21	255
Arthropoda/Copepoda	1	292	0	0
Arthropoda/Cyclopidae	47	659	0	3
Arthropoda/Ostracoda	164	274	0	1858
Arthropoda/Isopoda	3	384	10	0
Arthropoda/Amphipoda	837	8166	6335	720
Arthropoda/Arachnida/Acariformes	90	6	0	323
Arthropoda/Insecta	38	149	292	2057
Arthropoda/Trichoptera/Apataniidae	27	2131	1	0
Arthropoda/Diptera/Chironomidae	26795	5170	8941	1860
Mollusca/Gastropoda	59	26244	13122	28
Mollusca/Bivalvia	29	795	7709	725
Chordata/Cottidae	0	24	0	0
Bacillariophyta	0	9	3	0

шинство видов амфипод, олигохет, полихет и других беспозвоночных, приведенных в списке (табл. 1), встречались в Лиственничном заливе в предыдущие годы исследований [4]. Таким образом, ДНК-метабаркодинг с внутренних праймеров *COI* (mlCOIintF, jgHCO2198) позволяет оценить видовое разнообразие гидробионтов как половозрелых, так и ювенильных стадий, идентификация которых морфологическими методами часто не представляется возможной. Особенно это касается личинок амфибиотических насекомых, а также кладок беспозвоночных животных. О чувствительности метода ДНК-метабаркодинга свидетельствует наличие в массиве данных не только последовательностей рыб *Batrachocottus baicalensis* (Dyb.), типичного обитателя литорали Байкала [4], но и заражающих их червей *Echinorhynchus cinctulus* Porta, часто встречающихся в пищеварительном тракте большеголовой широколобки. Непосредственно рыбы *B. baicalensis* не были обнаружены, но присутствие их в смеси геномной ДНК беспозвоночных обусловлено попаданием в пробы отдельных икринок вместе с коконами.

Несмотря на перечисленные выше преимущества ДНК-метабаркодинга, для Tardigrada из Лиственничного залива (рис. 1) ОТЕ не идентифицированы. Вероятно, для них приемлем другой маркер (18S), поскольку они также не были детектированы по *COI* при исследовании мейофауны фьордов западного побережья Швеции на основе NGS [30]. Что касается Bryozoa, в работе [30] показано, что они могут быть детектированы по короткому фрагменту *COI*, однако мы не получили ни одного прочтения. Для выяснения этого

обстоятельства необходимы дополнительные исследования, поскольку для большинства байкальских мейобеспозвоночных референсные последовательности *COI* отсутствуют в GenBank. К тому же Bryozoa, возможно, не были идентифицированы нами из-за плохой экстракции ДНК, так как в пробах встречались лишь остатки колоний (18 экз.) в виде хитиновых шипов, окружающих ротовое отверстие мшанок.

В целом ДНК-метабаркодинг по короткому фрагменту *COI* позволяет оценить локальное разнообразие фауны Лиственничного залива, отмечены представители 42 родов, 31 семейства, 9 типов. Разнообразие донного населения в 2019 г. сопоставимо с таковым в прошлом столетии [4]. Результаты проведенных исследований указывают на необходимость создания базы данных референсных последовательностей *COI* байкальских гидробионтов. Полученные последовательности могут быть использованы для совершенствования системы мониторинга оз. Байкал, для исследования связей таксономического состава и обилия гидробионтов с трендами природно-климатических факторов.

Работа выполнена по проекту Российского фонда фундаментальных исследований № 19-05-00398_а; частично сбор материала проведен в рамках проекта № 0345–2019–0004 (АААА-А16-116122110060-9) по теме: “Комплексное исследование эволюционных процессов у бентосных организмов в условиях резких изменений экосистемы Байкала”; секвенирование образцов проведено в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hampton S.E., Mc Gowan S., Ozersky T. et al.* Recent ecological change in ancient lakes // Limnology and Oceanography. 2018. V. 63. № 5. P. 2277–2304.
2. *Hsieh C.H., Sakai Y., Ban S. et al.* Eutrophication and warming effects on long-term variation of zooplankton in Lake Biwa // Biogeosciences. 2011. V. 8. № 5. P. 1383–1399.
3. *Cohen A.S., Gergurich E.L., Kraemer B.M. et al.* Climate warming reduces fish production and benthic habitat in Lake Tanganyika, one of the most biodiverse freshwater ecosystems // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 34. P. 9563–9568.
4. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: В 2 томах. Т. 1. Озеро Байкал. Новосибирск: Наука, 2004. 1679 с.
5. *Шимараев М.Н., Куимова Л.Н., Синюкович В.Н., Цехановский В.В.* О проявлении на Байкале глобальных изменений климата в XX столетии // ДАН. 2002. № 3. С. 397–400.
6. *Hajibabaei M., Shokralla S., Zhou X. et al.* Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos // PLoS One. 2011. V. 6. P. e17497.
7. *Janzen D.H., Hajibabaei M., Burns J.M. et al.* Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding // Philosoph. Transactions Royal Soc. London. Series B. Biol. Sci. 2005. V. 360. P. 1835–1845.
8. *Porazinska D.L., Giblin-Davis R.M., Faller L. et al.* Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity // Mol. Ecol. Resources. 2009. V. 9. P. 1439–1450.
9. *Aylagas E., Borja Á., Rodríguez-Ezpeleta N.* Environmental status assessment using DNA metabarcoding: Towards a genetics based marine biotic index (gAMBI) // PLoS One. 2014. V. 9. P. e90529.
10. *Elbrecht V., Vamos E.E., Meissner K. et al.* Assessing trengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring // Methods Ecol. Evol. 2017. № 8. P. 1265–1275.
11. *Kuntke F., de Jonge N., Hesselsøe M., Nielsen J.L.* Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates // Ecol. Indicators. 2020. V. 111. e 105982.
12. *Hajibabaei M., Singer G.A., Clare E.L., Hebert P.D.N.* Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring // BMC Biology. 2007. V. 5. P. 24.
13. *Meusnier I., Singer G.A., Landry J.F. et al.* A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 214.
14. *Leray M., Yang J.Y., Meyer C.P. et al.* A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents // Frontiers in Zoology. 2013. V. 10. P. 34.
15. *Doyle J.J., Dickson E.* Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis // Taxon. 1987. V. 36. P. 715–722.
16. *Geller J.B., Meyer C.P., Parker M. et al.* Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys // Mol. Ecol. Resources. 2013. V. 13. № 5. P. 851–861.
17. *Edgar R.C.* UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // Nature Methods. 2013. V. 10. P. 996–998.
18. *Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. № 19. P. 2460–2461.
19. *Edgar R.C.* UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon reads // bioRxiv. 2016. https://doi.org/10.1101/081257
20. *Edgar R.C.* SINTAX, a Simple Non-Bayesian Taxonomy Classifier for 16S and ITS Sequences // bioRxiv. 2016. https://doi.org/10.1101/074161
21. *Machida R.J., Leray M., Ho S.-L., Knowlton N.* Metazoan mitochondrial gene sequence reference datasets for taxonomic assignment of environmental samples // Scientific Data. 2017. V. 4. P. 170027.

22. *Hsieh T.C., Ma K.H., Chao A.* iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers) // Methods Ecol. Evol. 2016. V. 7. P. 1451–1456.
23. *Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., De Waard J.R.* Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Royal Soc. London. Series B. 2003. V. 270. P. 313–321.
24. *Folmer O., Black M.B., Hoeh W.R. et al.* DNA primer for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Marine Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. P. 294–299.
25. *Ekrem T., Stur E., Hebert P.D.N.* Females do count: Documenting Chironomidae (Diptera) species diversity using DNA barcoding // Organisms Diversity and Evolution. 2010. № 10. P. 397–408.
26. *Meyer C.P.* Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics // Biol. J. Linnean Society. 2003. V. 79. P. 401–459.
27. *Derycke S., Vanaverbeke J., Rigaux A. et al.* Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free living marine nematodes // PLoS One. 2010. V. 5. P. e13716.
28. *Кравцова Л.С., Потемкина Т.Г., Механикова И.В. и др.* Пространственное распределение бентосных сообществ беспозвоночных животных в южной котловине озера Байкал // Зоол. беспозвоночных. 2006. Т. 3. Вып. 1. С. 65–76.
29. *Kravtsova L.S., Kamaltynov R.M., Karabanov E.B. et al.* Macrozoobenthic communities of underwater landscapes in the shallow-water zone of southern Lake Baikal // Hydrobiologia. 2004. V. 522. P. 193–205.
30. *Haenel Q., Holovachov O., Jondelius U. et al.* NGS-based biodiversity and community structure analysis of meiofaunal eukaryotes in shell sand from Hållö Island, Smögen, and soft mud from Gullmarn Fjord, Sweden // Biodiversity Data J. 2017. V. 5. P. e12731.

The Study of the Hydrobionts Diversity from Listvennichny Bay of the Lake Baikal by DNA Metabarcoding

L. S. Kravtsova[a, *], T. E. Peretolchina[a], T. I. Triboy[a], I. A. Nebesnykh[a], A. B. Kupchinskiy[b], A. E. Tupikin[c], and M. R. Kabilov[c]

[a] *Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk, 664033 Russia*
[b] *Baikal Museum of Irkutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Listvyanka, Irkutskaya oblast, 664520 Russia*
[c] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, 630090 Russia*
**e-mail: lk@lin.irk.ru*

The taxonomic diversity of hydrobionts from Listvennychniy Bay was studied by DNA metabarcoding. The sequencing of a gene fragment (313 bp) of mitochondrial DNA encoding the first subunit of cytochrome *c* oxidase (*COI*) was performed using an Illumina MiSeq after amplification from internal primers (mlCOIintF, jgHCO2198). Bioinformatic analysis of *COI* reads revealed 187 OTUs (operational taxonomic units), among which Arthropoda, Annelida, Mollusca, Plathelminthes prevail, accounting for 52, 30, 10, 4%, respectively. In general, the species diversity of the bay's fauna by the Shannon index (3.2 bits) is comparable to other areas of Lake Baikal. The most diverse composition of taxa (22 OTU) of the species rank falls on the larvae of chironomids, which confirms the effectiveness of the method for identifying juvenile stages of invertebrates. The research results are the first step towards improving the system of hydrobiological monitoring of Lake Baikal, based on the synthesis of molecular genetic diagnostics of invertebrates and classical morphological taxonomy.

Keywords: invertebrates, *COI*, DNA metabarcoding, high-throughput sequencing, Lake Baikal.