

УДК 595:771:575.852'113

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КРИТЕРИИ В СИСТЕМАТИКЕ НАСЕКОМЫХ: ДИАПАЗОН ИЗМЕНЧИВОСТИ ШТРИХКОДОВОГО ГЕНА COI КАК ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ РОДА, ТРИБЫ И ПОДСЕМЕЙСТВА, НА ПРИМЕРЕ КОМАРОВ-ЗВОНЦОВ CHIRONOMINAE И ORTHOCLADIINAE (CHIRONOMIDAE, DIPTERA)

© 2013 г. Н.В. Полуконова¹, А.Г. Демин¹, Н.С. Мюге^{2,3}

¹Саратовский государственный медицинский университет, кафедра общей биологии,
фармакогнозии и ботаники

410012 Саратов, ул. Большая Казачья, 112

e-mail: polukonovanv@yandex.ru, verg44@mail.ru

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, 26

³Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии

107140 Москва, Верхняя Красносельская, 17

e-mail: tugue@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2012 г.

Современная систематика насекомых основана преимущественно на морфологических признаках. Однако их использование ограничено как высокой вариабельностью, так и сложностью сравнения удаленных таксонов в связи с низким числом общих признаков, что в целом приводит к определенному субъективизму в построении системы. В отличие от морфологических молекулярные признаки таксонов, выявляемые с использованием маркерных генов, таких, как ген цитохром С оксидазы I (COI), менее вариабельны и более унифицированы, что позволяет использовать их в качестве критерия рода, трибы, подсемейства для широкого круга организмов. Применение молекулярных критериев особенно актуально для построения системы в группах организмов с высоким морфологическим и видовым разнообразием, таких, как комары-звонцы (Chironomidae, Diptera). ДНК-последовательность гена COI в последние годы нашла широкое применение в качестве штрих-кодовой для идентификации видов. Использование гена COI как критерия таксонов надвидового уровня затруднено в связи с его высокой нуклеотидной изменчивостью.

Нами установлены границы нуклеотидной и аминокислотной дивергенции COI между видами комаров-звонцов подсемейства Chironominae одного рода, одной трибы, разных триб, а также между видами подсемейств Chironominae и Orthoclaadiinae. Показано, что уровень аминокислотной дивергенции лучше нуклеотидной отображает молекулярные границы рода и трибы. Если уровень аминокислотной дивергенции лежит в пределах от 0 до 1.7%, то пара сравниваемых видов принадлежит одному роду; если в пределах от 1.7 до 4.0%, то одной трибе; если в пределах от 4.6 до 6.3%, то разным трибам; если более 7.9%, то разным подсемействам. Достоверность определения с использованием выявленных диапазонов составляет не менее 75%, в связи с чем границы дивергенции по аминокислотной последовательности COI между видами комаров-звонцов можно использовать как таксономические критерии рода, трибы и подсемейства.

Важной задачей молекулярной систематики является выявление границ дивергенции, характеризующих отличия представителей разных таксономических уровней – видов одного рода, разных родов, разных подсемейств и т.д. (Загоскин, 2009; Ковпак, 2010). Такие исследования приобретают особое значение при описании видов из обширных таксономических групп со сложной

морфологической систематикой. Одной из таких таксономических групп являются комары-звонцы (Chironomidae, Diptera) наиболее разнообразного по видовому составу подсемейства Chironominae. На данный момент в этом подсемействе насчитывается свыше 1500 видов и такие данные не окончательны, так как постоянно описываются новые виды (Макарченко, Макарченко, 2006).

Кроме того, таксономический статус многих уже известных представителей Chironominae остается неясным. Продолжается спор о систематическом положении ряда видов таких родов, как *Chironomus*, *Camptochironomus*, *Glyptotendipes*, *Polypedilum*, *Synendotendipes*, *Endochironomus*, *Tanytarsus* и т.д. (Martin, 1963; Панкратова, 1983; Weiderholm, 1983, 1986, 1989; Дурнова, 2010; Полуконова, 2003, 2005, 2007; Полуконова и др., 2005; Martin, 2010, и др.). Существующие разногласия в первую очередь связаны с отсутствием четких морфологических критериев при определении границы рода, трибы и подсемейства у комаров-звонцов (Beck, Beck, 1968; Lindeberg, 1971). Так, на наш взгляд (Полуконова, Демин, 2008; Демин и др., 2011), недостаточно четко обозначены морфологические границы трибы *Pseudochironomini* в подсемействе Chironominae, в результате остается неясным таксономический статус представителей родов *Pseudochironomus* и *Riethia*. Существующие ныне морфологические критерии не универсальны (Панкратова, 1983; Макаренченко, Макаренченко, 2006), поэтому при описании новых таксонов требуется индивидуальный подход, который выражает субъективное мнение исследователя. Дополнительные возможности в систематике открывает использование диапазонов уровня молекулярной дивергенции, характеризующих границы таких таксонов, как род, триба, подсемейство.

Для установления видовой принадлежности наиболее часто используется нуклеотидная последовательность первой субъединицы гена цитохром С оксидазы (COI), применяемая в настоящее время для штрихкодирования живых организмов (Ratnasingham, Hebert, 2007). Так, две особи принадлежат одному виду, если уровень молекулярной дивергенции гена COI между ними составляет менее 3% (Полуконова и др., 2009). Границы уровня дивергенции между представителями на уровне рода, трибы и подсемейства выявить намного сложнее из-за высокой изменчивости ДНК-последовательности гена COI. Однако даже приблизительные данные о границах молекулярной изменчивости таксонов (рода, трибы) внутри конкретной группы насекомых, такой, как комары-звонцы, могли бы существенно увеличить возможности систематиков, упростив определение систематического положения новых видов и видов со спорным таксономическим статусом.

Цель настоящего исследования – установить диапазоны нуклеотидной и аминокислотной изменчивости штрихкодированного гена COI у видов одного рода, одной и разных триб, разных

подсемейств и определить перспективность их применения в качестве таксономического критерия на примере комаров-звонцов подсемейств Chironominae и Orthoclaadiinae (Chironomidae, Diptera).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Использованы личинки IV возраста комаров-звонцов, собранные в 2007–2009 гг. на территории Саратовской, Самарской, Воронежской областей и в Казахстане (табл. 1). В работе также использованы сиквенсы гена COI двукрылых насекомых (Diptera), депонированные в GenBank (табл. 2–4).

Определение первичной нуклеотидной последовательности гена проводили на секвенаторе ABI3130 (Applied Biosystems). Для коррекции полученных последовательностей использовали программу ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>). Выравнивание проводили с помощью ClustalW (<http://www.genebee.msu.su/clustal/>). Расчет филогенетических дистанций с применением модели *p*-distance осуществляли в программе Mega4 (<http://www.megasoftware.net/>). Для проведения построений и оценки достоверности отличий между выявленными диапазонами дивергенции таксономических групп использовали U-критерий Манна–Уитни, реализованный в пакете программ Statistica 6.

Длина анализируемого фрагмента нуклеотидной последовательности гена COI составила 535 п.н. (с 100 по 634 п.н.). Всего для анализа были использованы последовательности 139 представителей комаров-звонцов подсемейств Chironominae (129 видов) и Orthoclaadiinae (10 видов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности нуклеотидной композиции гена COI

У 129 представителей подсемейства Chironominae на исследуемом участке гена COI (535 п.н.) среднее процентное соотношение оснований T/C/A/G составляет 38.1/18.4/27.9/15.6%. Количество AT пар в среднем в 1.9 раз выше GC пар, при этом разброс значений составляет ± 0.4 , что указывает на невысокое (до 20%) значение сдвига нуклеотидного состава. Соотношение транзиций (Ti) к трансверсиям (Tv) для пары видов составляет в среднем 0.86 (от 6.25 до 0.30). В пределах выбранного фрагмента 47.5% сайтов были изменчивыми, из них парсимониально информативные составляют 42.2%.

Таблица 1. Материал и места сбора комаров-звонцов

Вид	Место и дата сбора
<i>Chironomus plumosus</i> (Linnaeus, 1758)	оз. Калач, г. Новоузенск, Саратовская обл., 02.2007 г.
<i>Ch. commutatus</i> Keyl, 1960	оз. Сазанка, г. Энгельс, Саратовская обл., 07.2008 г.
<i>Ch. bernensis</i> Klotzli, 1973	оз. г. Тольятти, Самарская обл., 07.2008 г.
<i>Baeotendipes noctivaga</i> Kieffer, 1911	Аральское море, Казахстан, 08.2008 г.
<i>Dicrotendipes nervosus</i> Staeger, 1839	р. Волга, г. Саратов, Саратовская обл., 07.2009 г.*
<i>Endochironomus albipennis</i> Meigen, 1830	оз. Сазанка, г. Энгельс, Саратовская обл., 07.2009 г.*
<i>E. tendens</i> (Fabricius, 1775)	р. Красавка, с. Ново-Александровка, Саратовская обл., 07.2009 г.*
<i>Glyptotendipes barbipes</i> Staeger, 1839	р. Узень, г. Новоузенск, Саратовская обл., 08.2007 г.
<i>G. glaucus</i> Meigen, 1804	р. Волга, г. Энгельс Саратовской обл., 07.2009 г.*
<i>G. gripekoveni</i> (Kieffer, 1913)	оз. г. Маркс Саратовской обл., 07.2009 г.*
<i>G. imbecillis</i> Walker, 1856	р. Волга, пос. Узморье Саратовской обл., 07.2009 г.*
<i>G. mancurianus</i> Edwards, 1929	оз. г. Маркс Саратовской обл., 07.2009 г.*
<i>P. (Pentapedilum) sordens</i> (Van der Wulp, 1874)	р. Красавка, пос. Михайловка Саратовской обл., 07.2009 г.*
<i>Synendotendipes kaluginae</i> Durnova, 2010	оз. Холодное, г. Энгельс, Саратовская обл., 07.2009 г.*
<i>Xenochironomus xenolabis</i> (Kieffer, 1916)	р. Красавка, пос. Ново-Александровка, Саратовская обл., 07.2009 г.* р. Терешка, пос. Черкасское Саратовской обл., 07.2009 г.*
<i>Cricotopus glacialis</i> Edwards, 1922	р. Волга, пос. Узморье, Саратовская обл., 07.2009 г.*

* Сбор и определение Н.А. Дурновой.

Уровень нуклеотидной дивергенции между представителями разного таксономического ранга в подсемействе Chironominae

Для выявления взаимосвязей между таксономическим статусом представителей подсемейства Chironominae и границами их нуклеотидной дивергенции построены диаграммы размаха, описывающие границы, в которых варьирует уровень дивергенции между попарно сравниваемыми нуклеотидными последовательностями гена COI (рис. 1), принадлежащими видам одинакового таксономического ранга. Всего проанализированы 4 группы, составленные видами:

I – одного рода (виды *Chironomus*, *Camptochironomus*, *Glyptotendipes*, *Kiefferulus*, *Endochironomus*, *Tanytarsus*, *Sergentia*, *Polypedilum*, *Micropsectra*, *Parapsectra*, *Rheotanytarsus*, *Cladotanytarsus*,

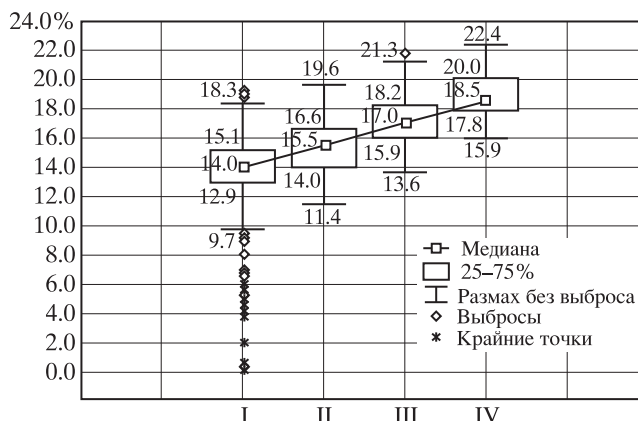


Рис. 1. Уровень нуклеотидной дивергенции гена COI между парами видов Chironomidae различного таксономического ранга.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности гена COI комаров-звонцов трибы Chironomini и Pseudochironomini

Вид	Accession №	Вид	Accession №
<i>Chironomus heterodontatus</i> Konstantinov, 1956	AF192199	<i>Microchironomus</i> sp.	AY752664
<i>Ch. cingulatus</i> Meigen, 1830	AF192191	<i>Cladopelma</i> sp.	AY752675
<i>Ch. circumdatus</i> Kieffer, 1916	AF192215	<i>Einfeldia</i> sp.	DQ648212
<i>Ch. nepeanensis</i> Skuse, 1889	AF192216	<i>Camptochironomus tentans</i> Fabricius, 1805	AF110158
<i>Ch. novosibiricus</i> Kiknadze, Siirin, Kerkis, 1993	AF192197	<i>C. pallidivittatus</i> Malloch, 1915	AF110164
<i>Ch. acutiventris</i> Wülker, Ryser, 1983	AF192200	<i>Benthalia dissidens</i> (Walker)	DQ648198
<i>Ch. duplex</i> Walker, 1856	AF192210	<i>Cryptochironomus</i> sp.	DQ648210
<i>Ch. javanus</i> Kieffer, 1924	DQ648203	<i>Riethia stictoptera</i> Kieffer, 1917	DQ648229
<i>Ch. whitseli</i> Sublette and Sublette, 1974	DQ648208	<i>Axarus</i> sp.	DQ648197
<i>Ch. duplex</i> Walker, 1856	AF192210	<i>Kiefferulus brevibucca</i> (Kieffer 1922)	DQ648215
<i>Ch. sororius</i> Wülker, 1973	AF192198	<i>K. intertinctus</i> (Skuse 1889)	DQ648219
<i>Ch. pseudothummi</i> Strenzke, 1959	AF192205	<i>K. longilobus</i> (Kieffer 1916)	DQ648220
<i>Ch. tuvanicus</i> Kiknadze, Siirin, Wülker, 1993	AF192196	<i>K. martini</i> Freeman, 1961	DQ648221
<i>Ch. annularius</i> Meigen, 1804	AF192189	<i>Goeldichironomus devineyae</i> Beck, 1961	DQ648214
<i>Ch. suwai</i> Golybina, Martin, Kiknadze et al., 2003	DQ648206	<i>Xenochironomus xenolabis</i> Thienemann, Kieffer, 1916	DQ648230
<i>Ch. jacksoni</i> Guryev et al., 2001	AF192207	<i>Polypedilum pterospilus</i> Townes, 1945	GU565728
<i>Ch. entis</i> Schobanov, 1989	AF192195	<i>P. nubifer</i> (Skuse, 1889)	AY752679
<i>Ch. crassiforceps</i> Kieffer, 1916	AF192212	<i>Pseudochironomus</i> sp.	DQ648228
<i>Ch. tepperi</i> Skuse, 1889	AF192211	<i>S. electa</i> Proviz et al., 1999	AF116585
<i>Ch. luridus</i> Strenzke, 1959	AF192203	<i>S. affinis</i> Proviz, Proviz, 1999	AF116588
<i>Ch. nuditarsis</i> Keyi, 1961	DQ910571	<i>S. nebulosa</i> Linevich, Aleksan- drov, Proviz, 1984	AF116583
<i>Ch. maturus</i> Johannsen, 1908	DQ648204	<i>S. baicalensis</i> Chernovskij, 1949	AF116586
<i>Ch. oppositus</i> Walker, 1856	AF110155	<i>S. flavodentata</i> Chernovskij, 1949	AF116584
<i>Lipiniella</i> sp.	DQ648226	<i>Sergentia baueri</i> Wülker, Kiknadze, Kerkis, Nevers, 1999	AF116589

Paratanytarsus, *Stempellinella*, *Dicrotendipes* – всего 866 наблюдений),

II – разных родов внутри одной трибы (по одному представителю от *Chironomus*, *Camptochironomus*, *Glyptotendipes*, *Kiefferulus*, *Endochironomus*, *Tanytarsus*, *Sergentia*, *Polypedilum*, *Micropsectra*, *Parapsectra*, *Rheotanytarsus*, *Cladotanytarsus*, *Paratanytarsus*, *Dicrotendipes*, *Cladopelma*, *Microchironomus*, *Baetendipes*, *Benthalia*, *Synendotendipes*, *Axarus*, *Krenopsectra*, *Virgotanytarsus*, *Stem-*

pellinella, *Xenochironomus*, *Lipiniella*, *Einfeldia*, *Goeldichironomus*, *Cryptochironomus* – всего 198 наблюдений),

III – разных триб (Chironomini в ее современных границах (21 род) и Tanytarsini (9 родов) – всего 180 наблюдений) и

IV – разных подсемейств (Chironominae (30 родов) и Orthoclaadiinae (*Crycotopus* – 6 видов, *Orthocladus* – 4 вида) – всего 55 наблюдений).

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности гена COI комаров-звонцов трибы Tanytarsini

Вид	Accession №	Вид	Accession №
<i>Tanytarsus edwardi</i> Glover, 1973	DQ393875	<i>Paratanytarsus kathleenae</i> Glover, 1973	DQ393889
<i>T. inextentus</i> Skuse, 1889	DQ393870	<i>Par. grimmii</i> (Schneider, 1885)	AY752669
<i>T. barbitarsis</i> Freeman, 1961	DQ393880	<i>Par. austriacus</i> (Kieffer, 1924)	GU073185
<i>T. semibarbitarsus</i> Glover, 1973	DQ393868	<i>Par. dissimilis</i> (Johannsen, 1905)	AM398752
<i>T. bispinosus</i> Freeman, 1961	DQ393857	<i>Micropsectra seguyi</i> Cacas, Laville, 1990	AM398727
<i>T. heliomesonyctios</i> Langton, 1999	GU073192	<i>M. roseiventris</i> Kieffer, 1909	AM398721
<i>T. miriforceps</i> (Kieffer, 1921)	GU073207	<i>M. recurvata</i> Goetghebuer, 1928	FN796510
<i>T. inaequalis</i> Goetghebuer, 1921	GU073206	<i>M. oberaarensis</i> Stur, Ekrem, 2008	AM398735
<i>T. herrmanni</i> Ekrem, Sublette, Sublette, 2003	GU073204	<i>M. kurobemaclata</i> (Sasa and Okazawa, 1992)	AM398700
<i>T. allcis</i> Sublette, 1964	GU073196	<i>M. borealis</i> (Kieffer, 1922)	FN796499
<i>T. volgensis</i> Miseiko, 1967	GU073221	<i>M. pallidula</i> (Meigen, 1830)	AM398712
<i>T. wirthi</i> Ekrem, Sublette, Sublette, 2003	GU073223	<i>M. logani</i> (Johannsen, 1928)	AM398705
<i>T. telmaticus</i> Lindeberg, 1959	GU073220	<i>M. atrofasciata</i> (Kieffer, 1911)	FN796497
<i>T. dendyi</i> Sublette, 1964	GU073200	<i>M. sofiae</i> Stur, 2006	AM398731
<i>T. aculeatus</i> Brundin, 1949	GU073194	<i>M. lacustris</i> Sawedal, 1975	FN796501
<i>T. gracilentus</i> Holmgren, 1883	GU073202	<i>M. junci</i> Meigen, 1818	AM398698
<i>T. elisabethae</i> Ekrem, 2001	AM084263	<i>M. attenuate</i> Reiss, 1969	AM398688
<i>T. mendax</i> Reiss, 1971	AM084269	<i>M. appendica</i> Stur, 2006	AM398685
<i>T. hjulorum</i> Ekrem, Stur, unpub.	AM084265	<i>M. schrankelae</i> Stur, 2006	AM398725
<i>T. luctuosus</i> Freeman, 1958	AM084267	<i>M. polita</i> (Malloch, 1919)	AM398717
<i>T. aterrimus</i> Freeman, 1954	AM084262	<i>M. lindrothi</i> Goetghebuer, 1931	FN796505
<i>Stempellinella ciliaris</i> Goetghebuer, 1944	EF585415	<i>M. contracta</i> Reiss, 1965	AM398693
<i>St. edwardsi</i> Spies, Saether, 2004	EF585418	<i>M. pharetrophora</i> Fittkau, Reiss, 1999	AM398715
<i>St. boltoni</i> Ekrem, 2007	EF585410	<i>M. notescens</i> (Walker, 1856)	AM398711
<i>St. truncata</i>	EF585431	<i>M. radialis</i> Goetghebuer, 1939	GU073179
<i>St. coronate</i> Inoue, Kawai, Imabayashi, 2004	EF585417	<i>Krenopsectra acuta</i> (Goetghebuer, 1934)	FN796496
<i>St. saltuum</i> (Goetghebuer, 1921)	EF585427	<i>Parapsectra mendli</i> Reiss, 1983	AM398738
<i>St. brevis</i> (Edwards, 1929)	EF585413	<i>Parap. nana</i> (Meigen, 1818)	AM398739
<i>St. fimbriata</i> Ekrem, 2007	EF585421	<i>Parap. uliginosa</i> Reiss, 1969	FN796516
<i>St. tamaseptima</i> Sasa, 1980	EF585428	<i>Rheotanytarsus</i> sp.	AM398767
<i>Cladotanytarsus</i> sp.	DQ393864	<i>Rh. pentapoda</i> (Goetghebuer, 1934)	AM398766
<i>Cl. bilinearis</i> Glover, 1973	DQ393888	<i>Virgatanytarsus aboensis</i> Harrison, 2004	AM398773
<i>Cl. australomancus</i> Glover, 1973	DQ393882		

Уровень нуклеотидной дивергенции между парно сравниваемыми представителями каждой из групп выражали в процентах от общего количества нуклеотидов (535 п.н.).

Получены значения минимального и максимального размахов уровня дивергенции; среднее значение уровня дивергенции (медиана) для каж-

дой из таксономических групп; границы областей, на которые приходится 50% (от 25 до 75%) всех выявленных значений уровня дивергенции (межквартильный размах) (рис. 1). Установлена тенденция к возрастанию уровня дивергенции с увеличением таксономического статуса сравниваемых представителей, изображенная в виде

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности гена COI двукрылых насекомых семейств Chironomidae, Ceratopogonidae, Acroceridae, взятых в качестве внешней группы

Вид	Accession №
<i>Orthocladus robacki</i> Sponis, 1977	DQ865178
<i>O. dorenius</i> Roback, 1957	DQ865176
<i>O. nigritus</i> Malloch, 1915	DQ865179
<i>O. oliveri</i> Sponis, 1977	DQ865177
<i>Cricotopus trifascia</i> Edwards, 1929	DQ865182
<i>Cr. sylvestris</i> (Fabricius, 1794)	DQ865184
<i>Cr. bicinctus</i> (Meigen, 1818)	DQ865175
<i>Cr. triannulatus</i> (Macquart, 1826)	DQ865174
<i>Cr. tremulus</i> (Linnaeus, 1758)	DQ865183
<i>Cr. tristis</i> Hirvenoja, 1973	DQ865181

графика, построенного по средним значениям дивергенции (рис. 1).

Для оценки достоверности различий между полученными диапазонами дивергенции для каждой из таксономических групп использован U-критерий Манна–Уитни (Mann, Whitney, 1947), эмпирическое значение которого отражает то, насколько велика зона совпадения между сравниваемыми группами. Поэтому достоверность различий между выборками будет возрастать с уменьшением значения U-критерия.

Получены следующие диапазоны нуклеотидной изменчивости: от 4.0 до 18.3% между видами одного рода; от 11.4 до 19.6% (15.5%) между видами разных родов одной трибы; от 13.6 до 21.3% (17.0%) – между видами разных триб и от 15.9% между видами разных подсемейств.

Установленные нами значения U-критерия уменьшаются с увеличением таксономического статуса сравниваемых групп (табл. 5), что свидетельствует об увеличении достоверности различий. Иначе говоря, достоверность различий меж-

ду диапазонами нуклеотидной и аминокислотной дивергенции сравниваемых групп возрастает с увеличением их таксономического статуса.

Неперекрывающиеся области межквартильных размахов каждой из описанных нами групп отражают максимальное различие – с достоверностью $\geq 75\%$ (рис. 1). В указанных областях межквартильных размахов диапазоны, достоверно отличающие группы II и III друг от друга, были очень узкими: от 15.1 до 15.9% – между видами разных родов одной трибы; от 16.6 до 17.8% – между видами разных триб. Группа I, включающая виды одного рода, достоверно отличается от групп II и III более широким диапазоном уровня нуклеотидной дивергенции – от 4.0 до 14.0%, что может быть связано с низким насыщением нуклеотидной последовательности заменами у видов одного рода.

Особенности композиции аминокислотной последовательности, кодируемой геном COI

Для выявления особенностей аминокислотного состава белковой последовательности, кодируемой геном COI, его ДНК-последовательности, представленные в виде ранее сформированных матриц, транслированы нами в аминокислотные с учетом особенностей митохондриального генетического кода (Jukes, Osawa, 1990).

Протяженность анализируемого фрагмента аминокислотной последовательности COI составила 178 аминокислот. Состав фрагмента характеризовался присутствием 20 аминокислот. Отмечено повышенное содержание лейцина – 15.51% и пониженное – лизина и цистеина – по 0.01%. Эти две аминокислоты были необязательными компонентами последовательности и отмечены лишь у двух пар видов *Sergentia flavodentata* и *Chironomus jacksoni* (цистеин), *Polypedilym pterospilus* и *Stenochironomus gibbus* (лизин). Общее количество переменных аминокислотных сайтов составляет 29.2%, что в 1.6 раза меньше

Таблица 5. Оценка достоверности различий в значениях дивергенции групп разного таксономического уровня по ДНК-последовательности COI на основе U-критерия

Сравниваемые группы	Сравниваемые группы			
	I	II	III	IV
I		<0.001	<0.001	<0.001
II	51 693		<0.001	<0.001
III	14 449.5	8560		<0.001
IV	815	782.5	2368.5	

Примечание. Жирным шрифтом ниже диагонали указаны значения U-критерия, выше диагонали дана оценка достоверности U-критерия.

вариабельности нуклеотидной последовательности. Количество парсимониально значимых сайтов составляет 14.0%.

Уровень аминокислотной дивергенции между представителями групп разного таксономического ранга в подсемействе Chironominae

Уровень аминокислотной дивергенции между представителями разного таксономического ранга в подсемействе Chironominae определяли по тому же принципу, что и уровень нуклеотидной дивергенции.

У использованных для анализа комаров-звонцов подсемейства Chironominae выявленный уровень аминокислотной дивергенции лежит в пределах: от 0 до 2.9% (1.1%) между видами одного рода; от 0 до 7.4% (2.7%) – видами разных родов одной трибы; от 2.9 до 8.6% (5.1%) – видами разных триб и от 6.1% – видами разных подсемейств. С наибольшей достоверностью ($\geq 75\%$), пара сравниваемых видов принадлежит одному роду, если уровень аминокислотной дивергенции $< 1.7\%$; одной трибе – в интервале от 1.7 до 4.0%; разным трибам – в интервале от 4.6 до 6.3%; разным подсемействам – $> 7.9\%$.

Тенденция к увеличению уровня дивергенции, а также уменьшения значений U-критерия с возрастанием таксономического ранга от рода к подсемейству (группы II–IV) более выражена при использовании аминокислотных различий (табл. 6), так как аминокислотные последовательности в сравнении с нуклеотидными обладают большей консервативностью. При попарном сравнении аминокислотных последовательностей COI эволюционно удаленных видов филогенетический сигнал проявляется отчетливей по сравнению с использованием быстро эволюционирующих нуклеотидных последовательностей.

Так, при сравнении значений нуклеотидной дивергенции (табл. 5) сходство групп II и III в 6 раз ниже, чем I и II групп, а сходство III и IV групп

Таблица 6. Оценка достоверности различий в значениях дивергенции групп разного таксономического уровня по аминокислотной последовательности COI на основе U-критерия (снизу жирным шрифтом указаны значения U-критерия, сверху – оценка достоверности U-критерия)

Сравниваемые группы	Сравниваемые группы			
	I	II	III	IV
I		<0.001	<0.001	<0.001
II	51 693		<0.001	<0.001
III	769	8560		<0.001
IV	0	83	2368.5	

Примечание. Жирным шрифтом ниже диагонали указаны значения U-критерия, выше диагонали дана оценка достоверности U-критерия.

в 3.6 раза ниже сходства II и III групп; при сравнении значений аминокислотной дивергенции (табл. 6) сходство II и III групп в 12 раз ниже I и II групп, а сходство III и IV групп в 3.7 раза ниже сходства II и III групп. Сравнение результатов оценок U-критерия, полученных с использованием нуклеотидных и аминокислотных дистанций, приведены в табл. 7.

Более низкая достоверность отличий между I и II группами может быть объяснена наличием у комаров-звонцов в подсемействе Chironominae «сборных» таксономических групп, например поли- и парафилетических родов.

На диаграмме аминокислотной изменчивости (рис. 2) диапазоны межквартильного размаха уровня дивергенции не перекрываются между группами II–IV, средние значения уровня дивергенции между соседними группами различаются в 2 раза. На нуклеотидной диаграмме (рис. 1) между всеми группами наблюдается перекрывание диапазонов межквартильного размаха, средние значения уровня дивергенции соседних групп отличаются всего на 1.1. В связи с этим для описания молекулярных границ изменчивости между видами одного рода (в том случае, если виды эво-

Таблица 7. Сравнение достоверности различий нуклеотидной и аминокислотной дивергенции групп разного таксономического уровня

Группа	ДНК-последовательность		Аминокислотная последовательность		Соотношение различий по ДНК/аминокислотная последовательности
	U-критерий	p-оценка	U-критерий	p-оценка	
I–II	51 693	<0.001	42 817	<0.001	1.2
II–III	8560	<0.001	3530	<0.001	2.4
III–IV	2368.5	<0.001	949	<0.001	2.5

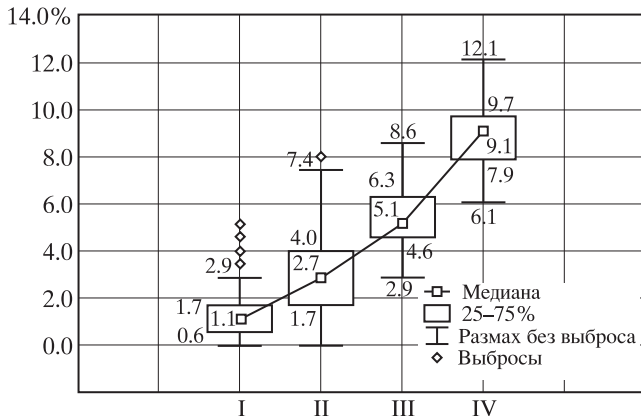


Рис. 2. Уровень аминокислотной изменчивости COI между парами видов Chironomidae различного таксономического ранга.

люционно удалены друг от друга), разных родов одной трибы, разных триб и разных подсемейств целесообразнее использовать аминокислотную последовательность гена COI.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДИАПАЗОНОВ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНА COI ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ РЯДА ТАКСОНОВ КОМАРОВ-ЗВОНЦОВ

Положение *Stenochironomus gibbus* в семействе Chironomidae

Stenochironomus gibbus традиционно относится систематиками к трибе Chironomini подсемейства Chironominae (Макарченко, Макарченко, 2006). Однако по морфологическим и кариотипическим признакам *S. gibbus* сильно отличается от всех других представителей как трибы Chironomini, так и подсемейства Chironominae (Черновский, 1949;

Дурнова, 2010). Так, особенностью организации полигенных хромосом *S. gibbus* является слабая степень полиитии (Дурнова, 2010), характерная для примитивных подсемейств комаров-звонцов, таких, как Tanyrodinae (Белянина, 1983). В отличие от остальных представителей Chironominae, являющихся фильтраторами или реже факультативными хищниками, *S. gibbus* питается древесиной (Черновский, 1949).

Ранее (Демин, 2011) получена схема, отображающая ход эволюции аминокислотной последовательности гена мтДНК COI ряда представителей комаров-звонцов из подсемейств Chironominae и Orthoclaadiinae. В обобщенном виде эта схема приведена на рис. 3. На схеме *Stenochironomus* формирует ветвь, удаленную от Chironominae, на основе чего нами высказано мнение о возможности выделения *Stenochironomus* в самостоятельное подсемейство (Демин и др., 2011).

Проведенный анализ уровня дивергенции показал, что от представителей трибы Chironomini белковая последовательность COI *S. gibbus* отличается на 9.6–12.0% (11.2%), что соответствует уровню изменчивости аминокислотной последовательности COI подсемейств Chironominae и Orthoclaadiinae (от 6.1%). Полученные данные свидетельствуют о несоответствии таксономического положения *S. gibbus* и опровергают его принадлежность к трибе Chironomini.

Состав трибы Pseudochironomini в подсемействе Chironominae

Согласно современной систематике (Макарченко, Макарченко, 2006) подсемейство Chironominae включает три трибы: Chironomini, Tanytarsini, Pseudochironomini. Представители первых двух триб хорошо различаются по морфологии. Представители трибы Pseudochironomini таких четких ключей не имеют и в ряде определителей (Панкратова, 1983; Макарченко, Макарченко, 2006) описываются в составе трибы Chironomini.

Ранее (Демин и др., 2011) нами было показано, что в подсемействе Chironominae (исключая *Stenochironomus*) существуют три филогенетические линии гена COI, соответствующие трибам Tanytarsini (=Tanytarsini); Pseudochironomini (=Pseudochironomini-Riethia + Endochironomus + Synendotendipes + Polypedilum + Sergentia) и Chironomini (=Chironomini-Stenochironomus-Endochironomus-Synendotendipes-Polypedilum-Sergentia+Riethia). Положение *Pseudochironomus* вместе с представителями трибы Chironomini: *Endochironomus*, *Synendotendipes*, *Polypedilum* и *Sergentia* указывает

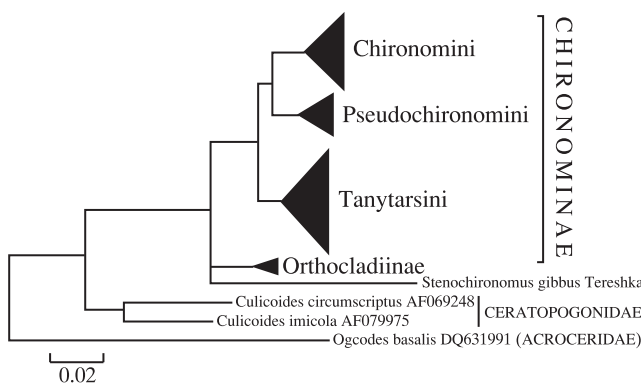


Рис. 3. Обобщенная филогенетическая схема подсемейства Chironominae, основанная на ДНК-последовательности COI. Квадратными скобками обозначены кластеры. В узлах указаны значения поддержки ML/Bayes/ME.

на возможность пересмотра состава трибы *Pseudochironomini*. Обособленное положение *Endochironomus*, *Synendotendipes*, *Polypedilum*, *Pseudochironomus* и *Sergentia* подтверждается строением ротового аппарата личинок (ментума и вентроментальных пластинок) и крыльев имаго (наличием макротрихий у *Polypedilum* и *Sergentia*) (Goetghebuer, 1937; Шилова, 1976; Панкратова, 1983; Макаrenchенко, Макаrenchенко, 2006).

Проведенные нами исследования показывают, что виды *Endochironomus*, *Synendotendipes*, *Polypedilum*, *Pseudochironomus* и *Sergentia* отличаются от остальных рассмотренных нами представителей *Chironomini* в среднем на 5.17% (2.87–8.05%). От представителей трибы *Tanytarsini* эти рода отличаются в среднем на 5.53% (2.82–9.60%). При этом разница между оставшимися родами трибы *Chironomini* и родами *Tanytarsini* составляет в среднем 5.90% (2.29–9.71%). Установленные диапазоны изменчивости между тремя эволюционными ветвями соответствуют изменчивости аминокислотной последовательности COI представителей разных триб – в среднем 5.10%. Полученные данные позволяют утверждать, что выявленные нами ранее три эволюционные линии генетически равноудалены, что подтверждает наличие разных триб.

Структура рода *Tanytarsus* в подсемействе *Chironominae*

Tanytarsus – наиболее обширный род трибы *Tanytarsini*. Согласно проведенным нами молекулярным реконструкциям (Демин и др., 2011), монофилетичность данного рода в его современных границах вызывает сомнение. На полученной эволюционной схеме отдельные представители *Tanytarsus* группируются с представителями других родов трибы *Tanytarsini*: *Cladotanytarsus*, *Paratanytarsus* и *Micropsectra* (Демин и др., 2011). Такое объединение согласуется и с морфологическими данными. В частности, А.А. Черновский (1949) рассматривал три ныне отдельных рода: *Cladotanytarsus*, *Paratanytarsus*, а также *Corynocera* как подрода р. *Tanytarsus*.

Анализ изменчивости аминокислотной последовательности COI внутри *Tanytarsus* показывает, что среднее значение уровня дивергенции между его видами – 2.56% (0–5.6%) соответствует уровню различий видов из разных родов. В то же время среднее значение уровня дивергенции COI внутри таких сопоставимых с *Tanytarsus* по численности родов, как *Chironomus* (0.058% (0–2.25%)), *Micropsectra* (0.093% (0–2.25%)) и *Stempellinella* (1.110% (0–2.25%)), не превыша-

ет уровня дивергенции видов одного рода – в среднем 1.1% (0–1.70%) (рис. 2). Значительное смещение уровня дивергенции аминокислотной последовательности COI видов *Tanytarsus* от установленного нами среднего для видов одного рода значения указывает на высокую вероятность его полифилетического происхождения.

Таким образом, средние значения диапазона изменчивости аминокислотной последовательности штрихкодowego гена COI у комаров-звонцов – между видами одного рода (1.1%), разных родов одной трибы (2.7%), разных триб (5.1%) и разных подсемейств (9.1%) – отражают повышение уровня молекулярно-генетических различий между таксонами от вида к подсемейству. Молекулярные различия между видами комаров-звонцов достоверно возрастают в этом ряду соответственно: <1.7% – 1.7–4.0% – 4.6–6.3% – > 7.9%. Полученные нами выводы позволяют заключить, что диапазоны изменчивости аминокислотной последовательности COI между видами комаров-звонцов можно использовать как таксономические критерии рода, трибы и подсемейства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белянина С.И., 1983. Кариотипический анализ хирономид (*Chironomidae*, *Diptera*) фауны СССР: Автореф. дис. докт. биол. наук. М.: ИЭМЭЖ АН СССР. 39 с.
- Демин А.Г., 2011. Применение штрихкодowego гена COI в филогении и систематике таксонов с высоким видовым разнообразием на примере комаров-звонцов подсемейства *Chironominae* (*Chironomidae*, *Diptera*): Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: Ин-т общей генетики РАН. 26 с.
- Демин А.Г., Полуконова Н.В., Мюге Н.С., 2011. Молекулярная филогения и время дивергенции комаров-звонцов (*Chironomidae*, *Nematocera*, *Diptera*) на основе частичной последовательности гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (COI) // Генетика. Т. 47. № 10. С. 1315–1327.
- Дурнова Н.А., 2010. Цитогенетические особенности *Stenochironomus gibbus* F. (*Diptera*, *Chironomidae*) // Цитология. Т. 52. № 7. С. 76–80.
- Загоскин М.В., 2009. Сравнительный анализ структурной организации кластера рибосомных генов ракообразных: Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: ИОГЕН РАН. 26 с.
- Ковпак Н.Е., 2010. Внутривидовая изменчивость и филогенетические отношения корюшковых рыб России: Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток: Дальнаука. 23 с.
- Макаrenchенко Е.А., Макаrenchенко М.А., 2006. Хирономиды // Определитель насекомых Дальнего Востока

- России. Т. 6. Двукрылые и блохи. Ч. 4 / Под ред. Лера П.А. Владивосток: Дальнаука. 936 с.
- Панкратова В.Я., 1983. Личинки и куколки подсемейства Chironominae фауны СССР (Diptera, Chironomidae). Л.: Наука. 296 с.
- Полуконова Н.В., 2003. Филогенетические связи близкородственных видов *Chironomus* (Chironomidae, Diptera) // Тр. Рус. энтомол. о-ва. Т. 74. С. 71–80.
- Полуконова Н.В., 2005. Морфологическая и хромосомная дифференциация комаров-звонцов (Chironomidae, Diptera) в процессе видообразования: Автореф. дис. докт. биол. наук. М.: ИБР РАН. 50 с.
- Полуконова Н.В., 2007. Обсуждение статуса солоновато-водных *Chironomus albidus* Konst и *Ch. paraalbidus* Beljanina et al. 2004 в системе рода *Chironomus* Meigen 1803 (Chironomidae, Diptera) // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Вып. 6. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. С. 47–50.
- Полуконова Н.В., Демин А.Г., 2008. Новые данные по молекулярной филогении комаров-звонцов (Chironomidae, Nematocera) подсемейства Chironominae на основе генов мтДНК // Тр. Ставропольского отд. рус. энтомол. о-ва. Матер. Международ. научно-практической конф. (г. Ставрополь, 10–12 сентября 2008 г.). С. 248–253.
- Полуконова Н.В., Белянина С.И., Зинченко Т.Д., 2005. Новый вид комара-звонца рода *Chironomus* – *Chironomus paraalbidus*, sp. n. (Chironomidae, Diptera) из Каспийского моря // Зоол. журн. Т. 85. № 4. С. 200–205.
- Полуконова Н.В., Демин А.Г., Шайкевич Е.В., Мюге Н.С., 2009. Сравнение *Chironomus usenicus* и *Ch. curabilis* с видами группы plumosus (Diptera) по гену митохондриальной днк COI и рисунку дисков политенных хромосом // Генетика. Т. 45. № 8. С. 1–7.
- Черновский А.А., 1949. Определитель личинок комаров семейства Tendipedidae. М.; Л.: АН СССР. 182 с.
- Шилова А.И., 1976. Хируномиды Рыбинского водохранилища. Л.: Наука. 251 с.
- Beck W.M., Beck E.C., 1968. The concept of genus in the family Chironomidae // Ann. Zool. Fenn. № 5. P. 14–16.
- Goetghebuer M., 1937. Tendipedidae – Tendipedinae // Lindner. Die Fliegen der palaearktischen Region. Bd. 107. S. 1–49.
- Jukes T.H., Osawa S., 1990. The genetic code in mitochondria and chloroplasts // Cellular and Molecular Life Sciences. V. 46. P. 1117–1126.
- Lindeberg B., 1971. The delimitation of genera among the Chironomidae (Diptera) // Can. Entomol. V. 103. № 3. P. 373–376.
- Mann H.B., Whitney D.R., 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other // Annals Mathematical Statistics. V. 18. P. 50–60.
- Martin I., 1963. The cytology and larval morphology of the Victorian representatives of the subgenus *Kiefferulus* of the genus *Chironomus* (Diptera, Nematocera) // Aust. J. Zool. V. 11. P. 301–322.
- Martin J., 2010. North american cytospecies of the genus *Chironomus* (includes *Camptochironomus*, *Chaetolabis*, *Lobochironomus*, and some *Einfeldia* (s.l.)). [Электронный документ] – Genetics Department, University of Melbourne, Victoria, Australia. (<http://www.genetics.unimelb.edu.au/martin/NACyfiles/NACChiron.html>).
- Ratnasingham S., Hebert P.D.N., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org) // Molecular Ecology Notes. V. 7. P. 355–364.
- Weiderholm T. (ed.), 1983. Chironomidae of the Holarctic region. Keys and diagnoses. Pt 1. Larvae // Ent. Scand. Suppl. 19. 457 p.
- Weiderholm T. (ed.), 1986. Chironomidae of the Holarctic region. Keys and diagnoses. Pt 2. Puppe // Ent. Scand. Suppl. 6. 501 p.
- Weiderholm T. (ed.), 1989. Chironomidae of the Holarctic region. Keys and diagnoses. Pt 3. Imago // Ent. Scand. Suppl. 11. 464 p.

Molecular criteria in insects systematics: Bar-coding gene COI range of variability as a taxonomic criterion for genus, tribe, and subfamily, with Chironominae and Orthocladiinae midges (Chironomidae, Diptera) as a case study

N. V. Polukonova¹, A. G. Djomin¹, N. S. Muge^{2,3}

¹*Saratov Medical State University, Chair of Biology, Pharmacognosy, and Botany,*

410012 Saratov, Bolshaya Kazachya, 112

e-mail: polukonovanv@yandex.ru, berg44@mail.ru

²*Koltzov Institute of Developmental Biology RAS*

119334 Moscow, Vavilova, 26

³*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography*

107140 Moscow, V. Krasnoselskaya, 17

e-mail: muge@mail.ru

Contemporary systematics of insects is based mainly on morphological traits. However, their usage is limited both by high variability and complications in comparisons of remote taxa due to low number of common traits. In whole, this leads to a somewhat subjective view when elaborating the system. Unlike morphological ones, molecular traits of taxa, revealed by use of marker genes such as gene cytochrome-c-oxidase I (COI), are less variable and more uniform, which allows them to be used as a criterion of genus, tribe, and subfamily for a wide range of organisms. Application of molecular criteria appears to be all the more important when constructing the system for groups of organisms with high morphological and specific diversity, such as midges (Chironomidae, Diptera). Last years, the DNA-sequence of gene COI is becoming widely used for species identification as a bar-coding one. Its use as a criterion for taxa of super-species level is hampered by its high nucleotide variability.

We established the bounds of COI nucleotide and aminoacid divergence between midge species of Chironominae subfamily belonging to the same genus, same tribe, different tribes, as well as between species of Chironominae and Orthocladiinae subfamilies. It is shown that the level of aminoacid divergence reflects molecular boundaries of genus and tribe better than nucleotide one. It can be stated that if the level of aminoacid divergence falls within the limits from 0 to 1.7% then a pair of species compared belongs to the same genus; if it falls within the limits from 1.7 to 4.0% then they belong to the same tribe; within the limits from 4.6 to 6.3% – to different tribes; if it exceeds 7.9% – to different subfamilies. The accuracy of identification when using these ranges turns out to be not less than 75%. In this regard, bounds of COI sequence aminoacid divergence may be used as taxonomic criteria for midge genus, tribe or subfamily.