

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МАРКЕРА 12S ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ФИЛОГАНИИ АКАНТОБДЕЛЛИД

© 2019 г. А. В. Болбат^{1, *}, Н. В. Сороковикова¹, И. А. Кайгородова^{1, 2}

¹Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664003 Россия

²Иркутский государственный университет, кафедра физико-химической биологии, Иркутск, 664003 Россия

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

Поступила в редакцию 17.01.2019 г.

После доработки 13.03.2019 г.

Принята к публикации 26.03.2019 г.

На протяжении многих лет к решению спорных вопросов филогении применяются методы, основанные на молекулярном анализе консервативных участков генетического материала для расчета дивергенции организмов. В настоящей работе использован маркерный фрагмент гена 12S рРНК для уточнения филогенетического положения малоизученной фаунистической группы — древних пиявкоподобных паразитов рода *Acanthobdella*. Мозаичное сочетание признаков малошешинковых червей (*Oligochaeta*) и современных пиявок (*Hirudinea*) указывает на промежуточное эволюционное положение акантобделл. Полученные результаты позволяют говорить о хорошей применимости маркерного фрагмента 12S для филогенетического анализа на уровне родов и видов. Реконструированная нами филогенетическая история акантобделл не согласуется с результатами ранних работ. Низкие статистические поддержки позволяют сделать заключение о непригодности маркера 12S для анализа филогении на надродовом уровне.

Ключевые слова: филогения, 12S, митохондриальная ДНК, Annelida, *Acanthobdella*.

DOI: 10.1134/S0016675819080034

Митохондриальный геном животных является хорошим объектом для филогенетических исследований ввиду его гаплоидного наследования, отсутствия интронов и ограниченной рекомбинации [1]. Митохондриальный ген 12S рРНК часто используется для реконструкции молекулярной филогении, видовой идентификации и филогеографии (например, [2–4]). Длина его маркерного фрагмента варьирует в пределах 350–450 пар нуклеотидов ввиду большого количества делеций и инсерций, и он применялся для изучения событий дивергенции средней и большой давности [5]. В то же время скорость эволюции гена 12S оценивается как высокая, что может привести к насыщению в третьей позиции и искажению результатов исследования филогении таксонов высшего ранга [1]. Данный маркер уже был успешно использован для видового разграничения при исследовании европейских плоских пиявок [6].

На сегодняшний день систематика кольчатых червей остается актуальной и претерпевает множество изменений. Положение различных таксонов данного типа не определено однозначно и

оценивается рядом авторов по-разному [7–9]. *Acanthobdella peledina*, обитающая в северной части Евразии [10] и, по некоторым данным, в Северной Америке [11, 12], является редким реликтовым пиявкоподобным паразитом, мозаично сочетающим в себе примитивные черты предков из подкласса малошешинковых червей с признаками, присущими современным пиявкам [10, 13]. Согласно современным представлениям о филогении и классификации, *A. peledina* вместе с сестринским видом *A. livanowi* занимает промежуточное эволюционное положение между подклассами *Oligochaeta* и *Hirudinea*. Впервые вывод об уникальном филогенетическом положении акантобделл был сделан Н.А. Ливановым в 1905 г. на основании исключительно морфологических характеристик [13]. Однако существовала и альтернативная точка зрения о принадлежности акантобделл к подклассу *Oligochaeta* и независимой конвергенции “пиявочных” черт [14]. Ввиду этого классификация пиявок и пиявкоподобных паразитов многократно менялась [10, 15, 16].

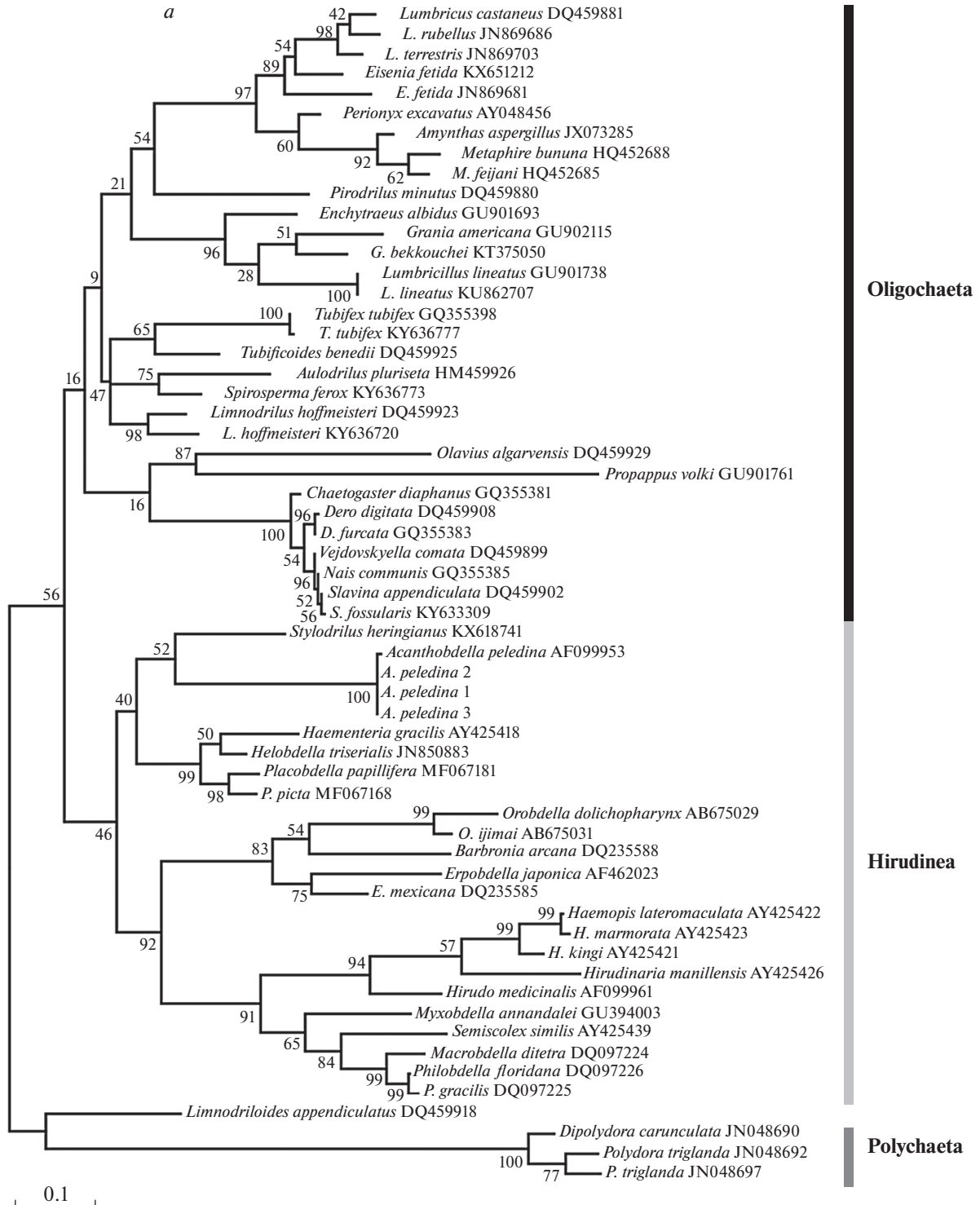


Рис. 1. ML-дерево (LogL= -4876.76) со значениями бутстреп-поддержек на 1000 репликах (а); BI-дерево со значениями байесовских апостериорных поддержек (б). Шкалы снизу соответствуют генетическим дистанциям.

Первые работы по молекулярной филогении акантобделл начали проводиться на рубеже XX и XXI вв. на основе анализа ядерного гена 18S рРНК и митохондриального гена малой единицы цитохромоксидазы COI [7, 17]. В данных работах по-

следовательности генов *A. peledina* уверенно кластеризовались в отдельные независимые ветви, занимающие промежуточное положение между подклассами Oligochaeta и Hirudinea, что согласуется с результатами морфологического анализа,

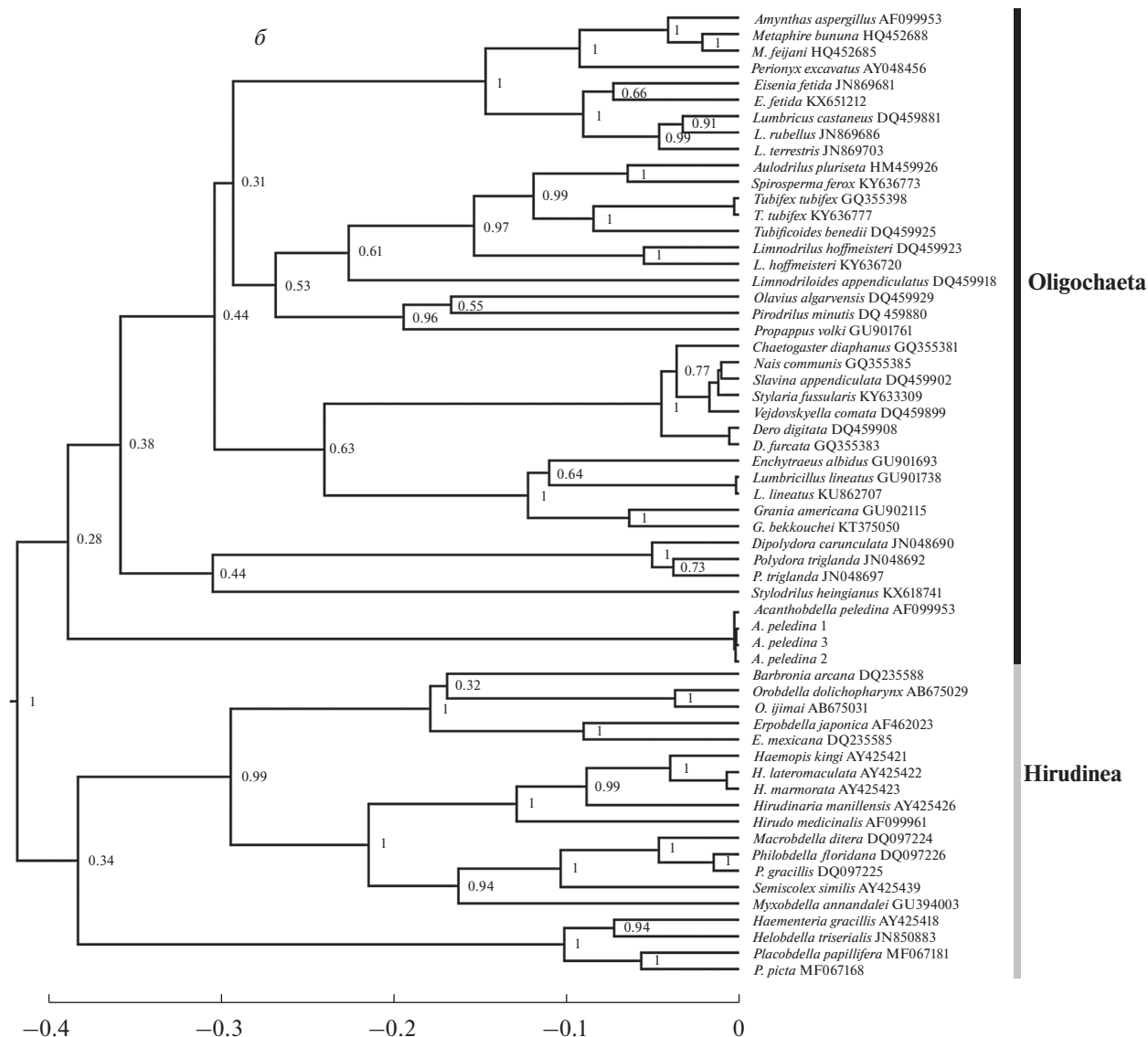


Рис. 1. Окончание.

проведенного Ливановым и подтвержденного современными морфологическими методами [18]. Однако несмотря на то что для *A. peledina* была получена последовательность гена 12S рРНК, она использовалась в филогенетическом анализе только как группа сравнения для укоренения дерева Hirudinea в целом [19]. Работ по установлению филогенетического положения представителей рода *Acanthobdella* по маркеру 12S проведено не было.

Для настоящей работы мы получили нуклеотидные последовательности образцов, собранных с хариуса и ленка на р. Верхняя Рассоха (приток р. Чечуй, бассейн р. Лена) в Киренском районе Иркутской области. Фрагмент гена 12S рРНК был

амплифицирован с использованием пары универсальных праймеров [20]. В анализ была включена последовательность 12S рРНК *A. peledina*, полученная в 1999 г. [19]. В качестве группы сравнения для филогенетического анализа из международной базы генетических данных GenBank были загружены последовательности 55 представителей Polychaeta, Oligochaeta и Hirudinea. Реконструкцию деревьев по методу максимального правдоподобия (ML) проводили с использованием модели GTR+G+I, рекомендованной ModelTest, с помощью пакета программ MEGA7 [21]. Для байесовского анализа филогении (BI) мы использовали пакет программного обеспечения BEAST v. 2.5.1 [22] с моделью замен GTR+G и начальными параметрами, рекомендованными jModelTest

v. 0.1 [23]. Сходимость ESS статистики байесовского анализа проверяли по программе Tracer v. 1.7.1.

При применении двух методов филогенетического анализа кластеризация различных последовательностей как на уровне видов, так и на уровне высших таксонов в целом совпала. При анализе таксонов высокого ранга выявлено отличие двух филогенетических схем, выраженное в разделении последовательностей на ML-дереве (рис. 1,а) на три массивные клады с четко выраженным расхождением олигохет и пиявок с многощетинковыми червями, выбранными нами в качестве внешней группы, тогда как при BI-анализе (рис. 1,б) последовательности разделились на две крупные клады, объединяющие представителей Oligochaeta и Hirudinea. При этом в ходе BI-анализа последовательности Polychaeta были отнесены в одну кладу с представителями Oligochaeta, что противоречит современной классификации [24].

Последовательности вида *A. peledina* заняли разное положение при реконструкции филогении этими двумя методами. На ML-дереве последовательности акантобделлид расположились вместе с представителями подкласса Hirudinea. По характеру ветвления данного дерева можно сделать вывод, что род *Acanthobdella* является типичным представителем современных пиявок, что противоречит результатам морфологического анализа и ранних работ по молекулярной филогении. Байесовская реконструкция сгруппировала последовательности акантобделл в отдельную ветвь, более близкую к подклассу Oligochaeta.

Расположение филогенетической линии олигохеты *Limnodriloides appendiculatus* нестабильно и зависит от метода реконструкции.

Высокие статистические поддержки на уровне родов и видов подтверждают пригодность 12S в качестве маркерного фрагмента для анализа филогении на этом уровне, а также для видовой идентификации. В обоих деревьях наблюдается снижение значений статистической достоверности узлов по мере удаления от листьев к корню, что свидетельствует о большом количестве равновероятных сценариев эволюции и неспособности данного маркерного участка давать разрешенные узлы на высоких таксономических уровнях.

Известно, что бутстреп-поддержки оказываются зачастую ниже, чем байесовские апостериорные поддержки, поскольку при построении бутстреп-реплик каждый раз используется частичный набор данных из матрицы [25]. Несколько низких поддержек на уровне видов, наблюдаемых в байесовском дереве, вероятно, связаны с недостаточным таксономическим разнообразием в наборе данных.

Низкие статистические поддержки узлов у корневой части деревьев свидетельствуют о недо-

статке филогенетической информации в маркерном участке гена 12S рРНК для реконструкции древней эволюционной истории. Однако применение разных алгоритмов филогенетической реконструкции позволило успешно объединить последовательности в группы видового и родового уровней и одновременно выявило невозможность составить однозначную картину более ранней эволюции. Таким образом, несмотря на непригодность маркерного участка гена 12S рРНК для разрешения филогенетических отношений таксонов высокого порядка (семейств, отрядов и классов), этот фрагмент может быть с успехом использован для анализа филогении на видовом и родовом уровнях вследствие его высокой специфичности.

Авторы выражают благодарность Виктору Тараканову за помощь в сборе образцов.

Сбор образцов проводили в рамках Государственного задания 0345-2019-0002 (АААА-А16-116122110066-1) “Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии в условиях глобальных экологических изменений”. Анализ образцов проводили в рамках гранта РФФИ № 17-29-05097.

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. Saccone C., De Giorgi C., Gissi C. et al. Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system // Gene. 1999. V. 238. P. 195–210.
2. Norris D.E., Klompen J.S.H., Black W.C. Comparison of the mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA genes in resolving phylogenetic relationships among hard ticks (Acari: Ixodidae) // Annals Entomol. Soc. America. 1999. V. 92(1). P. 117–129. <https://doi.org/10.1093/aesa/92.1.117>
3. Kaewkrajang N., Grootaert P., Boonrotpong S. Genetic variation of the long-legged flies phacaspis mitis complex (Diptera: Dolichopodidae) in peninsular Thailand inferred from three mitochondrial genes // J. Insect. Sci. 2018. V. 18(6): 6. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey024>
4. Mirzaei M., Ghahvei Y., Lefoulon E. et al. Morphological and molecular characterization of *Onchocerca fasciata* (Nematoda, Onchocercidae) from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Iran // Parasite. 2018. V. 25: 50. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018045>
5. Patwardhan A., Ray S., Roy A. Molecular markers in phylogenetic studies – a review // J. Phylogen. Evol. Biol. 2014. V. 2(2): 131. <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>
6. Trontelj P. *Glossiphonia slovacica* (Košel, 1973) (Hirudinea: Glossiphoniidae) iz Save pri Čatežu: nova vrsta pijavke za Slovenijo in vprašanje njene taksonomske pripadnosti // Natura Sloveniae. 2000. V. 2(2). P. 21–27.

7. *Martin P.* On the origin of the Hirudinea and the demise of the Oligochaeta // *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2001. V. 268. P. 1089–1098.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1616>
8. *Erseus C., Kallersjo M.* 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida) // *Zool. Scripta.* 2004. V. 33. P. 187–196.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2004.00146.x>
9. *Minelli A., Sket B., Jong Y.* Fauna Europaea: Annelida – Hirudinea, incl. Acanthobdellea and Branchiobdellea // *Biodiversity Data J.* 2014. V. 2. e4015.
<https://doi.org/10.3897/BDJ.2.e4015>
10. *Лукин Е.И.* Пиявки пресных и солоноватых водоемов // *Фауна СССР. Пиявки.* Л.: Наука, 1976. С. 1–484.
11. *Hauk A.K., Fallon M.J., Burger C.V.* New host and geographical records for the leech *Acanthobdella peledina* Grube, 1851 (Hirudinea, Acanthobdellidae) // *J. Parasitology.* 1979. V. 65. № 6. P. 989.
<https://doi.org/10.2307/3280268>
12. *Holmquist C.* A fish leech of the genus *Acanthobdella* found in North America // *Hydrobiologia.* 1974. V. 44(2–3). P. 241–245.
<https://doi.org/10.1007/BF00187273>
13. *Livanow N.A.* *Acanthobdella peledina* Grube, 1851 // *Morphol. Study.* 1905. V. 72(5–8). P. 1–266.
14. *Michaelsen W.* Über die Beziehungen der Hirudineen zu den Oligochaeten // *Mitt. Zool. Mus. Hamburg.* 1919. V. 36. P. 131–153.
15. *Sawyer R.T.* *Leech Biology and Behaviour.* Oxford: Clarendon Press, 1986. V. 2. 230 p.
16. *Энштейн В.М.* Пиявки: Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР / Под ред. Бауэр О. Л.: Наука, 1987. С. 340–372.
17. *Siddal M.E., Apakupakul K., Burreson E.M. et al.* Validating Livanow: molecular data agree that leeches, branchiobdellidans, and *Acanthobdella peledina* form a monophyletic group of oligochaetes // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001. V. 21(3). P. 346–351.
<https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1021>
18. *Purschke G., Westheide W., Rohde D., Brinkhurst R.O.* Morphological reinvestigation and phylogenetic relationship of *Acanthobdella peledina* (Annelida, Clitellata) // *Zoomorphology.* 1993. V. 113. P. 91–101.
<https://doi.org/10.1007/BF00403087>
19. *Trontelj P., Sket B., Steinbruk G.* Molecular phylogeny of leeches: Congruence of nuclear and mitochondrial rDNA data sets and the origin of bloodsucking // *J. Zool. Syst. Evol. Research.* 1999. V. 37. P. 141–147.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1999.00114.x>
20. *Hickson R.E., Simon C., Cooper A. et al.* Conserved sequence motifs, alignment, and secondary structure for the third domain of animal 12S rRNA // *Mol. Biol. Evol.* 1996. V. 13(1). P. 150–169.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025552>
21. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33(7). P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
22. *Bouckaert R., Heled J., Kühnert D. et al.* BEAST 2: a software platform for bayesian evolutionary analysis // *PLoS Comput. Biol.* 2014. V. 10(4): e1003537.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
23. *Posada D.* jModelTest: phylogenetic model averaging // *Mol. Biol. Evol.* 2008. V. 25(7). P. 1253–1256.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
24. *Kojima S.* Paraphyletic status of Polychaeta suggested by phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of elongation factor-1 α // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1998. V. 9(2). P. 255–261.
<https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0472>
25. *García-Sandoval R.* Why some clades have low bootstrap frequencies and high Bayesian posterior probabilities // *Israel J. Ecol. & Evol.* 2014. V. 60(1). P. 41–44.
<https://doi.org/10.1080/15659801.2014.937900>

Estimation of Effectiveness of the Mitochondrial 12S Marker Fragment Use for Acanthobdellids' Phylogeny Reconstruction

A. V. Bolbat^{a, *}, N. V. Sorokovikova^a, and I. A. Kaygorodova^{a, b}

^a*Limnological Institute of Siberian Branch of Russian Academy of Science, Irkutsk, 664003 Russia*

^b*Department of Physico-Chemical Biology, Irkutsk State University, Irkutsk, 664003 Russia*

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

For many years molecular methods of research based on the analysis of conservative regions of genetic material for organisms' divergence calculation are employed to solve disputable issues of phylogeny. In present study we used a marker fragment of 12S rRNA gene to test the phylogenetic position of one of understudied faunistic groups – ancient leech-like parasites of the *Acanthobdella* genus. The mosaic combination of characteristics from oligochaets and modern leeches (Hirudinea) points to intermediate evolutionary position of acanthobdellids. The results obtained make it possible to state that 12S marker fragment is well-suited for phylogeny analysis at species level. The phylogenetic history of acanthobdellids reconstructed by our group does not correspond with the results of earlier studies. Low values of statistical support lead to conclusion about inapplicability of 12S marker fragment for phylogeny analysis at levels above genus.

Keywords: phylogenetics, 12S, mitochondrial DNA, Annelida, *Acanthobdella*.