

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЛОГЕНИЯ КРИПТИЧЕСКИХ ВИДОВ
КОМПЛЕКСА *Daphnia longispina* (Cladocera, Daphniidae)
НА ОСНОВЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПРОМЕЖУТОЧНОГО
ТРАНСКРИБИРУЕМОГО СПЕЙСЕРА 2 (ITS2) ЯДЕРНОЙ ДНК**

© 2019 г. Е. И. Зуйкова*

Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630091 Россия

*e-mail: zuykova@ngs.ru

Поступила в редакцию 26.06.2018 г.

После доработки 07.08.2018 г.

Принята к публикации 22.08.2018 г.

Ветвистоусые ракообразные рода *Daphnia* O.F. Müller (Crustacea: Cladocera) являются типичными представителями разнотипных водоемов и используются как модельные объекты в различных областях биологии. В пределах рода отмечено значительное число близкородственных и криптических видов, идентификация которых по морфологическим признакам часто вызывает затруднения. В настоящей работе проведена идентификация видов группы *Daphnia longispina* – *D. longispina* O.F. Müller, *D. hyalina* Leydig, *D. umbra* Taylor, Hebert et Colbourne и *D. cf. longispina* на основе данных о предполагаемой вторичной структуре второго внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 ядерной ДНК. Филогенетический анализ с использованием алгоритма Profile Neighbor-Joining и анализ компенсаторных замен подтвердили видовую самостоятельность *D. hyalina* и *D. cf. longispina*. Показано, что данные о вторичной структуре ITS2 могут применяться для решения сложных таксономических задач при изучении кладоцер в целом и видовых комплексов в частности.

Ключевые слова: *Daphnia longispina*, криптические виды, ядерная ДНК, ITS2.

DOI: 10.1134/S0016675819050175

Криптические виды – широко распространенный феномен в пределах различных групп растений и животных. Изучение скрытого видового разнообразия и выявление границ между видами представляет собой одну из задач эволюционной биологии, которая особо актуальна в свете проблемы реальной оценки и сохранения современного биоразнообразия [1–3]. Криптические виды встречаются и среди водных беспозвоночных, в том числе низших ракообразных. Род *Daphnia* O.F. Müller (Crustacea: Cladocera) – один из модельных объектов в эволюционной биологии – не является исключением. Например, значительная часть таксонов из группы *D. longispina* s. lat. представлена криптическими видами [4–6]. Между ними к настоящему времени не выявлено морфологических различий, и систематика этой группы остается весьма проблематичной [4, 5, 7]. В ряде случаев единственно возможным методом идентификации форм/видов группы *D. longispina* является молекулярно-генетический анализ исследуемых особей [6, 8–12]. При этом известно и то, что некоторые криптические виды образуют ги-

бриды, различение которых возможно только с помощью генетических методов [13].

Для установления филогенетических отношений и выявления случаев гибридизации в пределах рода *Daphnia* часто используют первый и второй внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) ядерной ДНК [14, 15]. Однако при этом нередко обнаруживается несовпадение результатов анализа изменчивости митохондриальной и ядерной ДНК. Такая несогласованность чаще всего объясняется ядерной или митохондриальной интрогрессией, неполным сортигом (ISL) и т.п. [13, 16, 17]. Второй внутренний транскрибируемый спейсер ITS2, по сравнению с фланкирующими генами 5.8S и 28S рРНК, представляет собой быстро эволюционирующий регион ядерной ДНК и поэтому является подходящим маркером для реконструкции филогений на видовом и родовом уровнях [18–20].

Вторичная структура ITS2 универсальна для всех групп эукариот и обычно представлена четырьмя спиралями, хотя их число может варьировать. Несмотря на то что некоторые признаки последовательностей ITS2 высоковариабельны (в

том числе и их длина), их вторичная структура остается консервативной за счет мотивов, формирующих гомологичные спирали [18, 19, 21]. Эта особенность была успешно использована для установления филогенетических отношений между близкородственными видами; а корреляция между наличием компенсаторных замен (СВС) в консервативных участках ITS2 и способностью к межвидовой гибридизации (в рамках биологической концепции вида) — надежный критерий для выявления криптических видов [18–22]. Первоначально этот метод применялся для распознавания криптических видов водорослей и грибов. Позднее он был успешно апробирован для реконструкции филогений и идентификации криптических видов в разных группах артропод [23–28].

Цель данного исследования — выявление границ между криптическими и близкородственными видами группы *D. longispina* и установление филогенетических отношений между этими видами с использованием данных о вторичной структуре второго внутреннего транскрибируемого спейсера ядерной ДНК (ITS2 яДНК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор проб и виды. Образцы видов группы *D. longispina* (*D. longispina* O.F. Müller, *D. hyalina* Leydig, *D. cf. longispina* и *D. umbra* Taylor, Hebert et Colbourne) были собраны в течение вегетационных сезонов 2003–2013 гг. в оз. Глубоком (Московская обл.), бассейне оз. Чаны (Новосибирская обл.), Телецком озере (Республика Алтай), в водоемах Тоджинской котловины (бассейн р. Большой Енисей, Республика Тыва) — озера Шурам-Холь, Борзу-Холь, постоянные безымянные пруды. Для последующего генетического анализа образцы фиксировали 96%-ным этанолом.

Выделение ДНК и амплификация. Общую генетическую ДНК экстрагировали из отдельно взятых особей с помощью 5%-ного раствора Chelex 100 resin (BioRad, США). Для амплификации фрагмента ядерной ДНК, включающего в себя часть гена 5.8S рДНК, второй промежуточный транскрибируемый спейсер ITS2 и часть гена 28S рДНК, использовали ПЦР. Амплификацию проводили в программируемом термостате M111 (ООО БИС-Н, Россия). Состав реакционной смеси, праймеры и температурные профили, использованные в процессе амплификации фрагмента ядерного спейсера, были подробно описаны ранее [29, 30]. Продукты реакции амплификации разделяли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле в 1× ТАЕ-буфере, окрашенном бромистым этидием, и фотодокументировали. Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью набора реактивов “Биосилика” (Россия) и

секвенировали по прямому и обратному праймерам с помощью автоматического анализатора ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) в ЦКП “Геномика” СО РАН (<http://sequest.niboch.nsc.ru>) с использованием BigDye-терминатора (Applied Biosystems).

В анализе использованы 43 нуклеотидные последовательности ядерного маркера ITS2 для пяти близкородственных видов рода *Daphnia*. Многократные последовательности ITS2 в анализ не включали. Нуклеотидные последовательности *D. galeata* из оз. Шурам-Холь и оз. Чаны использовались в качестве внешней группы. В анализ также была добавлена последовательность ITS2 для *D. umbra* из базы данных GenBank (#AY730403, Канада) [16].

Анализ и прогнозирование вторичной структуры ITS2. Для удаления фланкирующих участков генов 5.8S и 28S в ядерном маркере полная последовательность ITS2 была аннотирована с помощью инструмента “ITS2-Annotation” в ITS2 Database при следующих параметрах: $E < 0.01$, скрытой Марковской модели (hidden Markov model, НМ) для Metazoa [31]. Эта процедура необходима для установления гибридизации между 5.8S и 28S генами [32]. Предполагаемые модели вторичной структуры ITS2, характеризующиеся минимальной свободной энергией (MFE), получены с помощью RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>; настройки по умолчанию при 37°C). Поиск тандемных повторов в последовательностях ITS2 выполнен с помощью ресурса Microsatellite Repeat Finder с настройками по умолчанию (<http://sgdp.iop.kcl.ac.uk/nikammar/repeatfinder.html>).

Визуализация вторичных структур ITS2 выполнена с помощью PseudoViewer v. 3 Web Application (<http://pseudoviewer.inha.ac.kr/>). Оригинальные нуклеотидные последовательности 5.8S–ITS2–28S согласно выявленным гаплотипам депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MH399707–MH399728.

Анализ компенсаторных замен. Выравнивание нуклеотидных последовательностей ITS2 с гомологичными вторичными структурами выполнено с помощью встроенного в программу 4SALE v. 1.7 алгоритма ClustalW [33, 34]. Матрицу компенсаторных замен (СВС, нескорректированные *p*-дистанции) также получали с помощью 4SALE v. 1.7 и анализировали в программе CBCAnalyzer v. 1.0.3 [35]. Результаты выравнивания с информацией о вторичной структуре ITS2 были сохранены для последующего филогенетического анализа [20].

Филогения. Филогенетический анализ выполнен в программе ProfDistS v. 0.9.8 с использованием алгоритма “RNA/DNA structure Profile Neighbor-Joining” при числе репликаций 1000 для модели General Time Reversible и матрице $Q = Q_ITS2.txt$ как спе-

Таблица 1. Полиморфизм фрагмента ITS2 яДНК видов группы *D. longispina*

Вид	Водоем	Длина оперона, пн	GC, %	<i>n</i>	<i>h</i>	<i>S</i>	<i>k</i>	H_d	π
<i>D. longispina</i>	Бассейн оз. Чаны, Телецкое озеро, озера Тоджинской котловины	624–687	48.9–49.8	24	12	63	6.043	0.717 ± 0.103	0.0099 ± 0.0277
<i>D. hyalina</i>	Оз. Глубокое	691–693	49.5–49.8	5	3	3	1.200	0.700 ± 0.218	0.0017 ± 0.0007
<i>D. umbra</i>	Оз. Борзу-Холь	675–681	50.3–51.1	8	2	4	1	0.250 ± 0.180	0.0015 ± 0.0011
<i>D. cf. longispina</i>	Бассейн оз. Чаны	665–666	49.6–49.8	4	4	10	5.667	1.000 ± 0.177	0.0085 ± 0.0082

Примечание. GC, % – доля G и C нуклеотидов; *n* – число образцов, *h* – число гаплотипов, *S* – число полиморфных (сегрегирующих) сайтов, *k* – число нуклеотидных различий, H_d – гаплотипическое разнообразие, π – нуклеотидное разнообразие.

цифической модели замен для ITS2 [36, 37]. Результирующее дерево визуализировано с помощью программ NJplot v. 2.4 [38] и FigTree v. 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>). В качестве альтернативного подхода полученная в программе ProfDistS матрица длины ветвей между группами видов использована для реконструкции сети с помощью алгоритма “equal angle” в программе SplitsTree4 [39]. Для сравнения результатов дополнительные филогенетические деревья реконструированы без учета вторичной структуры ITS2 на основе модели GTR в программах MEGA v. 7 [40] и MRBAYES v. 3.2 [41, 42]. В программе MEGA v. 7 дерево реконструировано с помощью метода максимального правдоподобия (ML). Байесовский анализ реализован при числе генераций равном 1000000 и частоте записи параметров 500. Оценка эффективного размера выборки параметров (ESS > 500) для проверки конвергенции Марковских цепей выполнена при помощи Tracer v. 1.6 [43]. Генетические *p*-дистанции в пределах видов и между ними, доля GC-нуклеотидов рассчитаны в программе MEGA v. 7. Полиморфизм изучаемых последовательностей оценивался с помощью программы DnaSP v. 6 [44].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ ITS2 последовательностей

Длина нуклеотидных последовательностей сильно различалась как в пределах форм/видов дафний, так и между ними. Общая длина полученных последовательностей составила 1006–1038 пар нуклеотидов (далее – пн) при длине аннотированного фрагмента ITS2 624–693 пн. Участки фланкирующих генов 5.8S и 28S длиной по 25 пн каждый были высококонсервативными, и все последовательности соответствовали крите-

рию гибридизации [32]. Такое взаимодействие между ними свидетельствует о способности образовывать аннотированный участок ITS2 на основе скрытой Марковской модели (HMM) и о том, что ITS2-последовательности не являются псевдогенами [24].

Последовательности ITS2 с самой варибельной длиной отмечены у *D. longispina*, а самая длинная – у *D. hyalina* (табл. 1). Длина последовательностей ITS2 зависела от числа тандемных повторов в мотивах: GAGAGA, CGCGCG, UUUUUU, UCUCUC, GUGUGU и UAUUAU (Приложение). Доля GC-нуклеотидов варьировала в пределах 48.9–51.1%, и последовательности ITS2 для *D. umbra* характеризовались более высоким их содержанием (табл. 1).

Высокое число ITS2-гаплотипов зарегистрировано для вида *D. longispina*, который был представлен большим числом популяций из разных районов Сибири (табл. 1). Этот вид также характеризуется высокими значениями гаплотипического и нуклеотидного разнообразия. Высокие значения этих показателей зарегистрированы для всех видов, кроме *D. umbra*, а для *D. hyalina* отмечен высокий уровень гаплотипического разнообразия при низком нуклеотидном разнообразии.

Предполагаемые модели вторичной структуры ITS2

Анализ вторичных структур последовательностей ITS2 выявил несколько типов предполагаемых моделей, соответствующих разным формам/видам дафний группы *D. longispina* (рис. 1–3). Для образцов вида *D. longispina* выявлено три типа моделей вторичной структуры ITS2, и их изменчивость проявлялась в числе и длине отдельных спиралей (рис. 1, *a–d*). Тип вторичной структуры

Таблица 2. Общее число компенсаторных (СВС) замен между предполагаемыми вторичными структурами ITS2 для анализируемых форм/видов группы *D. longispina*

	DL	Brb2-L2	PL17	DH	DU	Brb1-Dsp2	Brb1-Dsp10
DL							
Brb2-L2	0						
PL17	0	0					
DH	0	1	0				
DU	2	2	1	1			
Brb1-Dsp2	4	4	3	3	4		
Brb1-Dsp10	5	5	4	3	5	0	
Brb1-Dsp12	3	3	3	3	4	0	0

Примечание. DL – *D. longispina*; Brb2-L2 – *D. longispina*; PL17 – *D. longispina*; DH – *D. hyalina*; DU – *D. umbra*; Brb1-Dsp2 – *D. cf. longispina*; Brb1-Dsp10 – *D. cf. longispina*; Brb1-Dsp12 – *D. cf. longispina*.

ITS2 для *D. hyalina* практически полностью соответствовал самому распространенному типу предполагаемой вторичной структуры *D. longispina* (рис. 1, в). Предполагаемые модели вторичной структуры для ITS2-последовательностей *D. umbra* соответствовали двум слабо различающимся типам (рис. 2). Для образцов *D. cf. longispina* выявлено три типа таких моделей, при этом первая модель (рис. 3, а) наиболее сильно отличалась от остальных (рис. 3, б, в). В целом различия между всеми предполагаемыми моделями вторичных структур ITS2 для каждой формы/вида дафний были обусловлены длиной тандемных повторов (рис. 1–3). Кроме того, во всех моделях довольно четко можно было определить только две канонические структурные единицы – 2-ю (по наличию пиримидин-пиримидинового несоответствия) и 3-ю (с характерным мотивом в верхней части) спирали, а для образца *D. longispina* Brb2-L2 2-я спираль также была плохо различимой (рис. 1, д).

Анализ компенсаторных замен

Как и предполагалось, компенсаторные замены были обнаружены при попарном сравнении моделей вторичных структур ITS2 *D. longispina* с предполагаемыми моделями *D. umbra* и *D. cf. longispina* (табл. 2; рис. 4, а, в). Число СВС-замен при сравнении *D. umbra* с другими формами/видами варьировало от 1 (*D. umbra* – *D. hyalina*) до 5 (*D. umbra* – *D. cf. longispina*). Наибольшее число СВС-замен зарегистрировано при попарном сравнении моделей вторичных структур ITS2 *D. longispina* и *D. hyalina* с *D. cf. longispina* (рис. 4, в). Компенсаторные замены при попарном сравнении вторичных структур ITS2 *D. longispina* и *D. hyalina* обнаружены только для одного образца *D. longispina* Brb2-L2 (рис. 4, б). Все СВС-замены обнаружены

либо во 2-й и 3-й спиралях одновременно, либо только в 3-й спирали (*D. longispina* – *D. hyalina*).

Филогения

Реконструкция филогенетических взаимоотношений на основе последовательностей ITS2 между видами группы *D. longispina* с помощью различных методов и алгоритмов выявила сходную топологию деревьев (рис. 5, 6). Во всех случаях анализируемые виды сформировали отдельные кластеры со значимой поддержкой ветвей. На филогенетическом дереве, полученном с учетом вторичной структуры ITS2 с использованием алгоритма Profile Neighbor-Joining, кластеры для видов *D. hyalina*, *D. umbra* и *D. cf. longispina* выявились более четко с высокой поддержкой ветвей (рис. 5, а). Простирающаяся сеть на основе длин ветвей между ITS2-гаплотипами (также с учетом вторичной структуры ITS2) показала, что группа лонгиспино-подобных особей *D. cf. longispina* наиболее сильно удалена от остальных видов (рис. 5, б). Этот результат хорошо согласуется с данными об эволюционной дивергенции между последовательностями ITS2 – самые высокие значения зарегистрированы при попарном сравнении последовательностей всех видов с последовательностями *D. cf. longispina* (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ второго промежуточного спейсера ITS2 у криптических и близкородственных видов группы *D. longispina* в первую очередь выявил высокую вариабельность фрагмента. Последовательности различались по уровню полиморфизма и длине, которая зависела от числа и длины тандемных повторов. Наиболее вариабельными оказались последовательности типичных особей

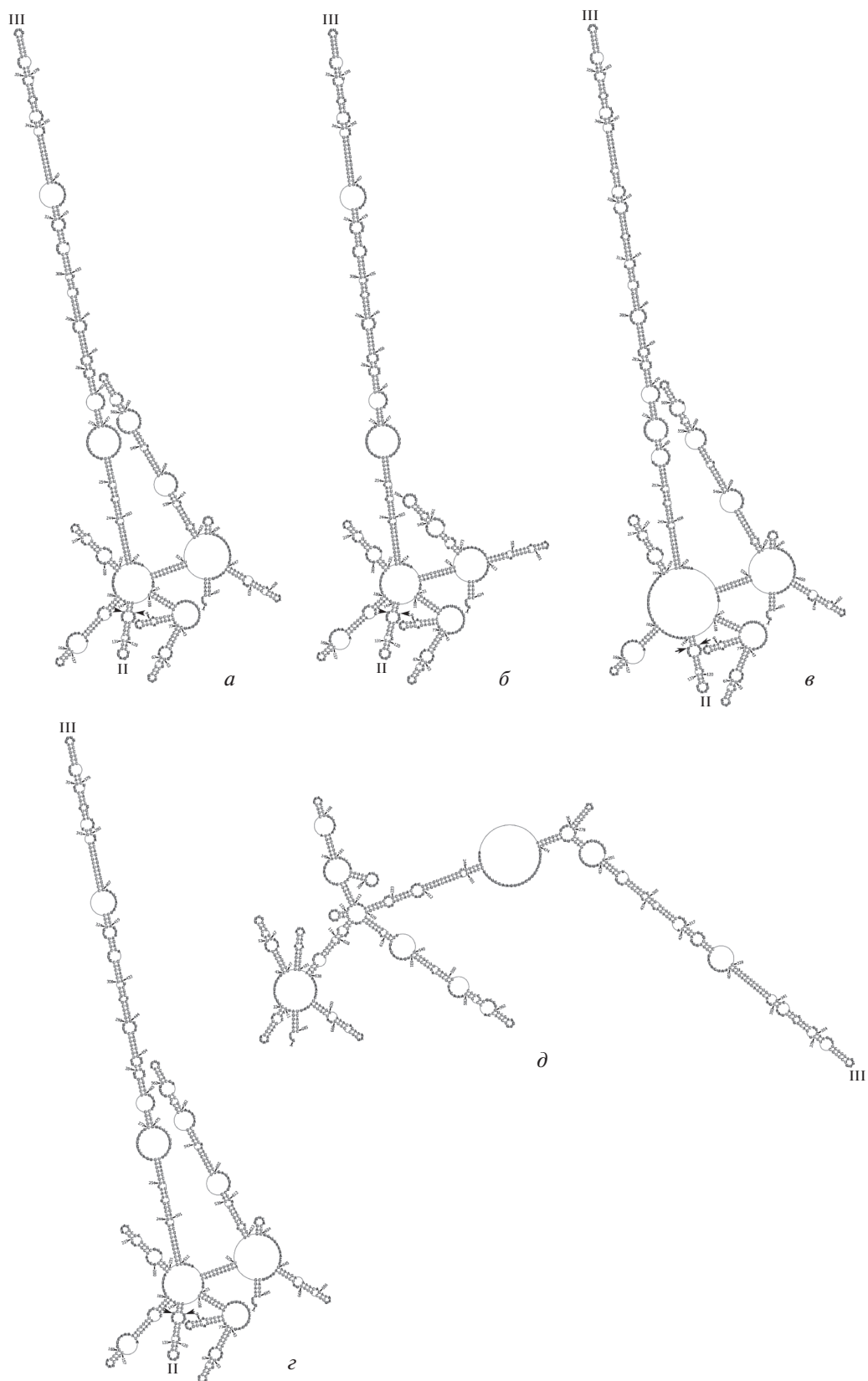


Рис. 1. Схемы предполагаемых вторичных структур ITS2 *D. longispina*: а – PL16 (тип 1), б – PL15 (тип 2), в – G1H1 (тип 1), г – DdL13 (тип 1), д – Vrb2-L2 (тип 3). II и III – 2-я и 3-я спирали; стрелки – пиримидин-пиримидиновые совпадения для 2-й спирали.

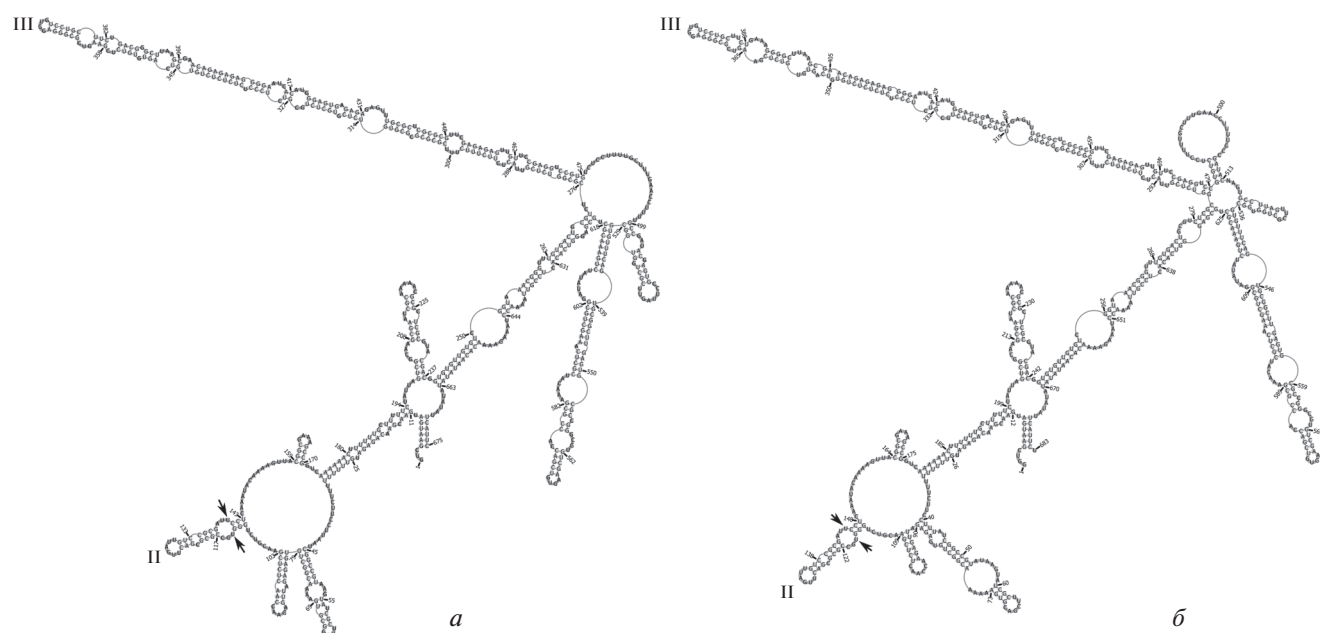


Рис. 2. Схемы предполагаемых вторичных структур ITS2 *D. umbra*: а – BrU15, б – *D. umbra* #AY730403. Остальные обозначения см. рис. 1.

D. longispina (идентифицированных по морфологическим признакам и митохондриальной ДНК). Длина и CG-насыщение последовательностей ITS2 у дафний оказались сопоставимыми с таковыми у некоторых других артропод, клещей [23] и амфипод [27], но сильно отличаются по этим показателям от копепод [28, 45]. Очевидно, вследствие высокой вариабельности последовательностей ITS2 основные четыре спирали, характеризующие вторичную структуру эукариот, оказались плохо распознаваемыми, что, впрочем, отмечалось в некоторых подобных исследованиях вторичной структуры ITS2 у артропод [19, 21, 23, 27].

Анализ компенсаторных замен во вторичных структурах ITS2 подтверждает видовую самостоятельность криптических видов группы *D. longispina*, которые не отличаются (*D. cf. longispina*) или слабо отличаются (*D. umbra*, см. [46]) от *D. longispina* по

морфологическим признакам. Ранее было показано, что даже одна СВС-замена указывает на принадлежность особей к разным видам с точностью до 93%, однако их отсутствие также не может являться признаком принадлежности особей к одному виду [22, 26]. При сравнении вторичных структур ITS2 видов *D. longispina* и *D. hyalina* обнаружена единственная полукомпенсаторная замена в одном попарном сравнении, что, скорее всего, свидетельствует в пользу их видовой самостоятельности. Наличие компенсаторных замен во вторичной структуре ITS2 *D. cf. longispina* подтверждает предположение о видовом статусе особей этой дивергентной митохондриальной линии из временного водоема бассейна оз. Чаны (Новосибирская обл.). Эти *longispina*-подобные дафнии обитают симпатрично с типичной формой *D. longispina*, и между ними не выявлено явных морфологиче-

Таблица 3. Оценка эволюционной дивергенции в пределах и между группами последовательностей ITS2 ядерной ДНК для форм/видов группы *D. longispina* (*p*-дистанции, %)

Вид	В пределах группы	<i>D. longispina</i>	<i>D. hyalina</i>	<i>D. umbra</i>	<i>D. cf. longispina</i>	<i>D. galeata</i>
<i>D. longispina</i>	1.0 ± 0.1	—	0.4	0.6	1.6	0.6
<i>D. hyalina</i>	0.2 ± 0.1	1.3	—	0.6	0.4	0.5
<i>D. umbra</i>	0.2 ± 0.1	3.0	2.5	—	1.6	0.6
<i>D. cf. longispina</i>	0.9 ± 0.3	18.0	16.9	17.2	—	1.6
<i>D. galeata</i>	2.0 ± 0.6	2.8	2.3	2.7	17.2	—

Примечание. Над диагональю показана стандартная ошибка.

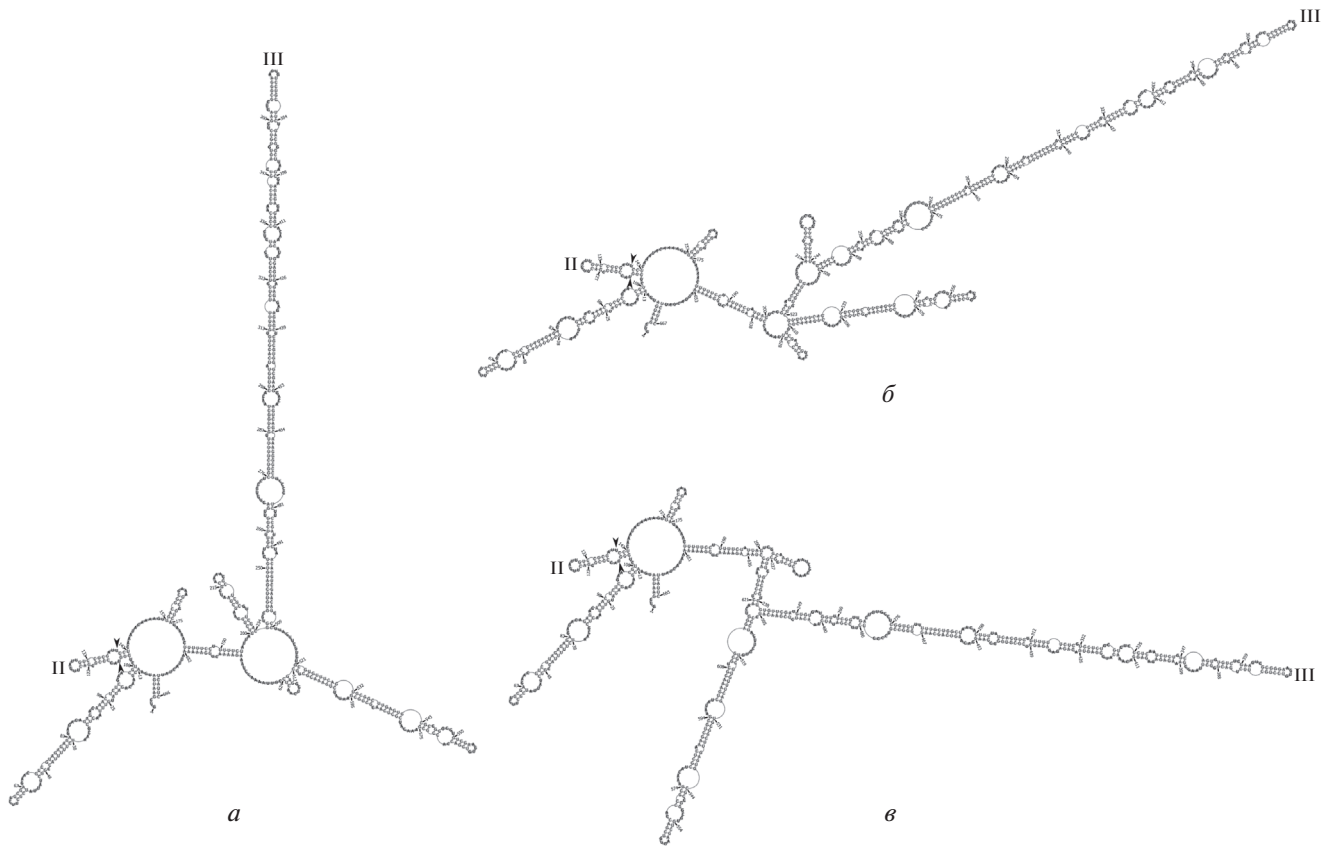


Рис. 3. Схемы предполагаемых вторичных структур ITS2 *D. cf. longispina*: а – Brb1-Dsp2, б – Brb1-Dsp10, в – Brb1-Dsp12. Остальные обозначения см. рис. 1.

ских различий, за исключением некоторых различий в форме тела [10, 47]. Результаты СВС-анализа согласуются с филогенией видов группы *D. longispina*. В филогенетических деревьях, реконструированных как с учетом вторичной структуры ITS2, так и без нее, все образцы *D. hyalina* формируют отдельный, хорошо поддерживаемый кластер. Возможно, такое сходство вторичных структур ITS2 у *D. longispina* и *D. hyalina* является следствием недавнего видообразования, либо неполного сортирования. Подобное сходство между вторичными структурами ITS2 ранее отмечено при изучении копепод [28]. Кроме того, этот результат может быть следствием гибридизации с последующей интрогрессией ядерной ДНК, которая характерна для видов группы *D. longispina* [17, 48].

К криптическим видам группы *D. longispina* применима когезионная концепция вида [49, 50], поскольку, несмотря на гибридизацию и интрогрессию, они сохраняют видовую обособленность (например, *D. longispina* – *D. hyalina*). Каждый криптический вид в этой группе дафний имеет собственную эволюционную направленность, если обсуждать наши результаты в свете эволюционной теории вида [49]. Обнаруженный нами

криптический вид *D. cf. longispina* не является близкородственным по отношению к другим видам группы *D. longispina*, поскольку монофилия между ними не поддерживается ни одним из анализов, и его можно отнести к так называемым видам-двойникам. Морфологическое сходство между *D. longispina* и *D. cf. longispina* вполне объясняется гипотезой морфологической конвергенции между эволюционно далекими видами, которая появляется вследствие воздействия сходных режимов отбора [51]. Однако возможна и ситуация, когда различия между таксонами будут найдены, например при сопоставлении признаков взрослых самцов, которые оказываются обычно более “полезными” для систематики дафний разных групп видов [7, 46].

В целом ядерная филогения на основе последовательностей ITS2 для криптических видов группы *D. longispina* соответствует результатам митохондриальной филогении, полученной нами ранее на основе изменчивости генов 16S и 12S [9–11], что не подтверждает недавно полученные данные об их несогласованности [17]. Как было показано ранее, использование информации о вторичной структуре ITS2 позволяет более точно реконструировать филогенетические отношения

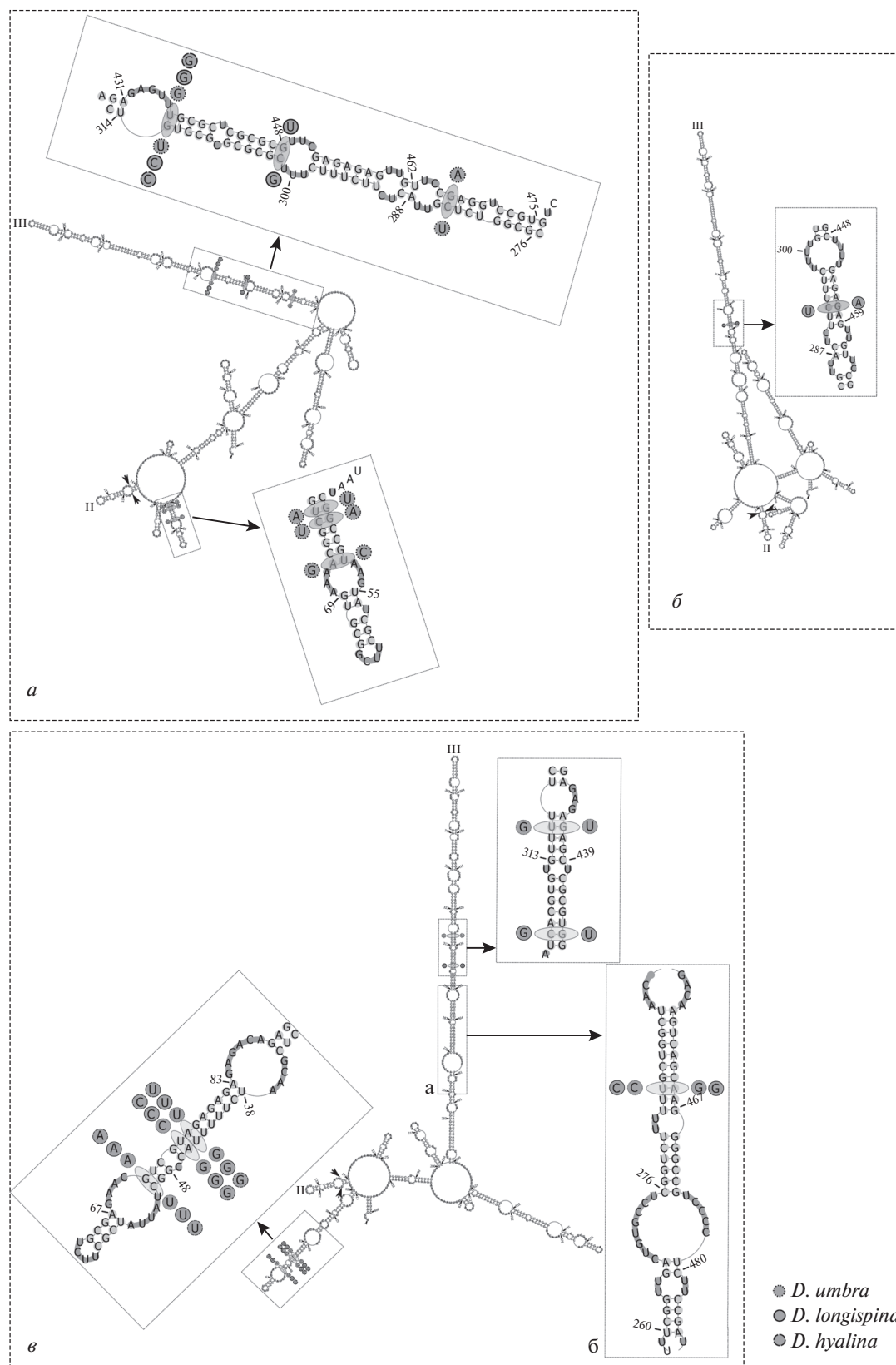


Рис. 4. СВС-анализ для вторичных структур ITS2: *а* – *D. umbra* с *D. longispina/D. hyalina* и *D. cf. longispina* (показана структура *D. umbra*), *б* – *D. hyalina* с *D. longispina* (показана структура *D. hyalina*), *в* – *D. cf. longispina* с *D. umbra* и *D. longispina/D. hyalina* (показана структура *D. cf. longispina* Brb1-Dsp2; *а, б* – участки структур Brb1-Dsp2 и Brb1-Dsp12/Brb1-Dsp10 соответственно).

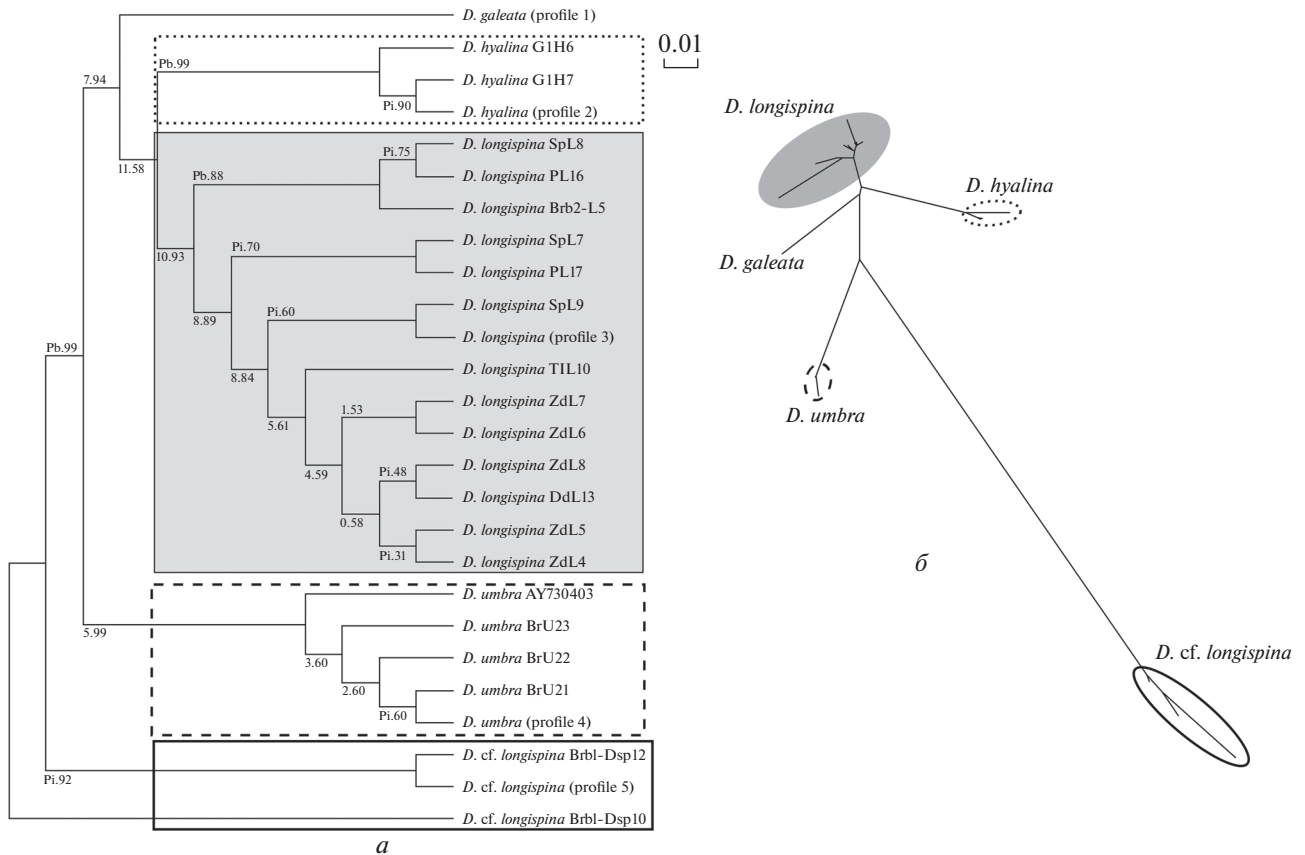


Рис. 5. Филогенетические деревья, построенные с учетом вторичной структуры ITS2 для видов рода *Daphnia*. *a* – дерево, реконструированное с помощью профиля присоединения ближайшего соседа (Profile Neighbor-Joining, PNJ) в программе ProfDistS на основе модели GTR. Дерево визуализировано в программе NJplot, показаны бутстрэп-значения при 1000 репликациях. Профили получены на основе “Pi” – идентичности пороговой величины (identity threshold), “Pb” – порогового бутстрэп-значения (bootstrap threshold). Профили: *D. galeata* (profile 1) – KgG28, ShG11; *D. hyalina* (profile 2) – G1H1-G1H3; *D. longispina* (profile 3) – DdL14, DdL15, TIL9, TIL11, KgL, ZdL1, ZdL2, Brb1-L9, Brb2-L2, Brb2-L4, PL15; *D. umbra* (profile 4) – BrU15, BrU18-BrU20; *D. cf. longispina* (profile 5) – Brb1-Dsp2, Brb1-Dsp16; *b* – простирающаяся филогенетическое дерево, визуализированное в программе SplitsTree с помощью алгоритма “equal angle” на основе длины ветвей между кладами. Масштаб – число ожидаемых замен на сайт.

между видами в пределах рода и выявить границы между криптическими видами и дивергентными митохондриальными линиями даже в начальной стадии их радиации [24, 52].

Результаты настоящего исследования показали, что использование информации о вторичной структуре второго промежуточного транскрибируемого спейсера ITS2 ядерной ДНК позволяет более точно установить филогенетические связи между криптическими и близкородственными видами группы *D. longispina*. Основные клады, полученные на основе анализа изменчивости ядерного маркера, согласуются с кладами митохондриальной филогении (16S, 12S, ND2). Использование информации о вторичной структуре ITS2 для видов группы *D. longispina* значительно повышает уровень разрешения между кладами. Анализ компенсаторных замен (СВЗ) во вторичной структуре ITS2 позволяет с высокой степенью на-

дежности дифференцировать близкородственные и криптические виды группы *D. longispina*, которые морфологически не отличаются (или плохо отличаются) друг от друга. Таким образом, данный подход может применяться для решения схожих задач при таксономических исследованиях низших ракообразных в целом и отдельных видовых комплексов.

Автор выражает благодарность А.А. Котову (ИПЭЭ РАН, г. Москва) и Н.А. Бочкареву (ИСиЭЖ СО РАН, г. Новосибирск) за ценные замечания при подготовке рукописи и помощь в сборе проб зоопланктона.

Исследование поддержано Программой фундаментальных научных исследований (ФНИ) государственных академий наук на 2013–2020 гг., проект № VI.51.1.9. AAAA-A16-116121410119-4.

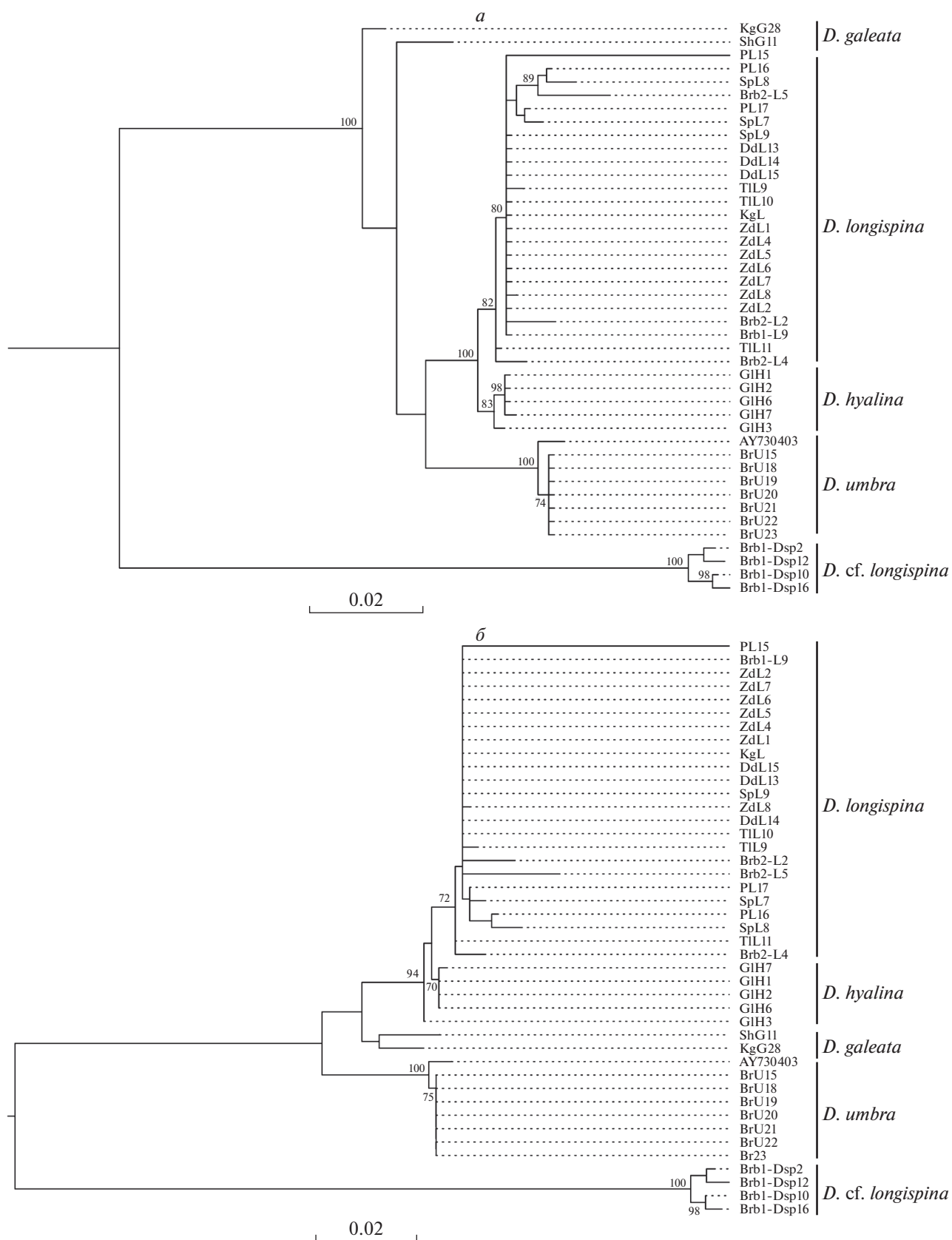


Рис. 6. Филогенетические деревья, реконструированные без учета вторичной структуры ITS2. *a* – Байесовский метод, BI; *b* – метод максимального правдоподобия, ML. В узлах ветвления указаны апостериорная вероятность (BI, %) и бутстрэп-значения (ML, %). Масштаб – число ожидаемых замен на сайт.

ПРИЛОЖЕНИЕ. Нуклеотидный состав, положение и длина тандемных повторов в последовательностях ITS2 для форм/видов группы *D. longispina*

Вид (образец)	Позиция	Число повторов	Мотив
<i>D. longispina</i> (PL15)	78	3	GAGAGA
	114	3	CGCGCG
	177	3	UUUUUU
	298	3	GCGCGC
	307	3	UCUCUC
	328	5	CUCUCUCUCU
	344	3	GUGUGU
	396	4	AGAGAGAG
	421	7	GAGAGAGAGAGA
	449	3	GAGAGA
	529	3	GUGUGU
611	3	UAUAUA	
<i>D. longispina</i> (PL16)	78	3	GAGAGA
	114	3	CGCGCG
	177	3	UUUUUU
	296	3	GCGCGC
	305	3	UCUCUC
	326	5	CUCUCUCUCU
	342	3	GUGUGU
	394	4	AGAGAGAG
	419	6	GAGAGAGAGAGA
	445	3	GAGAGA
	525	3	GUGUGU
601	3	AUAUAU	
<i>D. longispina</i> (PL17)	78	3	GAGAGA
	114	3	CGCGCG
	177	3	UUUUUU
	298	3	GCGCGC
	307	3	UCUCUC
	328	5	CUCUCUCUCU
	344	3	GUGUGU
	396	4	AGAGAGAG
	421	6	GAGAGAGAGAGA
	438	3	CGCGCG
	449	3	GAGAGA
	529	3	GUGUGU
	605	3	AUAUAU
<i>D. longispina</i> (SpL7)	78	3	GAGAGA
	114	3	CGCGCG
	177	3	UUUUUU
	298	3	GCGCGC
	307	3	UCUCUC
	328	5	CUCUCUCUCU
	344	3	GUGUGU
	396	4	AGAGAGAG
	421	6	GAGAGAGAGAGA
	447	3	GAGAGA
601	3	AUAUAU	
<i>D. longispina</i> (SpL8)	78	3	GAGAGA
	114	3	CGCGCG

ПРИЛОЖЕНИЕ. Продолжение

Вид (образец)	Позиция	Число повторов	Мотив
	177	3	UUUUUU
	296	3	GCGCGC
	326	5	CUCUCUCUCU
	342	3	GUGUGU
	394	4	AGAGAGAG
	419	7	GAGAGAGAGAGAGA
	447	3	GAGAGA
	479	3	CUCUCU
	527	3	GUGUGU
	603	3	AUAUUAU
<i>D. longispina</i> (SpL9)	78	3	GAGAGA
	114	3	GCGCGC
	177	3	UUUUUU
	298	3	GCGCGC
	307	3	UCUCUC
	328	5	CUCUCUCUCU
	344	3	GUGUGU
	396	4	AGAGAGAG
	421	7	GAGAGAGAGAGAGA
	449	3	GAGAGA
	529	3	GUGUGU
	605	3	AUAUUAU
<i>D. longispina</i> (DdL13, DdL14, DdL15, TIL9, KgL, ZdL1, ZdL2, ZdL4, ZdL5, ZdL6, ZdL7, Brb1-L9)	78	3	GAGAGA
	114	3	GCGCGC
	177	3	UUUUUU
	298	3	GCGCGC
	307	3	UCUCUC
	328	5	CUCUCUCUCU
	344	3	GUGUGU
	396	4	AGAGAGAG
	421	6	GAGAGAGAGAGA
	447	3	GAGAGA
	527	3	GUGUGU
	603	3	AUAUUAU
<i>D. longispina</i> (ZdL8)	78	3	GAGAGA
	114	3	GCGCGC
	177	3	UUUUUU
	298	3	GCGCGC
	307	3	UCUCUC
	328	5	CUCUCUCUCU
	344	3	GUGUGU
	371	3	CUGCUGCUG
	396	4	AGAGAGAG
	421	6	GAGAGAGAGAGA
	447	3	GAGAGA
	527	3	GUGUGU
	603	3	AUAUUAU
<i>D. longispina</i> (TIL10)	78	3	GAGAGA
	114	3	GCGCGC
	177	3	UUUUUU
	298	3	GCGCGC

ПРИЛОЖЕНИЕ. Продолжение

Вид (образец)	Позиция	Число повторов	Мотив
	307	3	UCUCUC
	328	5	CUCUCUCUCU
	344	3	GUGUGU
	396	4	AGAGAGAG
	421	6	GAGAGAGAGAGA
	447	3	GAGAGA
	528	3	GUGUGU
	604	3	AUAUUAU
<i>D. longispina</i> (TIL11)	78	3	GAGAGA
	114	3	CGCGCG
	171	3	AAAAAA
	178	3	UUUUUU
	292	3	GCGCGC
	301	3	UCUCUC
	322	5	CUCUCUCUCU
	338	3	GUGUGU
	390	4	AGAGAGAG
	415	9	GAGAGAGAGAGAGAGAGA
	447	3	GAGAGA
	527	3	GUGUGU
	603	3	AUAUUAU
<i>D. longispina</i> (Brb2-L2)	78	3	GAGAGA
	114	3	CGCGCG
	177	3	UUUUUU
	298	3	GCGCGC
	307	3	UCUCUC
	328	5	CUCUCUCUCU
	344	3	GUGUGU
	396	4	AGAGAGAG
	421	6	GAGAGAGAGAGA
	527	3	GUGUGU
	603	3	AUAUUAU
<i>D. longispina</i> (Brb2-L4)	78	3	GAGAGA
	114	3	CGCGCG
	171	3	AAAAAA
	178	3	UUUUUU
	298	3	GCGCGC
	307	3	UCUCUC
	328	5	CUCUCUCUCU
	344	3	GUGUGU
	396	4	AGAGAGAG
	421	6	GAGAGAGAGAGA
	447	3	GAGAGA
	527	3	GUGUGU
	603	3	AUAUUAU
<i>D. longispina</i> (Brb2-L5)	78	3	GAGAGA
	114	3	CGCGCG
	177	3	UUUUUU
	238	3	UGUGUG
	256	3	UGUGUG
	263	3	GUGUGU

ПРИЛОЖЕНИЕ. Продолжение

Вид (образец)	Позиция	Число повторов	Мотив
	298	3	GCGCGC
	307	3	UCUCUC
	323	7	UCUCUCUCUCUCUC
	344	3	GUGUGU
	396	4	AGAGAGAG
	421	6	GAGAGAGAGAGA
	447	3	GAGAGA
	527	3	GUGUGU
	603	3	AUAUAU
<i>D. hyalina</i> (GIH1, GIH2, GIH3, GIH7)	78	3	GAGAGA
	114	3	GCGCGC
	171	3	AAAAAA
	178	3	UUUUUU
	235	3	GUGUGU
	303	3	GCGCGC
	312	3	UCUCUC
	333	5	CUCUCUCUCU
	349	3	GUGUGU
	401	4	AGAGAGAG
	426	5	GAGAGAGAGA
	441	3	GCGCGC
	452	3	GAGAGA
	534	3	GUGUGU
	610	3	AUAUAU
<i>D. hyalina</i> (GIH6)	78	3	GAGAGA
	114	3	GCGCGC
	171	3	AAAAAA
	178	3	UUUUUU
	235	3	GUGUGU
	303	3	GCGCGC
	312	3	UCUCUC
	333	5	CUCUCUCUCU
	349	3	GUGUGU
	401	4	AGAGAGAG
	426	5	GAGAGAGAGA
	441	3	GCGCGC
	452	3	GAGAGA
	536	3	GUGUGU
	612	3	AUAUAU
<i>D. umbra</i> (BrU15, BrU20, BrU21, BrU22, BrU23)	25	4	UUUUUUUU
	80	3	GAGAGA
	116	3	GCGCGC
	173	3	AAAAAA
	180	3	UUUUUU
	238	3	GUGUGU
	301	5	GCGCGCGCGC
	332	5	CUCUCUCUCU
	348	3	GUGUGU
	400	4	AGAGAGAG
	425	4	GAGAGAGA
	442	3	GCGCGC

ПРИЛОЖЕНИЕ. Окончание

Вид (образец)	Позиция	Число повторов	Мотив
	451	3	GAGAGA
	603	3	AUAUAU
	657	6	AUAUAUAUAUAU
<i>D. umbra</i> AY730403	25	4	UUUUUUUU
	71	3	AAAAAA
	84	3	GAGAGA
	120	3	CGCGCG
	177	3	AAAAAA
	184	3	UUUUUU
	242	3	GUGUGU
	305	5	CGCGCGCGCG
	336	5	CUCUCUCUCU
	352	3	GUGUGU
	406	4	AGAGAGAG
	431	4	GAGAGAGA
	448	3	CGCGCG
	457	3	GAGAGA
	609	3	AUAUAU
	663	6	AUAUAUAUAUAU
<i>D. cf. longispina</i> (Brb1-Dsp2, Brb1-Dsp12)	76	5	AGAGAGAGAG
	116	3	CGCGCG
	247	3	UGUGUG
	280	3	UUUUUU
	308	3	GUGUGU
	350	3	GUGUGU
	400, 401	5	AGAGAGAGAG
	425, 526	6	GAGAGAGAGAGA
	647, 428	3	AAAAAA
<i>D. cf. longispina</i> (Brb1-Dsp10)	76	5	AGAGAGAGAG
	116	3	CGCGCG
	235	4	GUGUGUGU
	247	3	UGUGUG
	280	3	UUUUUU
	307	3	GUGUGU
	349	3	GUGUGU
	400	5	AGAGAGAGAG
	425	6	GAGAGAGAGAGA
	646	3	AAAAAA
<i>D. cf. longispina</i> (Brb1-Dsp16)	76	5	AGAGAGAGAG
	116	3	CGCGCG
	235	4	GUGUGUGU
	247	3	UGUGUG
	280	3	UUUUUU
	307	3	GUGUGU
	400	5	AGAGAGAGAG
	425	6	GAGAGAGAGAGA
	646	3	AAAAAA

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Petrusek A., Kořínek V., Černý M.* Analysis of Cladoceran cryptic species: what approaches can we take? // *Acta Facultatis Ecol.* 2003. V. 10. S. 1. P. 105–107.
2. *Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S. et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation // *Trends Ecol. Evol.* 2006. V. 22(3). doi 10.1016/j.tree.2006.11.004
3. *Kordbacheh A., Garbalena G., Walsh E.J.* Population structure and cryptic species in the cosmopolitan rotifer *Euchlanis dilatata* // *Zool. J. Linn. Soc.* 2017. V. XX. P. 1–21. doi 10.1093/zoolinnean/zlx027
4. *Котов А.А.* Морфология и филогения Аноморода (Crustacea: Cladocera). М.: КМК, 2013. 638 с.
5. *Котов А.А.* Фаунистические комплексы Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) Восточной Сибири и Дальнего Востока России // *Зоол. журн.* 2016. Т. 95. № 7. С. 748–768. doi 10.7868/S0044513416070059
6. *Petrusek A., Thielsch A., Schwenk K.* Mitochondrial sequence variation suggests extensive cryptic diversity within the Western Palearctic *Daphnia longispina* complex // *Limnol. Oceanogr.* 2012. V. 57. № 6. P. 1838–1845. doi 10.4319/lo.2012.57.6.1838
7. *Kotov A.A.* A critical review of the current taxonomy of the genus *Daphnia* O.F. Müller, 1785 // *Zootaxa.* 2015. V. 3911. P. 184–200. doi 10.11646/zootaxa.3911.2.2
8. *Möst M., Petrusek A., Sommaruga R. et al.* At the edge and on the top: molecular identification and ecology of *Daphnia dentifera* and *D. longispina* in high-altitude Asian lakes // *Hydrobiologia.* 2013. V. 715. P. 51–62. doi 10.1007/s10750-012-1311-x
9. *Zuykova E.I., Bochkarev N.A., Katokhin A.V.* Identification of the *Daphnia* species (Crustacea: Cladocera) in the lakes of the Ob and Yenisei River basins: morphological and molecular phylogenetic approaches // *Hydrobiologia.* 2013. V. 715. P. 135–150. doi 10.1007/s10750-012-1423-3
10. *Зуйкова Е.И., Бочкарев Н.А., Катохин А.В.* Молекулярно-генетическая диагностика и филогения видов рода *Daphnia* (Crustacea: Cladocera) из водоемов бассейна озера Чаны // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 2. С. 235–243. doi 10.7868/S0016675812120181
11. *Зуйкова Е.И., Бочкарев Н.А., Шевелева Н.Г.* Генетический полиморфизм, распространение гаплотипов и филогения видов рода *Daphnia* (Cladocera: Аноморода) из некоторых водоемов России по результатам секвенирования гена 16S мтДНК // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 6. С. 672–684. doi 10.7868/S0016675816040135
12. *Ventura M., Petrusek A., Miró A. et al.* Local and regional founder effects in lake zooplankton persist after thousands of years despite high dispersal potential // *Mol. Ecol.* 2014. V. 23. P. 1014–1027. doi 10.1111/mec.12656
13. *Dlouhá Š., Thielsch A., Kraus R.H.S. et al.* Identifying hybridizing taxa within the *Daphnia longispina* species complex: a comparison of genetic methods and phenotypic approaches // *Hydrobiologia.* 2010. V. 643. P. 107–122. doi 10.1007/s10750-010-0128-8
14. *Keller B., Wolinska J., Tellenbach C., Spaak P.* Reproductive isolation keeps hybridizing *Daphnia* species distinct // *Limnol. Oceanogr.* 2007. V. 52. № 3. P. 984–991.
15. *Gießler S., Englbrecht C.C.* Dynamic reticulate evolution in a *Daphnia* multispecies complex // *J. Exp. Zool.* 2009. V. 311. P. 531–549. doi 10.1002/jez.550
16. *Taylor D.J., Sprenger H.L., Ishida S.* Geographic and phylogenetic evidence for dispersed nuclear introgression in a daphniid with sexual propagules // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 525–537. doi 10.1111/j.1365-294X.2005.02415.x
17. *Thielsch A., Knell A., Mohammadyari A. et al.* Divergent clades or cryptic species? Mitonuclear discordance in a *Daphnia* species complex // *BMC Evol. Biol.* 2017. V. 17(227). doi 10.1186/s12862-017-1070-4
18. *Coleman A.W.* ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // *Trends Genet.* 2003. V. 19. P. 370–375. doi 10.1016/S0168-9525(03)00118-5
19. *Schultz J., Maisel S., Gerlach D. et al.* A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota // *RNA.* 2005. V. 11. P. 361–364. <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.7204505>
20. *Schultz J., Wolf M.* ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics // *Mol. Phyl. Evol.* 2009. V. 52. P. 520–523. doi 10.1016/j.ympev.2009.01.008
21. *Coleman A.W.* Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure // *Nucl. Acids. Res.* 2007. V. 35. № 10. P. 3322–3329. doi 10.1093/nar/gkm233
22. *Müller T., Philippi N., Dandekar T. et al.* Distinguishing species // *RNA.* 2007. V. 13. P. 1469–1472. <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.617107>
23. *Hlinka O., Murrell A., Barker C.* Evolution of the secondary structure of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in hard ticks (Ixodidae, Arthropoda) // *Heredity.* 2002. V. 88. P. 275–279.
24. *Wiemers M., Keller A., Wolf M.* ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatus) // *BMC Evol. Biol.* 2009. doi 10.1186/1471-2148-9-300
25. *Ullrich B., Reinhold K., Niehuis O., Misof B.* Secondary structure and phylogenetic analysis of the internal transcribed spacers 1 and 2 of bush crickets (Orthoptera: Tettigoniidae: Barbitistini) // *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2009. doi 10.1111/j.1439-0469.2009.00553.x
26. *Ruhl M.W., Wolf M., Jenkins T.M.* Compensatory base changes illuminate morphologically difficult taxonomy // *Mol. Phyl. Evol.* 2010. V. 54. P. 664–669. doi 10.1016/j.ympev.2009.07.036
27. *Kornobis E., Pálsson S.* The ITS region of groundwater amphipods: length, secondary structure and phylogenetic information content in Crangonyctoids and Niphargids // *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2012. doi 10.1111/jzs.12006
28. *Di Capua I., Maffucci F., Pannone R. et al.* Molecular phylogeny of Oncaeidae (Copepoda) using nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS rDNA) // *PLoS One.* 2017. doi 10.1371/journal.pone.0175662
29. *Zuykova E.I., Bochkarev N.A., Semenova A.S., Katokhin A.V.* Morphological differentiation, mitochondrial and nuclear DNA variability between geographically distant populations of *Daphnia galeata* and *Daphnia cucullata* (Anomopoda, Daphniidae) // *J. Sib. Fed. Univ. Biol.* 2010. V. 4. № 3. P. 434–453.
30. *Зуйкова Е.И., Симонов Е.П., Бочкарев Н.А.* Сравнительный морфологический и генетический анализ популяций и видов рода *Daphnia* O.F. Müller, 1785 (Crustacea, Daphniidae) из озер Глубокое и Чаны // *Изв. РАН. Серия биологическая.* 2017. № 3. С. 262–275. doi 10.7868/S0002332917030134

31. Koetschan C., Förster F., Keller A. et al. The ITS2 Database III – sequences and structures for phylogeny // Nucl. Acids Res. 2009. doi 10.1093/nar/gkp966
32. Keller F., Schleicher T., Schultz J. et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation // Gene. 2009. V. 430. P. 50–57. doi 10.1016/j.gene.2008.10.012
33. Seibel P.N., Müller T., Dandekar T. et al. 4SALE – a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing // BMC Bioinformatics. 2006. V. 7. P. 498. doi 10.1186/1471-2105-7-498
34. Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Wolf M. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE // BMC Res. Notes. 2008. V. 1. P. 91. doi 10.1186/1756-0500-1-91
35. Wolf M., Friedrich J., Dandekar T., Muller T. CBCAnalyzer: inferring phylogenies based on compensatory base changes in RNA secondary structures // In Silico Biol. 2005. V. 5. P. 291–294.
36. Friedrich J., Dandekar T., Wolf M., Muller T. ProfDists: a tool for the construction of large phylogenetic trees based on profile distances // Bioinformatics. 2005. V. 21. P. 2108–2109. doi 10.1093/bioinformatics/bti289
37. Wolf M., Ruderisch B., Dandekar T. et al. ProfDistS: profiledistance based phylogeny on sequence-structure alignments // Bioinformatics. 2008. V. 24. P. 2401–2402. doi 10.1093/bioinformatics/btn453
38. Perrière G., Gouy M. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks // Biochimie. 1996. V. 78. P. 364–369.
39. Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. № 2. P. 254–267. doi 10.1093/molbev/msj030
40. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874. doi 10.1093/molbev/msw054
41. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny // Bioinformatics. 2001. V. 17. P. 754–755.
42. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 1572–1574. doi 10.1093/bioinformatics/btg180
43. Rambaut A., Suchard M.A., Xie D., Drummond A.J. Tracer V. 1.6. 2014. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
44. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S. et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets // Mol. Biol. Evol. 2017. V. 34. P. 3299–3302. doi 10.1093/molbev/msx248
45. Zagoskin M.V., Lazareva V.I., Grishanin A.K., Mukha D.V. Phylogenetic information content of copepoda ribosomal DNA repeat units: ITS1 and ITS2 // BioMed Res. Int. 2014. doi 10.1155/2014/926342
46. Zuykova E.I., Simonov E.P., Bochkarev N.A. et al. Resolution of the *Daphnia umbra* problem (Crustacea: Cladocera) using an integrated taxonomic approach // Zool. J. Linn. Soc. 2018. doi 10.1093/zoolinnean/zly015
47. Зуйкова Е.И., Бочкарев Н.А. Популяционная и межвидовая морфологическая изменчивость видов рода *Daphnia* O.F. Müller. 1785 (Cladocera, Daphniidae) // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 5. С. 1–10. doi 10.7868/S0044513416050160
48. Ishida S., Takahashi A., Matsushima N. et al. The long-term consequences of hybridization between the two *Daphnia* species, *D. galeata* and *D. dentifera*, in mature habitats // BMC Evol. Biol. 2011. V. 11. doi 10.1186/1471-2148-11-209
49. Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Скоринов Д.В. О криптических видах (на примере амфибий) // Зоол. журн. 2004. Т. 83. № 8. С. 936–960.
50. Templeton A.R. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 779–791.
51. Fišer C., Robinson C.T., Malard F. Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept // Mol. Ecol. 2017. doi 10.1111/mec.14486
52. Stocsits R.R., Letsch H., Hertel J. et al. Accurate and efficient reconstruction of deep phylogenies from structured RNAs // Nucl. Acids. Res. 2009. V. 37. № 18. P. 6184–6193. doi 10.1093/nar/gkp600

Identification and Phylogeny of Cryptic Species of the *Daphnia longispina* Complex (Anomopoda, Daphniidae) Using ITS2 Secondary Structure

E. I. Zuykova*

Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630091 Russia

*e-mail: zuykova@ngs.ru

The cladocerans of genus *Daphnia* O.F. Müller (Crustacea: Cladocera) are typical inhabitant of different water bodies and are used as model objects in various fields of biology. Within this genus the considerable number of closely related and cryptic species is noted. The identification of such species based on morphological traits often involves difficulties. In the present work, we identified species belonging to the *Daphnia longispina* complex, *D. longispina* O.F. Müller, *D. hyalina* Leydig, *D. umbra* Taylor, Hebert et Colbourne and *D. cf. longispina*, using the data about the predicted secondary structure of the second internal transcribed spacer ITS2 of nuclear DNA. The phylogenetic analysis with use of an algorithm Profile Neighbor-Joining and the analysis of compensatory base changes corroborated the specific status of *D. hyalina* and *D. cf. longispina*. The data on secondary structure of ITS2 can be applied to the solution of the taxonomical problems within different specific complexes of cladocerans.

Keywords: *Daphnia longispina*, cryptic species, nuclear DNA, ITS2.