

ИЗМЕНЧИВОСТЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В РАЙОНЕ ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 КЛАСТЕРА ГЕНОВ рРНК У ВИДОВ СЕМЕЙСТВА Chironomidae

© 2020 г. Л. И. Гундерина¹*, А. В. Катохин¹

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: gund@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 31.07.2019 г.

После доработки 13.02.2020 г.

Принята к публикации 07.03.2020 г.

Изучали изменчивость нуклеотидных последовательностей рибосомных генов и внутренних транскрибируемых спейсеров, расположенных в районе ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2, разделяющем гены 18S и 28S рРНК в кластере генов рРНК, с целью оценить возможность использования этих последовательностей в качестве молекулярных маркеров для идентификации видов и реконструкции филогении семейства Chironomidae. Установили, что у видов семейства Chironomidae доля АТ пар нуклеотидов в последовательностях генов 5.8S рРНК и 2S рРНК ниже (50–57%), чем в последовательностях внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2 (64–71%). Размеры нуклеотидных последовательностей генов 5.8S рРНК (123 пн) и 2S рРНК (30 пн) у видов семейства Chironomidae консервативны, а размеры внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2 варьируют как внутри вида, так и между видами. В последовательностях гена 2S рРНК у 27 видов из пяти родов семейства Chironomidae не обнаружено ни внутривидовых, ни межвидовых, ни межродовых различий нуклеотидов. Нуклеотидные последовательности гена 5.8S рРНК идентичны у большинства изученных видов рода *Chironomus*. Фиксированные межвидовые замены нуклеотидов найдены только в двух сайтах последовательности этого гена у трех видов: *C. piger*, *C. riparius* (473C>T) и *C. annularius* (474A>G). Число инсерций, делеций и замен нуклеотидов в последовательностях внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2a, ITS2 и всего района ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 в целом низкое внутри видов, увеличивается в 5–6 раз у видов-двойников и более чем в 10 раз – у морфологически различимых видов, то есть растет в соответствии с ростом таксономического статуса видов семейства Chironomidae. Полученные данные свидетельствуют о том, что нуклеотидные последовательности рибосомных генов и внутренних транскрибируемых спейсеров из района ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 кластера генов рРНК, могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров для идентификации видов и реконструкции филогении семейства Chironomidae.

Ключевые слова: Chironomidae, *Chironomus*, 2S рРНК, 5.8S рРНК, ITS1, ITS2a, ITS2, нуклеотидная изменчивость.

DOI: 10.31857/S0016675820080056

Комары-звонцы (Chironomidae, Diptera) – процветающее семейство насекомых, насчитывающее несколько тысяч видов и населяющее все континенты земного шара [1]. В составе семейства Chironomidae выделено 11 подсемейств [2]. Подсемейство Chironominae включает более 64 родов [3]. Род *Chironomus* насчитывает около 200 видов [4]. Изучение эволюции рода *Chironomus* традиционными методами с использованием морфологических признаков личинок, куколок и имаго затруднено и малоэффективно из-за большого морфологического сходства разных видов [5]. Поэтому не ослабевают поиск других подходов

к идентификации этих видов и реконструкции филогенетических связей между ними.

Анализ кариотипов показал видоспецифичность рисунка дисков политенных хромосом в клетках слюнных желез личинок и стал наиболее надежным методом идентификации видов рода *Chironomus* [6, 7]. К настоящему времени описаны кариотипы и охарактеризованы кариофонды большинства видов этого рода [8, 9]. Сравнение последовательностей дисков в хромосомных плечах позволило установить филогенетические связи между видами рода *Chironomus* [6, 10–13]. Сохраняя топологию, эти филогенетические дере-

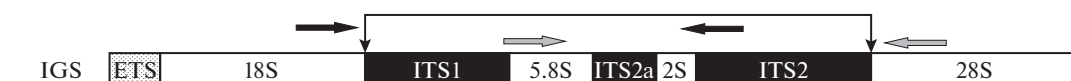


Рис. 1. Схема мономерной единицы кластера генов рРНК видов семейства Chironomidae. 18S, 5.8S, 2S, 28S – гены рибосомной РНК, ITS1, ITS2a, ITS2 – внутренние транскрибируемые спейсеры, ETS – внешний транскрибируемый спейсер, IGS – межгенный спейсер. Скобкой отмечен район ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2, изученный в настоящей работе. Черные стрелки обозначают расположение участков, комплементарных праймерам chir5F и chir5R, серые – chir9F и chir9R.

вья варьируют в деталях, в зависимости от набора видов, числа и набора хромосомных плеч, а также от метода оценки различий последовательностей дисков в хромосомах. Необходимо отметить, что эти филогенетические деревья нельзя укоренить, поскольку в настоящее время невозможно установить гомологию дисков и их последовательностей в хромосомах видов рода *Chironomus* и видов из других родов подсемейства Chironominae, которые могли бы составить внешнюю группу при построении деревьев. Поэтому они отражают только филогенетические связи между видами, а не общее направление эволюции видов в роде *Chironomus*.

В последние годы для идентификации видов рода *Chironomus* используются нуклеотидные последовательности митохондриальных и ядерных генов. Наиболее часто с этой целью используют митохондриальные гены – ген 1-ой субъединицы цитохрома С оксидазы (*COI*) и ген цитохрома b (*Cytb*) [14–16]. Гены ядерного генома: глобина 2b (*gb2b*) [14–16], а также районы внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 из семейства генов рибосомных РНК [17–19] используются для этой цели намного реже. Между тем, митохондриальные гены не всегда надежно идентифицируют виды [15, 16], поскольку для них характерен материнский тип наследования, и потомство от межвидовых скрещиваний имеет материнский тип митохондриальной ДНК независимо от генотипа ядерной ДНК.

Из генов ядерного генома для идентификации видов и реконструкции филогении многочисленных групп растений и животных наиболее широко используются гены, кодирующие рибосомные РНК. Эукариотический геном содержит несколько сотен tandemно расположенных копий генов рРНК, образующих мультигенное семейство. Каждый tandem включает три рибосомных гена – 18S рРНК, 5.8S рРНК и 28S рРНК, разделенных внутренними транскрибируемыми спейсерами ITS1 и ITS2. В некоторых семействах насекомых в районе ITS2 расположен дополнительный ген 2S рРНК, отделенный от 5.8S рРНК внутренним транскрибируемым спейсером ITS2a (рис. 1). Гены 5.8S рРНК и 2S рРНК консервативны, а районы спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2 полиморфны и используются как филогенетические маркеры [20–26].

Наиболее часто, по сравнению с другими районами кластера генов рРНК, в филогенетических исследованиях используется внутренний транскрибируемый спейсер ITS2. Его популярность обусловлена тем, что наряду с высокой вариабельностью и межвидовой дивергенцией, нуклеотидные последовательности ITS2 проявляют значительный консерватизм вторичной структуры, специфичной для эукариот. Консервативные районы являются реперами, существенно повышающими точность выравнивания последовательностей ITS2, и увеличивают тем самым надежность идентификации видов и филогенетических реконструкций [27, 28]. Вместе с тем, как показывают результаты специальных сравнительных исследований, эффективность диагностики видов при использовании нуклеотидных последовательностей ITS1 не ниже, чем при использовании ITS2 [29].

Цель настоящей работы – оценить эффективность использования нуклеотидных последовательностей рибосомных генов 5.8S рРНК и 2S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2, локализованных в районе ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2, разделяющем гены 18S рРНК и 28S рРНК в кластере генов рРНК, в качестве молекулярных маркеров для диагностики видов и реконструкции филогении семейства Chironomidae. В настоящем сообщении представлены результаты анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей генов 5.8S рРНК, 2S рРНК и спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2 у видов семейства Chironomidae.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали личинок IV возраста двадцати двух видов рода *Chironomus* из подродов *Chironomus* и *Camptochironomus*, собранных в водоемах Западной Сибири (Россия) и Северной Америки (табл. 1).

Личинок фиксировали в 96%-ном этаноле для последующего выделения ДНК и хранили при –20°C. Идентификацию видов проводили как по морфологии личинок, так и цитогенетически, по рисунку дисков в политенных хромосомах клеток слюнных желез [6, 7]. Принадлежность видов рода *Chironomus* к цитоккомплексам и группам ви-

Таблица 1. Виды из семейств Chironomidae и Simuliidae, использованные в работе, их принадлежность к цито-комплексам и группам видов-двойников, а также номера последовательностей в базе данных GenBank

Вид	Цитокомплекс [8, 9]	Группа видов-двойников [8, 9]	Число последовательностей	Номер последовательности в базе данных GenBank
<i>Chironomus agilis</i> Schobanov et Djomin, 1988 ¹	thummi (thu) AB CD EF G	Группа <i>C. plumosus</i> (plu)	2	GU053584 + HQ656579, GU053585 + HQ656580
<i>Chironomus</i> “annularius” sensu Strenzke, 1959 ¹	То же	Группа UO species (uo)	6	MK45020 AJ296767–AJ296770, AJ296821
<i>Chironomus balatonicus</i> Devai, Wuelker et Scholl, 1983 ¹	»	Группа <i>C. plumosus</i> (plu)	2	GU053586 + HQ656581, GU053587 + HQ656582
<i>Chironomus borokensis</i> Kerkis, Filippova, Shobanov, Gunderina et Kiknadze, 1988 ¹	»	Группа <i>C. plumosus</i> (plu)	3	MK450121–MK450123
<i>Chironomus cingulatus</i> Meigen, 1830 ¹	»	Группа UO species (uo)	6	MK450124, MK450125 AJ296771–AJ296774
<i>Chironomus dilutus</i> Shobanov, Kiknadze et Butler, 1999 ¹	camptochironomus (cam) AB CF ED G	Группа <i>C. camptochironomus</i> (cam)	1	MK450126
<i>Chironomus</i> “dorsalis” sensu Strenzke, 1959 ¹	pseudothummi (pst) AE BF CD G		2	GU053590 + HQ656594, GU053591 + HQ656595
<i>Chironomus luridus</i> Strenzke, 1959 ¹	То же		3	GU053594 + HQ656596 AJ296778, AJ296779
<i>Chironomus melanescens</i> Keyl, 1961 ¹	»		2	MK450127, MK450128
<i>Chironomus melanotus</i> Keyl, 1961 ¹	thummi (thu) AB CD EF G	Группа UO species (uo)	2	AJ296780, AJ296781
<i>Chironomus muratensis</i> Ryser, Scholl et Wuelker, 1983 ¹	То же	Группа <i>C. plumosus</i> (plu)	2	GU053605 + HQ656584, MK450129
<i>Chironomus nudiventris</i> Ryser, Scholl et Wuelker, 1983 ¹	»	Группа <i>C. plumosus</i> (plu)	2	GU053595 + HQ656586, GU053596 + HQ656587
<i>Chironomus nuditarsis</i> Keyl, 1961 ¹	»	Группа UO species (uo)	4	MK450130, MK450131 AJ296782, AJ296783
<i>Camptochironomus</i> “pallidivittatus” sensu Beermann, 1955 ¹	camptochironomus (cam) AB CF ED G	Группа <i>C. camptochironomus</i> (cam)	1	AJ296805
<i>Chironomus plumosus</i> (Linnaeus, 1758) ¹	thummi (thu) AB CD EF G	Группа <i>C. plumosus</i> (plu)	10	GU053598 + HQ656589, GU053597 + HQ656588 AJ296784–AJ296790, AJ296822

Таблица 1. Окончание

Вид	Цитокомплекс [8, 9]	Группа видов-двойников [8, 9]	Число последовательностей	Номер последовательности в базе данных GenBank
<i>Chironomus piger</i> Strenzke, 1959 ¹	thummi (thu) AB CD EF G	Группа <i>C. piger</i> (pig)	11	GU053599 + HQ656591, МК450132, МК450133 AJ296806, AJ296808–AJ296813
<i>Chironomus pseudothummi</i> Strenzke, 1959 ¹	pseudothummi (pst) AE BF CD G		4	GU053601 + HQ656597, GU053602 + HQ656598 AJ296791, AJ296792
<i>Chironomus riparius</i> Meigen, 1804 ¹	thummi (thu) AB CD EF G	Группа <i>C. piger</i> (pig)	10	GU053599 + HQ656591, МК450132 AJ296806, AJ296808–AJ296814
<i>Chironomus setivalva</i> Shilova, 1957 ¹	camptochironomus (cam) AB CF ED G	Группа <i>C. camptochironomus</i> (cam)	2	МК450136, МК450137
<i>Chironomus sororius</i> Wuelker, 1973 ¹	thummi (thu) AB CD EF G	Группа <i>C. aberratus</i> (abe)	2	МК450138, МК450139
<i>Chironomus staegeri</i> Lundbeck, 1898 ¹	То же	Группа <i>C. staegeri</i> (sta)	2	МК450140, МК450141
<i>Chironomus tentans</i> Fabricius, 1805 ¹	camptochironomus (cam) AB CF ED G	Группа <i>C. camptochironomus</i> (cam)	1	X99212
<i>Dicrotendipes fumidus</i> Johanssen, 1905 ²			1	AY821866
<i>Glyptotendipes salinus</i> Michailova, 1987 ³			3	AJ296802–AJ296804
<i>Glyptotendipes barbipes</i> Staeger, 1839 ³			5	AJ296793–AJ296797
<i>Acricotopus lucens</i> Zetterstedt, 1850 ⁴			1	AJ586563
<i>Ablabesmyia rhamphe</i> Sublette, 1964 ⁵			1	U48384
<i>Simulium trifasciatum</i> Curtis, 1839 ⁶			1	EU429933
<i>Simulium ornatum</i> Meigen, 1818 ⁶			1	EU429812
<i>Simulium aureum</i> Fries, 1824 ⁶			1	FJ437565
<i>Simulium pictipes</i> Hagen, 1880 ⁶			1	FJ436351

Примечание. GU – последовательности включают районы 18S рРНК, ITS1, 5.8S рРНК кластера генов рРНК, HQ – последовательности включают районы 5.8S рРНК, ITS2a, 2S рРНК, ITS2, 28S рРНК кластера генов рРНК. МК – последовательности включают районы 18S рРНК, ITS1, 5.8S рРНК, ITS2a, 2S рРНК, ITS2, 28S рРНК кластера генов рРНК. ¹ – семейство Chironomidae, подсемейство Chironominae, род *Chironomus*, ² – семейство Chironomidae, подсемейство Chironominae, род *Dicrotendipes*, ³ – семейство Chironomidae, подсемейство Chironominae, род *Glyptotendipes*, ⁴ – семейство Chironomidae, подсемейство Orthoclaadiinae, род *Acricotopus*, ⁵ – семейство Chironomidae, подсемейство Tanypodinae, род *Ablabesmyia*, ⁶ – семейство Simuliidae, род *Simulium*.

дов-двойников определяли по структуре карิโอ-типов [8, 9].

Геномную ДНК выделяли из индивидуальных личинок с использованием набора QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit по прописи производителя. Для амплификации последовательности ДНК из района ITS1–5.8S рРНК–ITS2а–2S рРНК–ITS2 кластера генов рРНК сконструировали две пары праймеров, используя программу “Primer3” [30]. С помощью первой пары праймеров (5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3' (chir5F) и 5'-CGACACTCAACCATATGTACC-3' (chir5R)) амплифицировали район 18S рРНК–2S рРНК. Вторую пару праймеров (5'-GACATGTTGAACG-CATATTG-3' (chir9F) и 5'-TGCTTAAATTCAGG-GGGTAG-3' (chir9R)) использовали для амплификации района 5.8S рРНК–28S рРНК (рис. 1). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе BIS в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 65 мМ Трис-НСI (рН 8.9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.05% твин-20, 1.5 мМ MgCl₂, по 0.2 мМ dNTP каждого, 25–50 нг ДНК матрицы, по 0.5 мкМ каждого из праймеров и 1 ед. Taq-полимеразы. ПЦР проходила в следующих условиях: денатурация – 1 мин при 94°C, затем 25 циклов: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг – 30 с при 57°C, элонгация – 45 с при 72°C. Продукты амплификации были очищены с помощью набора MinElute® Gel Extraction Kit (QIAGEN) по прописи производителя. Очищенные продукты были секвенированы в обоих направлениях с использованием набора Big Dye Terminators v. 3.1 и анализатора ABI PRISM 3100 (Центр коллективного пользования “Геномика” СО РАН, Новосибирск, www.niboch.nsc.ru). Нуклеотидные последовательности редактировали с помощью программы ChromasLite_2.0 (Technelysium Pty. Ltd.). Последовательности видов рода *Chironomus*, секвенированные нами, помещены в базу данных GenBank под номерами GU053584–GU053605, HQ656579–HQ656601, KP985230–KP985232, MK450120–MK450141 (табл. 1). Наряду с этим использовали нуклеотидные последовательности из изучаемого района у видов рода *Chironomus* и некоторых других родов семейства Chironomidae (*Ablabesmyia*, *Acricotopus*, *Dicrotendipes* и *Glyptotendipes*), а также видов из рода *Simulium* семейства Simuliidae, представленные в базе данных GenBank (табл. 1).

Последовательности выравнивали с использованием программы MUSCLE [31], после чего выравнивание дополнительно редактировали вручную. Молекулярно-генетический анализ последовательностей (определение нуклеотидного состава и изменчивости нуклеотидных последовательностей) осуществляли с помощью пакета программ MEGA 6 [32].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нуклеотидный состав и размеры нуклеотидных последовательностей

В кластере рибосомных генов в районе, разделяющем гены 18S рРНК и 28S рРНК, расположены гены 5.8S рРНК, 2S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1, ITS2а и ITS2 (рис. 1). У видов из родов *Chironomus*, *Dicrotendipes*, *Glyptotendipes* и *Acricotopus* последовательности генов 5.8S рРНК и 2S рРНК и спейсеров ITS1, ITS2а и ITS2 существенно различаются по нуклеотидному составу. Тогда как в последовательностях этих генов количество АТ и GC пар нуклеотидов примерно одинаково (50.0–57.0%), последовательности ITS1, ITS2а и ITS2 обогащены АТ-парами нуклеотидов: их доля (63.0–75.0%) в два–три раза превышает долю GC-пар (табл. 2). Вместе с тем у вида *A. rhamphe* из рода *Ablabesmyia* (подсемейство Tanypodinae, семейство Chironomidae) в отличие от других видов семейства Chironomidae, доли АТ и GC пар нуклеотидов были близки к 0.5 не только в последовательностях генов 5.8S рРНК и 2S рРНК, но и в последовательностях спейсеров ITS1 и ITS2 (табл. 2). Размеры нуклеотидных последовательностей генов 5.8S рРНК (123 пн) и 2S рРНК (30 пн) не проявляют ни внутривидовой, ни межвидовой изменчивости и у всех изученных видов рода *Chironomus* одинаковы по длине (табл. 2).

Вместе с тем длина района ITS1–5.8S рРНК–ITS2а–2S рРНК–ITS2 у видов рода *Chironomus* варьирует в широких пределах, свидетельствуя о существовании как внутривидовой, так и межвидовой изменчивости этого района. Минимальная его длина наблюдается у *C. luridus* (762 пн), максимальная – у *C. staegeri* (899 пн). Внутривидовая изменчивость размеров изучаемого района характерна для всех видов хирономид. У разных особей *C. luridus* его длина варьирует от 759 до 765 пн. У *C. piger* район ITS1–5.8S рРНК–ITS2а–2S рРНК–ITS2 существенно длиннее, чем у *C. luridus*, и его длина варьирует в более широких пределах – от 820 до 842 пн. В среднем длина изученного района у 22 изученных видов рода *Chironomus* составляет 839.6 пн (табл. 2).

Поскольку длины последовательностей генов 5.8S рРНК и 2S рРНК консервативны, разнообразие размеров района ITS1–5.8S рРНК–ITS2а–2S рРНК–ITS2 у хирономид обусловлено изменчивостью длин спейсеров ITS1, ITS2 и ITS2а. Длина ITS1 у видов рода *Chironomus* варьирует от 208 пн у *C. luridus* до 327 пн у *C. staegeri*, составляя в среднем 250.8 пн. Минимальная длина спейсера ITS2 наблюдается у *C. melanesensis* (345 пн), максимальная (437 пн) – у *C. sororius*, при среднем значении длины этого района у изученных видов хирономид – 392.0 пн. Самый короткий спейсер – ITS2а (его длина составляет в среднем 41.1 пн) варьиру-

Таблица 2. Размеры и нуклеотидный состав последовательностей генов 5.8S рРНК, 2S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2 в районе ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 кластера генов рРНК у видов семейства Chironomidae

Подсемейство	Род	N_{sp}	N_{seq}	Район											
				ITS1		5.8S рРНК		ITS2a		2S рРНК		ITS2		ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2	
				L	AT	L	AT	L	AT	L	AT	L	AT	L	AT
Chironominae	<i>Chironomus</i>	22	79	250.8 (208–327)	68.0	123.0	49.8	41.1 (38–45)	71.1	30.0	56.7	392.0 (345–437)	66.1	839.6 (762–899)	64.5
	<i>Dicrotendipes</i>	1	1	199.0	74.7	121.0	49.6	19.0	52.6	30.0	56.7	354.0	64.1	726.0	62.6
	<i>Glyptotendipes</i>	2	8	269.3 (259–275)	68.8	123.1 (123–124)	49.1	23.0	69.6	30.0	56.7	371.1 (368–376)	74.0	816.5 (804–824)	70.0
Orthoclaadiinae	<i>Acricotopus</i>	1	1	252.0	73.8	123.0	50.4	24.0	70.8	30.0	56.7	275.0	73.5	704.0	69.0
Tanypodinae	<i>Ablabesmyia</i>	1	1	191.0	57.6	123.0	51.2	39.0	61.5	30.0	56.7	345.0	52.8	728.0	54.7

Примечание. N_{sp} – число видов, N_{seq} – число последовательностей, L – средняя длина последовательности (пн), в скобках min–max значения, AT – доля AT нуклеотидов (в %).

ет по длине от 38 пн (*C. balatonicus*, *C. plumosus*, *C. cingulatus*, *C. staegeri*) до 45 пн (*C. piger*, *C. sororius*).

Нуклеотидные последовательности района ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 у видов семейства Chironomidae из родов *Dicrotendipes*, *Glyptotendipes* (подсемейство Chironominae), *Ablabesmyia* (подсемейство Tanypodinae) и *Acricotopus* (подсемейство Orthoclaadiinae) несколько короче, чем у видов рода *Chironomus* (табл. 2). Тем не менее, длина выравнивания 90 последовательностей 27 видов из пяти родов семейства Chironomidae составляет 1191 пн и существенно превышает длину последовательностей ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 каждого из изученных видов (табл. 2). Это свидетельствует о значительных внутривидовых, межвидовых и межродовых различиях последовательностей ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 у видов семейства Chironomidae, которые приводят к появлению инсерций и делеций (инделов) и увеличению общей длины этого района при выравнивании последовательностей.

Инсерции и делеции нуклеотидов (инделов)

Внутривидовые инсерции и делеции нуклеотидов (инделов) наблюдались в последовательностях из района ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 у четырнадцати из двадцати двух изученных видов рода *Chironomus* (*C. staegeri*, *C. sororius*, *C. annularius*, *C. cingulatus*, *C. melanotus*, *C. nuditarsis*, *C. agilis*, *C. balatonicus*, *C. plumosus*, *C. setivalva*, *C. riparius*, *C. luridus*, *C. pseudothummi*, *C. melanescens*). Число инделов в последовательностях этих видов варьирует от одной до сорока одной пары нуклеотидов, составляя в среднем

10.9 ± 12.4 пн. С увеличением ранга таксономических групп в роде *Chironomus* число инделов в нуклеотидных последовательностях изучаемого района растет, достигая 62.4 ± 29.3 пн у видов-двойников и 138.3 ± 37.1 пн у морфологически различимых видов рода *Chironomus*.

Нуклеотидные последовательности генов 5.8S рРНК, 2S рРНК и спейсеров ITS1, ITS2a, ITS2 неодинаковы по длине (табл. 2, 3). Поэтому, чтобы исключить зависимость числа инделов от длины последовательности, рассчитывали число инделов на сайт (табл. 3). В последовательностях генов рРНК внутри вида инделы встречаются редко. Делеция 524delC наблюдалась только в одной из двух изученных последовательностей гена 5.8S рРНК *C. balatonicus*. И только в одной из десяти последовательностей гена 2S рРНК *C. plumosus* была обнаружена инсерция 612insC. При этом необходимо отметить, что в таксонах более высокого ранга – у видов-двойников и морфологически различимых видов, инделы в последовательностях этих генов не были найдены (табл. 3).

В последовательностях спейсера ITS2a внутривидовые инделы не были найдены ни у одного из изученных видов хирономид. Однако у видов-двойников и морфологически различимых видов инделы в последовательностях этого спейсера встречались в значительном количестве (табл. 3). В последовательностях спейсеров ITS1, ITS2 и всего района ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 в целом, число инделов на сайт у видов-двойников увеличилось в пять–шесть раз, а у морфологически различимых видов – более чем в десять раз по сравнению с их частотой внутри ви-

Таблица 3. Изменчивость числа индел на сайт в нуклеотидных последовательностях генов 5.8S рРНК, 2S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2 в районе ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 кластера генов рРНК у видов рода *Chironomus* из разных таксономических групп

Район	L, пн	Среднее число и стандартное отклонение индел на сайт		
		внутри видов	внутри групп видов-двойников	между морфологически различимыми видами
ITS1	407	0.012 ± 0.015	0.069 ± 0.035	0.148 ± 0.040
5.8S рРНК	124	0.0004 ± 0.002	0	0
ITS2a	49	0	0.023 ± 0.022	0.082 ± 0.044
2S рРНК	31	0.002 ± 0.007	0	0
ITS2	580	0.010 ± 0.016	0.058 ± 0.032	0.136 ± 0.052
ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2	1191	0.009 ± 0.010	0.052 ± 0.025	0.116 ± 0.031

Примечание. L – длина нуклеотидной последовательности после выравнивания (пн – пары нуклеотидов).

Таблица 4. Изменчивость числа замен нуклеотидов на сайт в последовательностях генов 5.8S рРНК, 2S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2 в районе ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 кластера генов рРНК у видов рода *Chironomus* из разных таксономических групп

Район	L, пн	Среднее число замен нуклеотидов на сайт								
		внутри видов			внутри групп видов-двойников			между морфологически различимыми видами		
		t_s	t_v	R	t_s	t_v	R	t_s	t_v	R
ITS1	407	0.004 ± 0.005	0.007 ± 0.012	0.6	0.021 ± 0.010	0.016 ± 0.004	1.3	0.045 ± 0.016	0.055 ± 0.027	0.8
5.8S рРНК	124	0.002 ± 0.005	0	–	0.001 ± 0.003	0	–	0.006 ± 0.006	0	–
ITS2a	49	0	0	–	0.006 ± 0.010	0.003 ± 0.008	2.0	0.008 ± 0.011	0.008 ± 0.011	1.0
2S рРНК	31	0.002 ± 0.007	0	–	0	0	–	0	0	–
ITS2	580	0.004 ± 0.006	0.005 ± 0.010	0.8	0.030 ± 0.017	0.025 ± 0.013	1.2	0.058 ± 0.023	0.067 ± 0.029	0.9
ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2	1191	0.003 ± 0.004	0.005 ± 0.007	0.7	0.023 ± 0.011	0.017 ± 0.008	1.4	0.043 ± 0.010	0.047 ± 0.014	0.9

Примечание. L – длина нуклеотидной последовательности после выравнивания (пн – пары нуклеотидов), t_s – среднее число и стандартное отклонение транзиций на сайт, t_v – среднее число и стандартное отклонение трансверсий на сайт, R – отношение числа транзиций к числу трансверсий.

да (табл. 3), т.е. оно растет с ростом таксономического статуса сравниваемых видов.

Замены нуклеотидов

Наряду с инсерциями и делециями, в нуклеотидных последовательностях генов 2S рРНК, 5.8S рРНК и спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2 в районе ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 у видов рода *Chironomus* широко распространены замены нуклеотидов. Число замен нуклеотидов на сайт низкое в последовательностях внутри вида, нарастает у видов-двойников и у морфологически различных видов рода *Chironomus* (табл. 4).

Внутривидовые различия нуклеотидных последовательностей гена 2S рРНК наблюдались лишь у одного вида рода *Chironomus* – *C. nudatarsis*. Замена 593A>G произошла в одной из четырех последовательностей этого вида (AJ 296783). Других различий нуклеотидов, межвидовых или межродовых, в последовательностях этого гена у видов семейства Chironomidae не обнаружено. Это означает, что различить виды рода *Chironomus* и других родов этого семейства, используя последовательности гена 2S рРНК, невозможно.

Последовательности гена 5.8S рРНК более изменчивы. Замены нуклеотидов в этих последова-

тельностях обнаружены и внутри видов, и у морфологически различимых видов рода *Chironomus*, и у видов из других родов семейства Chironomidae. Однако число замен нуклеотидов у видов рода *Chironomus* невелико, и представлены они только транзициями. Фиксированные межвидовые различия найдены в двух сайтах последовательности гена 5.8S рРНК: консервативная замена 473С>Т произошла у *C. riparius* и *C. piger* из группы видов-двойников *C. piger*, а консервативная замена 474А>G — у *C. annularius* (род *Chironomus*) и видов рода *Glyptotendipes*. Таким образом, различия нуклеотидов в двух сайтах последовательности гена 5.8S рРНК позволяют дифференцировать три вида рода *Chironomus* (*C. riparius*, *C. piger* и *C. annularius*).

Последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2a, и ITS2 у видов рода *Chironomus* намного более полиморфны, чем последовательности генов 2S рРНК и 5.8S рРНК. Число замен нуклеотидов на сайт в последовательностях спейсеров ITS1, ITS2a, ITS2 и всего района ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 (в целом) растет с увеличением таксономического статуса видов рода *Chironomus*. Наименьшее число замен нуклеотидов наблюдается в этих последовательностях внутри вида — $t_s = 0.003–0.004$ (т.е. 3–4 замены нуклеотидов на сайт в последовательности длиной 1000 нуклеотидов). У видов-двойников число замен нуклеотидов в последовательностях спейсеров увеличивается в 6–7 раз ($t_s = 0.021–0.030$), а у морфологически различимых видов — более, чем в 10 раз ($t_s = 0.043–0.058$) по сравнению с числом замен нуклеотидов на сайт внутри вида (табл. 4). Замены нуклеотидов в последовательностях спейсеров у видов рода *Chironomus* представлены как транзициями, так и трансверсиями. Причем, если в последовательностях спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2 внутри вида и у морфологически различимых видов частоты транзиций ниже чем частоты трансверсий, то у видов-двойников транзиции преобладают (табл. 4).

Суммарная длина последовательностей генов 5.8S рРНК и 2S рРНК составляет 155 пн (13% от общей длины изучаемого района) — значительно меньше суммарной длины внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1, ITS2a, и ITS2 — (1036 пн, 87% от общей длины). Это позволяет полагать, что закономерности нуклеотидной изменчивости всего района ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 определяются в основном изменчивостью спейсеров ITS1, ITS2a и ITS2, входящих в его состав, а низкополиморфные и консервативные последовательности генов 5.8S рРНК и 2S рРНК вносят свой вклад, снижая общую изменчивость

этого района и увеличивая его консервативную часть (табл. 4). Внутривидовая и межвидовая изменчивости нуклеотидных последовательностей спейсеров ITS1, ITS2a, ITS2 и всего района ITS1–5.8S рРНК–ITS2a–2S рРНК–ITS2 в целом, а также закономерное увеличение изменчивости этих районов с ростом таксономического статуса групп видов рода *Chironomus*, показывают, что эти последовательности могут рассматриваться в качестве перспективных молекулярных маркеров для идентификации видов и реконструкции филогении семейства Chironomidae.

ОБСУЖДЕНИЕ

У видов семейства Chironomidae рибосомные гены 5.8S рРНК и 2S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1, ITS2a и ITS2, разделяющие их, существенно различаются по нуклеотидному составу: в последовательностях рибосомных генов количество нуклеотидов АТ и GC примерно равно, в то время как последовательности спейсеров обогащены АТ нуклеотидами. Такое же соотношение нуклеотидов в районах рибосомных генов и спейсеров наблюдается и у многих видов Diptera [17, 21–29].

Значительный вклад в изменчивость последовательностей изучаемого района у видов семейства Chironomidae вносят делеции и инсерции нуклеотидов, которые приводят к вариациям длины этого района. Такой тип изменчивости широко распространен и наблюдается не только у хирономид, но и в других группах живых организмов [23–26].

У 25 видов рода *Culicoides* длины последовательностей ITS1 варьируют от 279 до 585 пн [24]. В зависимости от длины этого района виды разделяются на две дискретные группы: с короткими и длинными последовательностями ITS1. Различие этих групп обусловлено количеством инделов, образующих в последовательностях ITS1 треки разной длины. У видов подрода *Avarita* в последовательностях ITS1 содержатся многочисленные инделлы, и потому они относятся к группе видов с коротким ITS1. Напротив, виды из подродов *Beltranmyia* и *Trithecoides* относятся к группе видов с длинным ITS1, поскольку инделлы в последовательностях ITS1 у них малочисленны, и соответственно длины ITS1 больше, чем у других видов. Длины последовательностей ITS2 у видов рода *Culicoides* (188–267 пн) также варьируют из-за различного содержания инделлов. Однако инделлы в этих последовательностях не образуют видоспецифических треков как в последовательностях ITS1 [24]. Такие же значительные различия длин ITS1 (95–492 пн) обнаружены и у видов семейства Simuliidae. Однако разнообразие длин последовательностей ITS1 у этих

видов обусловлено не только количеством инделов, но и длиной и количеством повторов [25].

Наиболее распространенным типом изменчивости района ITS1–5.8S рРНК–ITS2а–2S рРНК–ITS2 у видов рода *Chironomus* является замена нуклеотидов. Число замен нуклеотидов на сайт характеризует степень дивергенции нуклеотидных последовательностей. Анализ показал, что изучаемый район у видов семейства Chironomidae неоднороден по степени изменчивости нуклеотидных последовательностей: высокополиморфные спейсеры ITS1, ITS2а и ITS2 чередуются с низкополиморфными и консервативными последовательностями генов 5.8S рРНК и 2S рРНК. В ходе дивергенции видов хирономид замены нуклеотидов приводят к появлению и закреплению видоспецифических последовательностей в высокополиморфных районах ITS1 и ITS2. Существование видоспецифических и консервативных последовательностей в районе ITS1–5.8S рРНК–ITS2а–2S рРНК–ITS2 создает предпосылки для идентификации видов семейства Chironomidae путем конструирования видоспецифических и универсальных ПЦР-праймеров, продуцирующих ампликоны только с ДНК видов-мишеней. Применение такого подхода позволило создать видоспецифические праймеры для идентификации пяти видов рода *Chironomus* – *C. plumosus*, *C. balatonicus*, *C. piger*, *C. dorsalis* и *C. pseudothummi* [33, 34], и продемонстрировало тем самым перспективность этого метода для идентификации видов рода *Chironomus*.

Полученные результаты показали, что нуклеотидные последовательности гена 2S рРНК видов семейства Chironomidae не проявляют межвидовых и межродовых различий и следовательно не могут использоваться для идентификации видов и родов этого семейства. Вместе с тем количество инделов и замен нуклеотидов в последовательностях внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 и всего района ITS1–5.8S рРНК–ITS2а–2S рРНК–ITS2 в целом закономерно возрастает с увеличением ранга таксонов в семействе Chironomidae. Поэтому высокополиморфные последовательности спейсеров ITS1, ITS2а, ITS2 и всего изученного района в целом могут рассматриваться в качестве перспективных молекулярных маркеров для идентификации видов и реконструкции филогении семейства Chironomidae.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта 0324-2019-0042.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ferrington L.C.* Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater // *Hydrobiologia*. 2008. V. 595. № 1. P. 447–455. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9130-1>
2. *Saether O.A.* Phylogeny of the subfamilies of Chironomidae (Diptera) // *Syst. Entomol.* 2000. V. 25. № 3. P. 393–403. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.2000.00111.x>
3. *Wiederholm T.* Chironomidae of the Holarctic region. Keys and diagnoses. Part 1. Larvae // *Ent. Scand. Suppl.* 1983. V. 19. 457 p.
4. *Шобанов Н.А., Шилова А.И., Белянина С.И.* Объем и структура рода *Chironomus* Meig. (Diptera, Chironomidae): обзор мировой фауны // *Экология, эволюция и систематика хирономид*. Тольятти, Борок: ИБВВ и ИЭВБ РАН, 1996. С. 44–96.
5. *Lindeberg B., Wiederholm T.* Notes on the taxonomy of European species of *Chironomus* (Diptera Chironomidae) // *Ent. Scand. Suppl.* 1979. V. 10. P. 99–116.
6. *Keyl H.-G.* Chromosomenevolution bei *Chironomus*. II. Chromosomenumbauten und phylogenetische Beziehungen der Arten // *Chromosoma*. 1962. B. 13. № 4. S. 464–514. <https://doi.org/10.1007/BF00327342>
7. *Кикнадзе И.И., Шилова А.И., Керкис И.Е. и др.* // Кариотипы и морфология личинок трибы Chironomini. Атлас. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1991. 115 с.
8. *Kiknadze I., Istomina A., Golygina V., Gunderina L.* Karyotypes of Palearctic and Holarctic species of the genus *Chironomus* [Electronic resource] / Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics. Novosibirsk: Academic Publishing House “GEO”, 2016. 489 p.
9. *Martin J.* Australian, North American, New Zealand and Oriental *Chironomus* species. Available from: <http://www.chironomidae.net/Martin/JMRes.html> (Updated 22 March–11 May 2019).
10. *Wuelker W., Devai Gy., Devai I.* Computer assisted studies of chromosome evolution in the genus *Chironomus* (Dipt.) comparative and integrated analysis of chromosome arms A, E and F // *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.* 1989. F. 2. P. 373–387.
11. *Гундерина Л.И., Кикнадзе И.И., Истомина А.Г. и др.* Дивергенция последовательностей дисков полигенных хромосом как отражение эволюционных преобразований линейной структуры генома // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 2. С. 187–195.

12. Шобанов Н.А. Эволюция рода *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). 2. Филогенетическая модель // Зоол. журн. 2002. Т. 81. С. 711–718.
13. Kiknadze I.I., Gunderina L.I., Butler M.G. et al. Chromosomes and Continents / Eds Dobretsov N. et al. Biosphere Origin and Evolution, Springer, 2008. P. 349–369.
14. Guryev V., Makarevitch I., Blinov A., Martin J. Phylogeny of the genus *Chironomus* (Diptera) inferred from DNA sequences of mitochondrial *Cytochrome b* and *Cytochrome oxidase I* // Mol. Phylogenet. Evol. 2001. V. 19. № 1. P. 9–21.
<https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0898>
15. Martin J., Guryev V., Blinov A. Population variability in *Chironomus* (*Camptochironomus*) species (Diptera, Nematocera) with a Holarctic distribution: Evidence of mitochondrial gene flow // Insect Mol. Biol. 2002. V. 11. P. 387–397.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00348.x27>
16. Proulx I., Martin J., Carew M., Hare L. Using various lines of evidence to identify *Chironomus* species (Diptera: Chironomidae) in eastern Canadian lakes // Zootaxa. 2013. V. 3741. P. 401–458.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3741.4.1>
17. Gunderina L.I., Katokhin A.V. Variation and divergence of the rDNA ITS-1 region in species of the genus *Chironomus* (Diptera: Chironomidae) // Contemporary Chironomid Studies 2011. Proceedings of the XVII International Symposium on Chironomidae. July 6–9. 2009, Nankai University. Nankai University Press, China. P. 22–35.
18. Asari H., Kasuya S., Kobayashi T. et al. Identification of closely related *Hydrobaenus* species (Diptera: Chironomidae) using the second internal transcribed spacer (ITS2) region of ribosomal DNA // Aquatic Insects. 2004. V. 26. №3/4. P. 207–213.
<https://doi.org/10.1080/01650420412331327295>
19. Kaga K., Kasuya S., Kobayashi T., Ohtaka A. Identification of chironomid species by DNA sequence – Especially genus *Hydrobaenus* including *H. sp. “Tsugaru”* // Contemporary Chironomid Studies. Proceedings of the XVII International Symposium on Chironomidae. July 6–9. 2009. Nankai University, Nankai University Press, China. 2011. P. 36–40.
20. Schlötterer Ch., Hauser M.-T., von Haeseler A., Tautz D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila* // Mol. Biol. Evol. 1994. V. 11. № 3. P. 513–522.
21. Tautz D., Hancock J.M., Webb D.A. et al. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster* // Mol. Biol. Evol. 1988. V. 5. № 4. P. 366–376.
22. Friedrich M., Tautz D. An episodic change of rDNA nucleotide substitution rate has occurred during the emergence of the insect order Diptera // Mol. Biol. Evol. 1997. V. 14. № 6. P. 644–653.
23. Stage D.E., Eickbush T.H. Sequence variation within the rRNA gene loci of 12 *Drosophila* species // Genome Research. 2007. V. 17. № 12. P. 1888–1897.
<https://doi.org/10.1101/gr.6376807>
24. Matsumoto Y., Yanase T., Tsuda T., Noda H. Characterization of internal transcribed spacer (ITS1)–ITS2 region of ribosomal RNA gene from 25 species of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Japan // J. Med. Entomol. 2009. V. 46. № 5. P. 1099–1108.
<https://doi.org/10.1603/033.046.0517>
25. LaRue B., Gaudreau C., Bagre H.O., Charpentier G. Generalized structure and evolution of ITS1 and ITS2 rDNA in black flies (Diptera: Simuliidae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2009. V. 53. № 3. P. 749–757.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.07.032>
26. Tatonova Y.V., Chelomina G.N., Besprosvannykh V.V. Genetic diversity of nuclear ITS1–5.8S–ITS2 rDNA sequence in *Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875 (Trematoda: Opisthorchidae) from the Russian Far East // Parasitology International. 2012. V. 61. P. 664–674.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.005>
27. Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // Trends in Genet. 2003. V. 19. № 7. P. 370–375.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00118-5)
28. Coleman A.W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure // Nucl. Ac. Res. 2007. V. 35. P. 3322–3329.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm233>
29. Wang X.C., Liu C., Huang L. et al. ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? // Mol. Ecol. Resources. 2015. V. 15. P. 573–586.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12325>
30. Rozen S., Skaletsky H.J. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers // Methods in Mol. Biol. 2000. V. 132. P. 365–386.
31. Edgar R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucl. Ac. Res. 2004. V. 32. № 5. P. 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
32. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
33. Gunderina L.I. Species-specific PCR primers for identification of the sibling species *Chironomus plumosus* (Linnaeus, 1758) and *Chironomus balatonicus* (Devai, Wuelker et Scholl, 1983) (Chironomidae, Diptera) // Fauna Norvegica. 2012. V. 32. P. 151–157.
<https://doi.org/10.5324/fn.v31i0.1381>
34. Гундерина Л.И. Конструирование молекулярных маркеров для идентификации видов рода *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 7. С. 849–858.
<https://doi.org/10.7868/S0044513413070064>

Nucleotide Sequence Variation within the ITS1–5.8S rRNA–ITS2a–2S rRNA–ITS2 Region of rRNA Gene Cluster in Species of the Family Chironomidae (Diptera)

L. I. Gunderina^{a,*} and A. V. Katokhin^a

^aThe Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russian

*e-mail: gund@bionet.nsc.ru

The region ITS1–5.8S rRNA–ITS2a–2S rRNA–ITS2 separates 18S and 28S rRNA in the rRNA gene loci in species of the family Chironomidae. The nucleotide variation of sequences coding for 5.8S rRNA and 2S rRNA genes and internal transcribed spacers ITS1, ITS2a and ITS2 in species of the family Chironomidae was studied to evaluate the efficiency of these sequences as a molecular markers for species of the family Chironomidae identification and phylogeny reconstruction. In species of the family Chironomidae the AT content of 5.8S rRNA and 2S rRNA genes nucleotide sequences was equal to GC content, on the contrary, sequences of ITS1, ITS2a and ITS2 were AT biased. Sizes of 5.8S rRNA and 2S rRNA gene sequences were low polymorphic and conserved in species of the family Chironomidae. The size of ITS1–5.8S rRNA–ITS2a–2S rRNA–ITS2 region varied among species of the family Chironomidae due to ITS1, ITS2 and ITS2a length variation. 2S rDNA sequences were identical among 27 species of 5 genera of the family Chironomidae. Nucleotide substitutions in sites 473 and 474 discriminate 5.8S rRNA gene sequences of *C. piger*, *C. riparius* (473C>T) and *C. annularius* (474A>G) from these sequences in other species of the genus *Chironomus*. Interspecies variation in nucleotide sequences of ITS1, ITS2a, ITS2 and the whole ITS1–5.8S rRNA–ITS2a–2S rRNA–ITS2 region increase in line with the growth of taxonomic status of the family Chironomidae species groups. So these sequences could be a molecular markers for species discrimination and reconstruction of the family Chironomidae phylogeny.

Keywords: Chironomidae, *Chironomus*, 2S rRNA, 5.8S rRNA, ITS1, ITS2a, ITS2, nucleotide variation.