

DOI: 10.24143/2073-5529-2018-4-139-148
УДК 502.74 +631.523

*Л. И. Шаранова, А. А. Волков, Н. С. Мюге, Г. М. Шалгимбаева,
Л. А. Ковалёва, Т. Т. Трошина, Ж. О. Мажобаева, Д. В. Пилин*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ – ИНДИКАТОРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ – В ВОДОЕМАХ КАЗАХСТАНА

Для уточнения таксономического статуса проведено ДНК-баркодирование водных беспозвоночных Казахстана – индикаторов загрязнения воды органикой. Проанализировано 33 вида гидробионтов водоемов Балхаш-Алакольского бассейна и р. Жайык; 21 вид на 95–100 % соотносится с ранее опубликованными последовательностями беспозвоночных с известной классификацией в базах данных GenBank и BOLD. Выявлено расхождение видовой таксономии по морфометрическим и генетическим параметрам ряда видов. Такое несоответствие может быть обусловлено морфологической идентичностью на личиночной стадии хирономид. Указаны филогенетические деревья исследованных видов внутри семейств Chironomidae и Moinidae. Хирономиды представлены десятью кладами различных видов генетического полиморфизма гена CO1 ДНК. Генетические связи Moinidae показывают 4 группы моин по 2 основным кладам, включая и криптический вид моины из оз. Алаколь. Отмечается, что в распространении криптических таксонов в роде Moina важными являются факторы солености и глубины озера, а также различия в глубинах. Молекулярное ДНК-баркодирование беспозвоночных гидробионтов Казахстана требует продолжения, с охватом большего количества видов и в нескольких повторностях, с необходимостью качественной первичной фиксации объектов исследований и достаточным количеством образцов. Достоверность определения состава, обилия видов, видовых характеристик водных беспозвоночных водоемов аридных малоизученных регионов необходима при использовании их в качестве индикаторов экологического статуса водоемов.

Ключевые слова: ген цитохром-оксидаза (CO1), амплификация, секвенирование, беспозвоночные, планктон, зообентос, хирономиды, биоиндикация.

Введение

Усиление антропогенного прессинга на водные экосистемы обуславливает необходимость улучшения качества мониторинга процессов в водоемах. Одним из общепринятых методов наблюдения, выявляющих реакцию водных систем на воздействие внешних факторов, является биоиндикация, основанная на идентификации видового разнообразия сообществ. Сообщества беспозвоночных гидробионтов, вследствие высокого разнообразия и особенностей развития, достаточно эффективно используются в качестве объектов биоиндикации [1].

Более ста лет применяется метод оценки загрязнения водоема органическими веществами на основе сапробных характеристик видов индикаторов, разработанных преимущественно для европейских водоемов [2]. Однако при интерпретации полученных данных установлено, что в таких списках отсутствует значительная часть видов водоемов аридной зоны Казахстана, что препятствует оценке их экологического состояния [3]. Происходит это из-за недостаточно точной идентификации видов по морфологическим параметрам. Особенно это касается групп донных беспозвоночных, в том числе гетеротопных насекомых, представителей семейства Chironomidae (Diptera), ввиду метаморфоза стадий развития. Хирономиды являются отличными биологическими индикаторами здоровья водных экосистем, но внутривидовая их изменчивость, наряду с морфологическим сходством личиночных стадий разных видов, затрудняет определение организмов до видового ранга. Общепризнано, что для достоверного определения вида хирономид необходимо изучение всех стадий развития, что недоступно при обычной работе исследователя. Следствием является не в полной мере изученный видовой состав и использование устаревшей систематики [4, 5].

Часть высказанных замечаний относится и к таксономии планктонных беспозвоночных, особенно в водоемах аридных малоизученных регионов. Вместе с тем достоверность определения состава, обилия видов, видовых характеристик водных беспозвоночных необходима при использовании их как индикаторов экологического статуса водоемов.

Для улучшения идентификации видов с трудной таксономией или их жизненных стадий в настоящее время применяют молекулярно-генетические методы. Широкое распространение получило использование последовательности участка гена CO1 митохондриальной ДНК (ДНК-штрих-кодирование, или ДНК-баркодинг) [6]. Использование фрагмента гена CO1 для идентификации видов животных быстро преодолело этап новизны и перешло к широкому распространению [7, 8]. По сравнению с доминировавшими ранее методами анализа белкового полиморфизма ДНК-баркодинг обеспечивает получение гораздо более полной картины генетической изменчивости. Во многих случаях переменные генетические маркеры позволяют обнаружить межвидовые или межпопуляционные генетические различия, не распознаваемые методами электрофореза белков [9, 10].

Цель исследований: провести генетическую идентификацию беспозвоночных планктона и бентоса – биоиндикаторов концентрации органических веществ в водоемах Казахстана.

В Казахстане работы по генотипированию беспозвоночных гидробионтов ранее не проводились. Генетическая идентификация беспозвоночных позволит уточнить видовой состав биоиндикаторов, исключить невалидные названия, особенно у доминирующей в экосистемах группы хирономид. Комплексные морфологические и генетические работы могут стать основой региональной базы данных биоразнообразия беспозвоночных гидробионтов, необходимой для достоверной оценки экологического состояния водоемов Казахстана.

Материал и методики исследования

Разнообразие планкто- и бентофауны исследовалось при мониторинге рыбохозяйственных водоемов Балхаш-Алакольского бассейна – Алакольской системы озер, водохранилища Капшагай в среднем течении р. Иле на юго-востоке и р. Жайык (р. Урал) на западе Республики Казахстан.

Для сопоставления результатов идентификации морфологического и молекулярно-генетического анализов беспозвоночных озер, водохранилищ и реки были проведены описанные ниже исследования.

Отбор проб беспозвоночных на водоемах велся в мае и июне–августе 2015–2017 гг. стандартными орудиями лова: планктонными сетями Апштейна и Джеди, дночерпателем Петерсена и нектобентосным тралом [1, 11–13]. Материал фиксировался 40%-м формалином и параллельно, для ДНК-баркодинга, 96%-м этанолом. Выбранные из проб планктона и бентоса виды беспозвоночных идентифицировались морфологически [14–18]. Гидробионты, фиксированные спиртом, обрабатывались с применением методики ДНК-баркодинга [6].

Секвенирование проводилось с праймеров в обоих направлениях на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130. Для выделения и последующей очистки ДНК беспозвоночных использовали метод абсорбции на колонках (PALL) с контролем качества выделения на спектрофотометре SPECTRAmax PLUS 384 [19].

Аmplификацию и последующее секвенирование вели с использованием универсальных праймеров на CO1 митохондриальной (мт) ДНК [20]:

– L 1490 – GGTCCAACAAATCATAAAGATATTGG;

– H-2198TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР-реакция) проведена в объеме 15 мкл (70 мМ Трис-НСI (рН 8.3)), 37,5 мМ (NH₄)₂SO₄, 3 мМ MgCl₂, по 100 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, по 1,5 мкМ каждого из праймеров, 1 ед. ColorTaq-полимеразы.

Аmplификация: предварительная денатурация ДНК: 95 °С – 10 мин, синтез ПЦР-продуктов (30 циклов), плавление – 94 °С – 20 с, отжиг праймеров – 48 °С – 40 с, синтез ДНК – 72 °С – 60 с, окончательная достройка цепей – 72 °С – 10 мин. Результат амплификации проверялся методом электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

Секвенирование гена CO1 митохондриальной ДНК проводилось с тех же праймеров в обоих направлениях на ABI PRISM 3100, с набором Big Dye v3.1, с последующим анализом и выравниванием последовательностей с помощью биоинформационного пакета программ Laser Gene 6.0 [21].

Для анализа были выбраны личинки Chironomidae и различные представители Crustacea – ракообразных. Ввиду расширения регионального списка видов-индикаторов сапробности водоемов учитывались как часто встречающиеся, так и редкие виды ценозов [22].

В ходе исследований 2015–2017 гг. на предмет уточнения таксономического статуса водных беспозвоночных методами ДНК-баркодинга проанализировано 33 вида.

Результаты исследования и их обсуждение

Алакольская система озер и водохранилище Капшагай находятся в аридной зоне Алакольской и Илейской межгорных котловин на юго-востоке Казахстана. Природно-климатические условия региона характерны для пустынной зоны [23]. Регион, исследуемый по р. Жайык, относится к зонам сухих и опустыненных степей.

В озерной системе из трех озер наиболее крупное – оз. Алаколь ($S = 2\,650\text{ км}^2$, соленость $3\,317\text{--}9\,919\text{ мг/дм}^3$). Озера Сасыкколь ($S = 736\text{ км}^2$) и Кошкарколь ($S = 120\text{ км}^2$) – пресноводные, с минерализацией от 460 до 960 мг/дм³. Водоохранилище Капшагай ($V = 10,6\text{--}26,1\text{ км}^3$ в 2015–2016 гг.) – пресноводный водоем ($303\text{--}517\text{ мг/дм}^3$).

Результаты идентификации беспозвоночных гидробионтов морфометрически и путем секвенирования гена COI митохондриальной ДНК в указанных водоемах сведены в таблице.

Идентификация видового состава беспозвоночных в водоемах Балхаш-Алакольского бассейна и реки Жайык, с привлечением генетического анализа – ДНК-баркодинга, и соответствие полученных последовательностей базам данных GenBank и BOLD, 2015–2017 гг.

№ п/п	Морфологическое определение видов	Последовательность с наибольшей гомологией из баз данных GenBank и BOLD	Процент идентичности	№ сиквенса в GenBank и BOLD
2015 г.				
<i>Зообентос. Водоохранилище Капшагай</i>				
1	<i>Procladius ferrugineus</i> Kieffer	<i>Procladius ferrugineus</i> voucher HP4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	658/658 (99 %)	KC250835.1
2	<i>Chironomus gr. plumosus</i> Linne	<i>Chironomus muratensis</i> voucher HP9 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	598 /658 (99 %)	KC250747.1
3	<i>Cryptochironomus viridulus</i> Fabricius	<i>Cladopelma virescens</i> voucher HO6 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	630/658 (99 %)	KC250758.1
<i>Зоопланктон. Водоохранилище Капшагай</i>				
4	<i>Daphnia galeata</i> Sars	<i>Daphnia galeata</i> isolate G17/4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	631/637 (99 %)	GQ457332.1
<i>Зообентос. Алакольская система озер</i>				
5	<i>Paratanytarsus lauterborni</i> Kieffer	<i>Paratanytarsus grimmii</i> voucher B10UG02981-A03 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene	605/605 (100 %)	KJ167465.1
2016 г.				
<i>Зообентос. Водоохранилище Капшагай</i>				
6	<i>Procladius ferrugineus</i> Kieffer	<i>Procladius ferrugineus</i> voucher HQ3 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	529/530 (99 %)	KC250836.1
7	<i>Pontogammarus robustoides</i> (Sars)	<i>Pontogammarus robustoides</i> cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	531/544 (98%)	AY189508.1
<i>Зообентос. Алакольская система озер</i>				
8	<i>Procladius ferrugineus</i> Kieffer	<i>Procladius ferrugineus</i> cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	601/664 (99 %)	KC250835.1
9	<i>Cricotopus gr. silvestris</i> Fabricius	<i>Cricotopus silvestris</i> cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	650/654 (99 %)	KC250795.1
10	<i>Ischnura pumilio</i> (Charpentier)	<i>Ischnura elegans</i> cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	619/656 (95 %)	KF369415.1
11	<i>Procladius ferrugineus</i> Kieffer	<i>Procladius sp.</i> subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	565/594 (95 %)	KJ208934.1
<i>Зообентос. Река Жайык</i>				
12	<i>Chironomidae</i> (вид не определен)	<i>Lipiniella fujiprimus</i> voucher gg376 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds;	609/612 (99 %)	JF412078.1
13	<i>Mysidae</i> (вид не определен)	<i>Paramysis lacustris</i> cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds	601/606 (99 %)	DQ779836.1
<i>Зоопланктон. Алакольская система озер</i>				
14	<i>Daphnia (D.) galeata</i> Sars	<i>Daphnia galeata</i> cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	646/655 (99 %)	EF375867.1
15	<i>Moina brachiata</i> (Jurine)	<i>Moina brachiata</i> cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	589/620 (98 %)	JN641836.1
2017 г.				
<i>Зообентос. Водоохранилище Капшагай</i>				
16	<i>Chironomus gr. plumosus</i> Linne	<i>Chironomus plumosus</i> voucher HS9 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	660/658 (98 %)	KC250751.1
17	<i>Palaemon modestus</i> (Heller)	<i>Macrobrachium nipponense</i> voucher GU_II38 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	642/659 (100 %)	KF547935.1

Окончание табл.

№ п/п	Морфологическое определение видов	Последовательность с наибольшей гомологией из баз данных GenBank и BOLD	Процент идентичности	№ сиквенса в GenBank и BOLD
<i>Зообентос. Алакольская система озер</i>				
18	<i>Chironomus gr. plumosus</i>	<i>Chironomus balatonicus</i> isolate SarUz cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	658/596 (100 %)	JN016826.1
<i>Зоопланктон. Водохранилище Капшагай</i>				
19	<i>Thermocyclops crassus</i> (Fisch.)	<i>Thermocyclops cf. taihokuensis</i> WM-2017a mitochondrial COI gene for cytochrome c oxidase subunit I, partial cds, isolate: Thtai_01	633/658 (99 %)	LC215458.1
20	<i>Thermocyclops asiaticus</i> = = <i>Thermocyclops taihokuensis</i> (Kiefer)	<i>Thermocyclops cf. taihokuensis</i> WM-2017a mitochondrial COI gene for cytochrome c oxidase subunit I, partial cds, isolate: Thtai_01	658/658 (99 %)	LC215456.1
21	<i>Neurodiaptomus (N.) incongruens</i> (Poppe)	<i>Neurodiaptomus (N.) incongruens</i>	587 (99,48 %)	Сиквенс в системе BOLD

Молекулярный анализ нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы 1 мт ДНК показал, что 21 казахстанский вид гидробионтов соотносятся (на 98–100 %) с ранее опубликованными последовательностями беспозвоночных в общедоступной базе данных GenBank. Длина митохондриальных сиквенсов составляла 560–658 пар нуклеотидов (п. н.)

Примерно половина указанных видов в таблице подтверждает определения специалистов по морфологическим показателям как имеющие высокое сходство с сиквенсами, депонированными в GenBank.

По определенным родам хирономид (*Cryptochironomus*, *Paratanytarsus*, *Chironomus*) баркодингом приведены уточнения их видового статуса, установленного по морфологии особей. Например, личинка комара-звонца, определенная в различных исследованных водоемах как *C. plumosus*, выявила генетическое сходство с последовательностями *C. muratensis* в вдхр. Капшагай, *C. balatonicus* в Алакольской системе озер и с последовательностями *C. plumosus* также в вдхр. Капшагай. Расхождение в видовом определении, возможно, обусловлено морфологическим сходством на личиночной стадии и трудностями морфологического определения. Такое явление очень часто встречается и связано с недостаточной изученностью морфологии региональных видов.

Такие виды репродуктивно изолированы и хорошо отличаются по структуре геномов. Морфологическое сходство в большей степени проявляется у близких видов, обитающих раздельно (в аллопатрических популяциях), и уменьшается, если виды обитают в совместных популяциях (в симпатрии) [24]. Считается, что усиление морфологических различий между близкими видами из совместных поселений повышает их презиготическую репродуктивную изоляцию и препятствует межвидовой гибридизации, также играет важную роль в процессе видообразования.

Образцы организмов зообентоса из групп Chironomidae и Mysidae р. Жайык не были определены до вида, но по нуклеотидным последовательностям митохондриального гена CO1 из GenBank, с 99 % гомологией, идентифицированы на видовом уровне.

По четырем видам ПЦР амплификация не прошла, вероятно, имела место неправильная фиксация первичного материала. В качестве известных причин такого явления исследователи называют также длительную экспозицию воздействия дневного света и температуры, после которых ДНК не может быть успешно выделена для CO1-анализа [25]. Кроме того, имеются комплексы видов, таксономический статус которых не может быть установлен морфологическими методами. К ним относятся, в частности, виды родов *Paratanytarsus* и *Psectrocladius*.

На рис. 1 и 2 приведены кладограммы, построенные Н. С. Мюге, по последовательностям гена CO1 исследованных видов для семейств Chironomidae и Moinidae из водоемов Балхаш-Алакольского бассейна (для последовательностей, полученных из базы данных NCBI GenBank, использованных для сравнения, указаны их идентификаторы (accession #)).

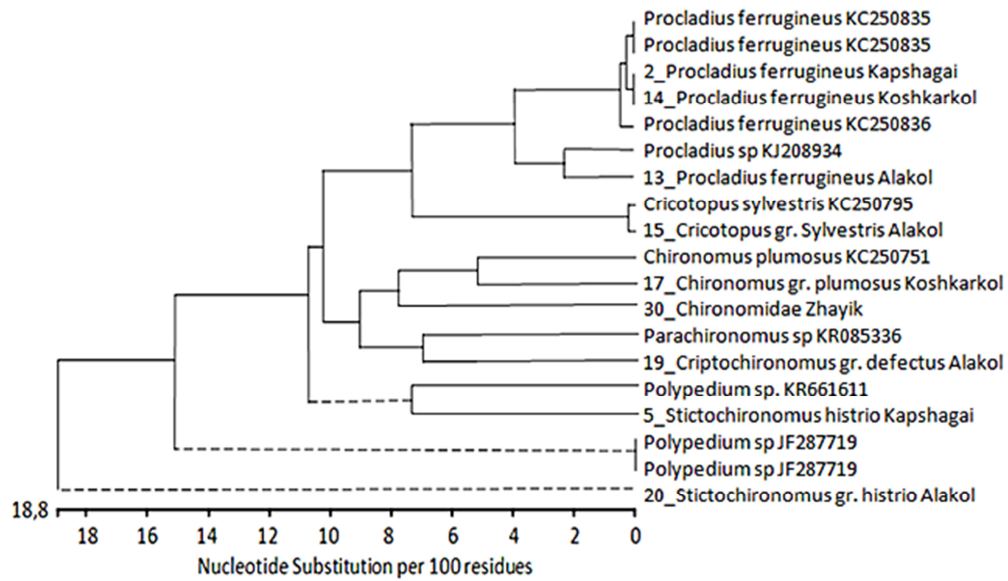


Рис. 1. Кладограмма представителей семейства Chironomidae

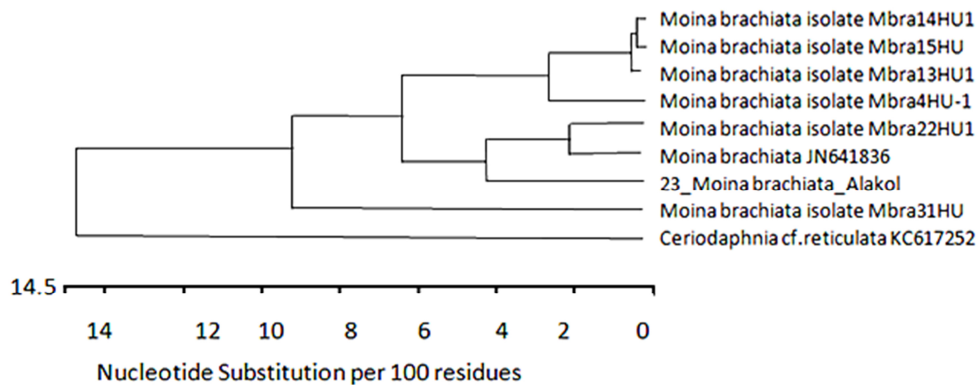


Рис. 2. Кладограмма семейства Moinidae. В качестве аут-группы использована последовательность *Ceriodaphnia cf. reticulata* (acc. # KC617252)

Семейство Chironomidae на рис. 1 представлено десятью кладами различных видов, от очень близких между собой до совсем отдаленных. Это, например, близкая группа *Procladius* из озер Кошкарколь, Алаколь и вдхр. Капшагай и удаленная клада группы *Polypedium*. Связи между видами демонстрируют генетический полиморфизм, связанный с быстрыми темпами мутаций, в данном случае гена CO1 мт ДНК этих видов. Степень внутривидового генетического полиморфизма анализируемых видов позволяет судить об изменениях, претерпеваемых популяцией во времени и пространстве.

Важно отметить, что недавно описана криптическая группа моин (*Moina*), ранее считавшаяся одним видом *Moina brachiata* [26, 27]. Казахстанский вид *Moina brachiata* из оз. Алаколь является тоже отдельным, ранее не описанным видом, наиболее близким к кладе «А» из работы [27], но тем не менее формирующим отдельную кладу на уровне 5 % отличий последовательности гена CO1.

На рис. 2 представлены генетические связи между обнаруженным криптическим видом *Moina* из оз. Алаколь в группе других видов *Moina*. Всего представлено 4 группы моин, которые генетически расходятся на 2 основные клады, включая и казахстанский вид. Генетическая

обособленность последнего, возможно, происходила под влиянием солености и глубины озера. Данные факторы являются важными при образовании и распространении криптических таксонов в роде *Moina* [28]. Общеизвестно, что различия в солености оказывают прямое воздействие на физиологию, которая, в свою очередь, влияет на видовой состав сообществ зоопланктона. Различия в глубинах также могут являться рефугиумами для защиты от визуальных хищников, что тоже может приводить к дифференциации криптических видов моин [29, 30].

Помимо видов, приведенных в таблице, у восьми видов беспозвоночных сходство нуклеотидной последовательности гена CO1 было менее 95 %, хотя все нуклеотидные последовательности гена CO1 мт ДНК представлены в диапазоне 570–660 п. н., что достаточно для корректной генетической идентификации животных. Данный факт может говорить о том, что в базе данных GenBank имеются не эти виды, а другие, разной степени близости к указанным.

Такое положение в баркодинге казахстанских таксонов объясняется разнообразием анализируемых объектов и недостаточной генетической изученностью в многолетнем аспекте.

Заключение

Из результатов данной работы следует, что молекулярное ДНК-баркодирование беспозвоночных гидробионтов Казахстана требует продолжения, с охватом большего количества видов и в нескольких повторностях. Имеет смысл проводить генетический анализ по отдельным таксономическим группам, наиболее многочисленным в водоемах и важным в биоиндикации, таким как хирономиды в бентоценозе и ракообразные – в других сообществах водоемов.

Важно отметить также, что для анализа последовательностей мт ДНК необходима качественная первичная фиксация объектов исследований и достаточное количество образцов. Несоблюдение этого правила может привести к существенным ошибкам при генетическом определении видов. Генетические различия ($> 5\%$) между особями, идентифицированными одними и теми же видами, но обитающими в разных частях водоемов, позволяют предположить существование криптических видов. Соответственно, возникнет и необходимость проведения дополнительной таксономической ревизии внутри этих таксонов.

Многообразие и сложная морфоструктура беспозвоночных гидробионтов Казахстана неизбежно приводит к необходимости исследования точной таксономии видов с применением различных маркеров ядерной и митохондриальной ДНК. Это позволит пополнять библиотеку баркодинговых последовательностей новыми качественными и разнообразными данными. Вероятно, можно говорить о появлении более специализированных баз данных последовательностей ДНК, сгруппированных по таксономическому и экологическому признакам. По мере накопления генетической информации для массовых видов беспозвоночных определенного региона будет открываться перспектива проведения мониторинга различных видов при исследовании структуры природных сообществ. Вместе с тем ДНК-баркодирование не приходит на замену морфологическому методу определения видов беспозвоночных, а лишь является его дополнением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hodkinson I. D., Jackson J. K.* Terrestrial and Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring // *Environmental Management*. Published on line May 17, 2005. Vol. 35. N. 5. P. 5649–5666.
2. *Методы биологического анализа вод // Унифицированные методы исследования качества вод.* М: СЭВ, 1975. Ч. III. 176 с.
3. *Шарапова Л. И., Трошина Т. Т., Ковалева Л. А., Мажубаева Ж. О.* Индикаторная значимость беспозвоночных в разнотипных водоемах Балхаш-Алакольского бассейна Республики Казахстан // *Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем III: материалы докл. Междунар. конф. (Санкт-Петербург, 23–27 октября 2017 г.)*. СПб.: ИНОЗ РАН, 2017. С. 375–378.
4. *Маркиянова М. Ф.* Состав и распространение видов-двойников *Chironomus Meigen*, 1803 (Diptera, Chironomidae) в Куршском заливе Балтийского моря // *Поволж. эколог. журн.* 2015. № 4. С. 400–408.
5. *Полуконова Н. В.* Цитогенетические и молекулярно-генетические методы в реализации комплексного подхода к решению проблем систематики и эволюции комаров-звонцов подсемейства Chironominae // *Бюл. медиц. интернет-конференций*. 2016. Т. 6. № 9. С. 1515–1524.
6. *Hebert P. D. N., Cywinka A., Ball S. L., Dewaard J. R.* Biological identifications through DNA barcodes // *Proceedings of the Royal Society. London. Ser. B.* 2003. V. 270. P. 313–321.

7. *Bucklin A., Guarnieri M., Hill R. S., Bentley A. M., Kaartvedt S.* Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR // *Hydrobiologia*. 1999. V. 401. P. 239–254.
8. *Bucklin A., Wiebe P. H., Smolenack S. B., Copley N. J., Beaudet J. G., Bonner K. G., Farber-Lorda J., Pierson J. J.* DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea) // *J. Plankton Res.* 2007. № 29. P. 483–493.
9. *Avise J. C., Lansman R. A., Shade R. O.* The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations I. Population structure and evolution in the genus *peromyscus* // *Genetics*. 1979. V. 92. P. 279–295.
10. *Smith P., Mc. Veagh M.* Allozyme and microsatellite DNA markers of tooth fish population structure in the Southern Ocean // *J. Fish Biol.* 2000. V. 57. P. 72–83.
11. *Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем.* СПб.: Гидрометеоздат, 1992. 318 с.
12. *Daavis A.* The use and limits of various methods of sampling and interpretation benthic macroinvertebrates // *J. Limnol.* 2001. V. 60 (1). P. 1–6.
13. *Carignan V., Villard M. A.* Selecting indicator species to monitor ecological integrity: a review // *Environmental Monitoring and Assessment*. 2002. V. 78. P. 4–61.
14. *Панкратова В. Я.* Личинки и куколки комаров подсемейства Chironominae фауны СССР (Diptera, Chironomidae). Л.: Наука, 1983. 295 с.
15. *Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий.* Ракообразные. СПб.: ЗИН РАН, 1995. Т. 2. 632 с.
16. *Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России.* Зоопланктон. М.; СПб.: КМК, 2010. Т. 1. 460 с.
17. *Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России.* Зообентос. М.; СПб.: КМК, 2016. Т. 2. 457 с.
18. *Коровчинский Н. М., Котов А. А., Синев А. Ю., Беккер Е. И.* Исследования систематического разнообразия Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) северной Евразии – результаты последних лет // Актуальные проблемы изучения ракообразных континентальных вод: материалы лекций и докл. Междунар. школы-конф. (Борок, 5–9 ноября 2012 г.). Кострома, 2012. С. 55–75.
19. *Ivanova N. V., de Waard J., Hebert P. D. N.* An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // *Molecular Ecology Notes*. 2006. V. 6. P. 998–1002.
20. *Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. N. 3. P. 294–299.
21. *Mueller U. G., Wolfenbarger L. L.* AFLP genotyping and fingerprinting // *Trends Ecol. Evol.* 1999. V. 14. P. 389–394.
22. *Шутиков В. К., Зинченко Т. Д., Головатюк Л. В.* Оценка качества поверхностных вод по индикаторным видам макрозообентоса // *Водные ресурсы*. 2004. Т. 3. № 3. С. 354–364.
23. *Ландшафтное и биологическое разнообразие в Республике Казахстан* // Информационно-аналитический обзор Программы Развития ООН. Алматы: ОО «OST-XXI век», 2005. 242 с.
24. *Dudgeon D., Arthington A. H., Gessner M. O., Kawabata Z. I., Knowler D. J., Lévêque C., Naiman R. J., Prieur-Richard A. H., Soto D., Stiassny M. L. J., Sullivan C. A.* Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges // *Biological Reviews*. 2006. N. 81. P. 163–182.
25. *Brodin Y., Ejdung G., Strandberg J., Lyrholm T.* Improving environmental and biodiversity monitoring in the Baltic Sea using DNA barcoding of Chironomidae (Diptera) // *Molecular Ecology Resources*. 2013. N. 13. P. 996–1004.
26. *Nédli J., de Meester L., Major Á., Schwenk K., Szivák I., Forró L.* Salinity and depth as structuring factors of cryptic divergence in *Moina brachiata* (Crustacea: Cladocera) // *Fundam. Appl. Limnol.* January 2014. V. 184/1. Article Stuttgart. P. 69–85.
27. *Bekker E. I., Dmitry P., Karabanov Y., Galimov R., Kotov A. A.* DNA Barcoding Reveals High Cryptic Diversity in the North Eurasian *Moina* Species (Crustacea: Cladocera) // *PLOS ONE*. 2016. August 24. DOI: 10.1371/j.0161737.
28. *Farêt S., Kassahn K., Grasso L., Hayward D., Iguchi A., Ball E., Miller D.* Genomic and microarray approaches to coral reef conservation biology // *Coral Reefs*. 2007. N. 26 (3). P. 475–486.
29. *Boronat L., Miracle M. R., Armengol X.* Cladoceran assemblages in a mineralization gradient // *Hydrobiologia*. 2001. V. 442. P. 75–88.
30. *Clement M., Posada D., Crandall K. A.* TCS: a computer program to estimate gene genealogies // *Molecular Ecology*. 2000. N. 9. P. 1657–1660.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Шарапова Людмила Ивановна – Республика Казахстан, 050016, Алматы; Казахский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства; канд. биол. наук, старший научный сотрудник; зав. лабораторией гидробиологии и гидроаналитики; kazniirh_gidro@mail.ru.

Волков Александр Анатольевич – Россия, 107140, Москва; Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики; alexavolkov@gmail.com.

Мюге Николай Сергеевич – Россия, 107140, Москва; Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии; канд. биол. наук; зав. лабораторией молекулярной генетики; miugue@vniro.ru.

Шалгимбаева Гульмира Мухаметкалиевна – Республика Казахстан, 050016, Алматы; Казахский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства; зав. лабораторией генетики гидробионтов; shalgimbayeva@mail.ru.

Ковалёва Лариса Анатольевна – Республика Казахстан, 050016, Алматы; Казахский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства; научный сотрудник лаборатории гидробиологии и гидроаналитики; kazniirh_gidro@mail.ru.

Трошина Татьяна Тимофеевна – Республика Казахстан, 050016, Алматы; Казахский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства; старший научный сотрудник лаборатории гидробиологии и гидроаналитики; kazniirh_gidro@mail.ru.

Мажобаева Жанара Омирбековна – Республика Казахстан, 050016, Алматы; Казахский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства; научный сотрудник лаборатории гидробиологии и гидроаналитики; kazniirh_gidro@mail.ru.

Пилин Дмитрий Валерьевич – Республика Казахстан, 050016, Алматы; Казахский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства; научный сотрудник лаборатории гидробиологии и гидроаналитики; kazniirh_gidro@mail.ru.



*L. I. Sharapova, A. A. Volkov, N. S. Myugue, G. M. Shalgimbaeva,
L. A. Kovaljova, T. T. Troshina, Zh. O. Mazhibaeva, D. V. Pilin*

GENETIC IDENTIFICATION OF AQUATIC INVERTEBRATES OF KAZAKHSTAN AS INDICATORS OF ORGANIC POLLUTANTS

Abstract. The article deals with carrying out DNA barcoding of aquatic invertebrates of Kazakhstan to identify their taxonomic status as organic pollution indicators. 33 species of the Balkhash-Alakol basin and the Zhayik river were analyzed. 21 species correlate (95-100%) with previously published sequences of invertebrates with well-known classifications in the GenBank and BOLD databases. The taxonomic discrepancy in morphometric and genetic parameters in certain species has been revealed. The discrepancy may be caused by the morphological identity in chironomids at a larval stage. The phylogenetic trees of the investigated species within the families Chironomidae and Moinidae have been indicated. Chironomids are represented by ten clades of different types of genetic polymorphism of DNA gene. Genetic links of Moinidae are detected in four groups including a cryptic species from Lake Alakol. It has been stated that in distribution of cryptic taxons in Moina family factors of salinity and depth of the lake are important, as well as differences in depth. Molecular DNA-barcoding of invertebrates of Kazakhstan should be continued with covering a greater number of species and several replications, with qualified primary fixation of subjects of research and a sufficient number of samples. Authenticity of composition defining, species abundance, species characteristics of aquatic invertebrates from the water bodies of poorly explored arid regions is necessary for using them as indicators of the ecological status of water bodies.

Key words: cytochrome oxidase (CO1) gene, amplification, sequencing, invertebrates, plankton, zoobenthos, chironomids, bioindication.

REFERENCES

1. Hodkinson I. D., Jackson J. K. Terrestrial and Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring. *Environmental Management*. Published on line May 17, 2005, vol. 35, no. 5, pp. 5649-5666.
2. Metody biologicheskogo analiza vod [Methods of water biological analysis]. *Unifitsirovannye metody issledovaniia kachestva vod*. Moscow, SEV, 1975. Part III. 176 p.
3. Sharapova L. I., Troshina T. T., Kovaleva L. A., Mazhibaeva Zh. O. Indikatornaia znachimost' bespozvonochnykh v raznotipnykh vodoemakh Balkhash-Alakol'skogo basseina Respubliki Kazakhstan [Indicator importance of invertebrates in multitype water bodies of the Balkhash-Alakol basin of the Republic of Kazakhstan]. *Bioindikatsiia v monitoringe presnovodnykh ekosistem III: materialy dokladov Mezhdunarodnoi konferentsii (Sankt-Peterburg, 23–27 oktiabria 2017 g.)*. Saint-Petersburg, INOZ RAN, 2017. Pp. 375-378.
4. Markiianova M. F. Sostav i rasprostranenie vidov-dvoinikov Chironomus Meigen, 1803 (Diptera, Chironomidae) v Kurshskom zalive Baltiiskogo moria [Composition and distribution of twin species Chironomus Meigen, 1803 (Diptera, Chironomidae) in the Curonian lagoon of the Baltic Sea]. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal*, 2015, no. 4, pp. 400-408.
5. Polukonova N. V. Tsitogeneticheskie i molekuliarno-geneticheskie metody v realizatsii kompleksnogo podkhoda k resheniiu problem sistematiki i evoliutsii komarov-zvontsov podsemeistva Chironominae [Cytogenetic and molecular-genetic methods in realization of complex approach to the problem of systematization and evolution of midges Chironominae]. *Biulleten' meditsinskikh internet-konferentsii (ISSN 2224-6150)*, 2016, vol. 6, no. 9, pp. 1515-1524.
6. Hebert P. D. N., Cywinka A., Ball S. L., Dewaard J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society, London, Ser. B*, 2003, vol. 270, pp. 313-321.
7. Bucklin A., Guarnieri M., Hill R. S., Bentley A. M., Kaartvedt S. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiologia*, 1999, vol. 401, pp. 239-254.
8. Bucklin A., Wiebe P. H., Smolenack S. B., Copley N. J., Beaudet J. G., Bonner K. G., Farber-Lorda J., Pierson J. J. DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). *J. Plankton Res.*, 2007, no. 29, pp. 483-493.
9. Avise J. C., Lansman R. A., Shade R. O. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations I. Population structure and evolution in the genus peromyscus. *Genetics*, 1979, vol. 92, pp. 279-295.
10. Smith P., Mc. Veagh M. Allozyme and microsatellite DNA markers of tooth fish population structure in the Southern Ocean. *J. Fish Biol.*, 2000, vol. 57, pp. 72-83.
11. *Rukovodstvo po gidrobiologicheskomu monitoringu presnovodnykh ekosistem* [Instructions on hydrobiological monitoring of freshwater ecosystems]. Saint-Petersburg, Gidrometeoizdat, 1992. 318 p.
12. Daevis A. The use and limits of various methods of sampling and interpretation benthic macroinvertebrates. *J. Limnol.*, 2001, vol. 60 (1), pp. 1-6.
13. Carignan V., Villard M. A. Selecting indicator species to monitor ecological integrity: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2002, vol. 78, pp. 4-61.
14. Pankratova V. Ia. *Lichinki i kukolki komarov podsemeistva Chironominae fauny SSSR (Diptera, Chironomidae)* [Larvae and chrysalides of Chironominae subfamily of the USSR fauna (Diptera, Chironomidae)]. Leningrad, Nauka Publ., 1983. 295 p.
15. *Opredelitel' presnovodnykh bespozvonochnykh Rossii i sopredel'nykh territorii. Rakoobraznye* [Detector of fresh water invertebrates of Russia and bilateral areas. Crustacea]. Saint-Petersburg, ZIN RAN, 1995. Vol. 2. 632 p.
16. *Opredelitel' zooplanktona i zoobentosa presnykh vod Evropeiskoi Rossii. Zooplankton* [Detector of freshwater zooplankton and zoobenthos in the European Russia. Zooplankton]. Moscow; Saint-Petersburg, KMK, 2010. Vol. 1. 460 p.
17. *Opredelitel' zooplanktona i zoobentosa presnykh vod Evropeiskoi Rossii. Zoobentos* [Determinant of freshwater zooplankton and zoobenthos in the European Russia. Zoobenthos]. Moscow; Saint-Petersburg, KMK, 2016. Vol. 2. 457 p.
18. Korovchinskii N. M., Kotov A. A., Sinev A. Iu., Bekker E. I. Issledovaniia sistemicheskogo raznoobraziia Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) severnoi Evrazii – rezul'taty poslednikh let [Studies of systematic diversity Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) in North Eurasia]. *Aktual'nye problemy izucheniia rakoobraznykh kontinental'nykh vod: materialy lektsii i dokladov Mezhdunarodnoi shkoly-konferentsii (Borok, 5–9 noiabria 2012 g.)*. Kostroma, 2012. Pp. 55-75.
19. Ivanova N. V., de Waard J., Hebert P. D. N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, 2006, vol. 6, pp. 998-1002.
20. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, no. 3, pp. 294-299.
21. Mueller U. G., Wolfenbarger L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.*, 1999, vol. 14, pp. 389-394.

22. Shitikov V. K., Zinchenko T. D., Golovatiuk L. V. Otsenka kachestva poverkhnostnykh vod po indikatornym vidam makrozoobentosa [Assessment of quality of surface waters according to indicator species of macrozoobenthos]. *Vodnye resursy*, 2004, vol. 3, no. 3, pp. 354-364.
23. Landshaftnoe i biologicheskoe raznoobrazie v Respublike Kazakhstan [Landscape and biological diversity in the Republic of Kazakhstan]. *Informatsionno-analiticheskii obzor Programmy Razvitiia OON*. Almaty, OO «OST-KhKhI vek» Publ., 2005. 242 p.
24. Dudgeon D., Arthington A. H., Gessner M. O., Kawabata Z. I., Knowler D. J., Lévêque C., Naiman R. J., Prieur-Richard A. H., Soto D., Stiassny M. L. J., Sullivan C. A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 2006, no. 81, pp. 163-182.
25. Brodin Y., Ejdung G., Strandberg J., Lyrholm T. Improving environmental and biodiversity monitoring in the Baltic Sea using DNA barcoding of Chironomidae (Diptera). *Molecular Ecology Resources*, 2013, no. 13, pp. 996-1004.
26. Nédli J., de Meester L., Major Á., Schwenk K., Szivák I., Forró L. Salinity and depth as structuring factors of cryptic divergence in *Moina brachiata* (Crustacea: Cladocera). *Fundam. Appl. Limnol.*, January 2014, vol. 184/1, Article Stuttgart, pp. 69-85.
27. Bekker E. I., Dmitry P., Karabanov Y., Galimov R., Kotov A. A. DNA Barcoding Reveals High Cryptic Diversity in the North Eurasian *Moina* Species (Crustacea: Cladocera). *PLOS ONE*, 2016, August 24. DOI: 10.1371/j.0161737.
28. Farêt S., Kassahn K., Grasso L., Hayward D., Iguchi A., Ball E., Miller D. Genomic and microarray approaches to coral reef conservation biology. *Coral Reefs*, 2007, no. 26 (3), pp. 475-486.
29. Boronat L., Miracle M. R., Armengol X. Cladoceran assemblages in a mineralization gradient. *Hydrobiologia*, 2001, vol. 442, pp. 75-88.
30. Clement M., Posada D., Crandall K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 2000, no. 9, pp. 1657-1660.

The article submitted to the editors 22.08.2018

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Sharapova Lyudmila Ivanovna – Republic of Kazakhstan, 050016, Almaty; Kazakh Research Institute of Fishery; Candidate of Biology, Senior Researcher; Head of the Laboratory of Hydrobiology and Hydroanalytics; kazniirh_gidro@mail.ru.

Volkov Alexandr Anatoljevich – Russia, 107140, Moscow; Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography; Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Genetics; alexavolkov@gmail.com.

Myuge Nikolaj Sergeevich – Russia, 107140, Moscow; Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography; Candidate of Biology; Head of the Laboratory of Molecular Genetics; muge@vniro.ru.

Shalgimbaeva Gulmira Mukhametcalievna – Republic of Kazakhstan, 050016, Almaty; Kazakh Research Institute of Fishery; Head of the Laboratory of Genetics of Hydrobionts; shalgimbayeva@mail.ru.

Kovaljova Larisa Anatoljevna – Republic of Kazakhstan, 050016, Almaty; Kazakh Research Institute of Fishery; Researcher of the Laboratory of Hydrobiology and Hydroanalytics; kazniirh_gidro@mail.ru.

Troshina Tatjana Timofeevna – Republic of Kazakhstan, 050016, Almaty; Kazakh Research Institute of Fishery; Senior Researcher of the Laboratory of Hydrobiology and Hydroanalytics; kazniirh_gidro@mail.ru.

Mazhibaeva Zhanara Omirbekovna – Republic of Kazakhstan, 050016, Almaty; Kazakh Research Institute of Fishery; Researcher of the Laboratory of Hydrobiology and Hydroanalytics; kazniirh_gidro@mail.ru.

Pilin Dmitrij Valerjevich – Republic of Kazakhstan, 050016, Almaty; Kazakh Research Institute of Fishery; Researcher of the Laboratory of Hydrobiology and Hydroanalytics; kazniirh_gidro@mail.ru.

