

УДК 575.852;575.857;575.858;593.954.22;593.933.7

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВОЙ ДИВЕРГЕНЦИИ МОРСКИХ ЗВЕЗД И МОРСКИХ ЕЖЕЙ (Echinodermata)\*

© 2016 Н.Б. Петров<sup>1\*\*</sup>, И.П. Владыченская<sup>1</sup>,  
А.Л. Дроздов<sup>2,3</sup>, О.С. Кедрова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
119991 Москва; факс: (495)939-3181,  
электронная почта: petr@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного  
отделения РАН, 690041 Владивосток; факс: (4232)31-0900,  
электронная почта: anatoliyld@mail.ru

<sup>3</sup> Дальневосточный федеральный университет, 690091 Владивосток

<sup>4</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, 119991 Москва

Поступила в редакцию 21.04.16

После доработки 21.06.16

Определены нуклеотидные последовательности фрагментов гена *COI* мтДНК нескольких изолятов морских звезд семейства Asteriidae из Японского (*Aphelasterias japonica* и *Asterias amurensis*) и Белого (*Asterias rubens*) морей, а также нескольких индивидов неправильного морского ежа *Echinocardium cordatum* (семейство Loveniidae) из Японского моря. Для нескольких индивидов трех видов морских звезд семейства Asteriidae Японского и Белого морей определены также последовательности транскрибируемых спейсеров (*ITS1* и *ITS2*) и 5,8S рДНК. Филогенетический анализ этих последовательностей совместно со взятыми из GenBank последовательностями гена *COI* *Ast. forbesii*, *Ast. rubens*, *E. laevigaster* из Северной Атлантики и *E. cordatum* из Желтого и Северного морей показал строгое распределение последовательностей по видовым кластерам. Два исключения – последовательность *Ast. rubens* DQ077915 в кластере последовательностей *Ast. forbesii* и последовательность *Aph. japonica* DQ992560 в кластере *Ast. amurensis* – объяснимы неправильным определением видов. Уровень внутривидового полиморфизма генов *COI* морских звезд семейства Asteriidae, оцениваемый по генетическим расстояниям внутри соответствующих групп, варьирует от 0,2 до 0,9%, уровень межвидового полиморфизма оценивается значениями в диапазоне 10,4–12,1%, а уровень межродового полиморфизма – 21,8–29,8%. У морских ежей семейства Loveniidae внутри рода *Echinocardium* обнаружен значительно больший по сравнению с морскими звездами уровень межвидовой дивергенции последовательностей гена *COI* (17,1–17,7%). Уровень межродовой дивергенции (14,6–25,7%) примерно соответствует таковому у морских звезд. Внутривидовые генетические расстояния по транскрибируемым ядерным маркерам (*ITS1* – 5,8S рДНК – *ITS2*) у морских звезд семейства Asteriidae значительно меньше (3,1–4,5%), а межродовые – существенно больше (32,8–35,0%) по сравнению с таковыми по митохондриальным генам *COI*. Результаты показывают пригодность рассмотренных молекулярно-генетических маркеров для разграничения и идентификации видов иглокожих.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** молекулярная эволюция, популяция, видообразование, Echinodermata, ген субъединицы 1 цитохромоксидазы, внутренние транскрибируемые спейсеры.

Главной целью микроэволюционных исследований на молекулярном уровне является изучение биологического разнообразия, для чего необходимо решить проблему видовой идентификации на иной, отличной от морфологической, основе. Известно, что разные участки гено-

мов эволюционируют с неодинаковой скоростью. На начальных этапах изучения микроэволюции на уровне молекул необходимы выявление, идентификация и структурная характеристика участков генома, подверженных быстрым эволюционным изменениям и поэтому проявляющих высокую степень межвидового и внутривидового полиморфизма. Данные такого рода исследований используются для определения потока генов между географически близкими и удаленными популяциями, а также эволю-

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM16-111, 08.08.2016.

\*\* Адресат для корреспонденции.

ционных изменений в географических изолятах и находят широкое применение для изучения биологического разнообразия с помощью ДНК-штрихкодирования [1]. Разрабатываемые при этом подходы можно использовать для видовой и популяционной идентификации разных видов организмов, в т.ч. хозяйственно важных, имеющих промысловое или индикаторное значение.

Изучение биологического разнообразия и молекулярных механизмов видообразования предполагает необходимость использования для этих целей разных участков ядерных геномов, обеспечивающих возможность сравнения популяций и видов с разной степенью генетической изоляции. Такими участками могут быть некодирующие повторяющиеся последовательности ядерных геномов, в частности сателлитные ДНК гетерохроматина [2]. В настоящее время для идентификации и разграничения видов в качестве генетических маркеров широкое применение находят нуклеотидные последовательности, кодирующие внутренние транскрибируемые спейсеры ядерных генов рРНК (*ITS1* и *ITS2*), а также последовательности 5'-участка митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы (*COI*) длиной ~650 нуклеотидов. Последний уже стал стандартным геном для ДНК-штрихкодирования видов из разнообразных групп животных [1], в т.ч. иглокожих [3–5] и моллюсков [6–10]. Ценность последовательностей спейсеров *ITS1* и *ITS2* для идентификации видов еще не вполне ясна, тем не менее ядерные *ITS* растений наряду с пластидными участками *rpL32-trnL* и *trnL-trnF* были успешно использованы для ревизии широко распространенной группы луков *Allium saxatile* [11].

Цель настоящей работы заключалась в изучении внутривидового и межвидового полиморфизма видов иглокожих Японского и Белого морей на основе сравнения быстро эволюционирующих участков ядерных и митохондриальных геномов. Препараты тотальной ДНК были выделены из образцов тканей разных видов, фиксированных 96%-ным этанолом, и проведена амплификация участков генов *COI* мтДНК и *ITS* ядерных генов рРНК. После определения нуклеотидных последовательностей этих участков было выполнено их кластирование путем построения филогенетических деревьев и проведен анализ полиморфизма кластеров разного таксономического уровня.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения ДНК было собрано по несколько индивидов морских ежей *Echinocardium cordatum*, морских звезд *Asterias amurensis* и *Aphelasterias*

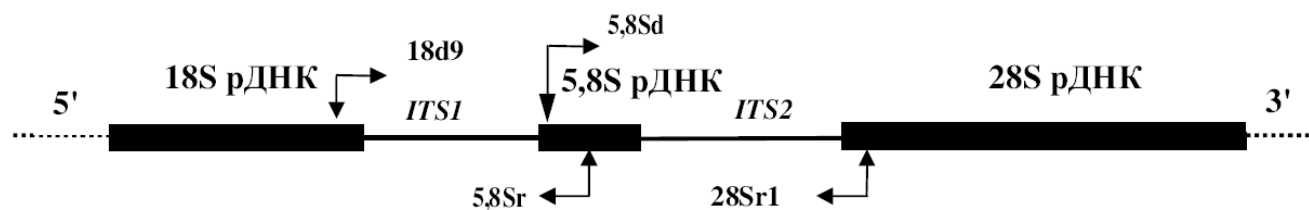
*japonica* из разных районов залива Петра Великого Японского моря, а также несколько индивидов морской звезды *Asterias rubens* в Кандалакшском заливе Белого моря, в окрестностях Беломорской биологической станции МГУ. Тотальную ДНК выделяли с помощью набора для выделения ДНК NucleoSpin® Tissue («Macherey-Nagel», Германия) согласно протоколу изготовителя из амбулакральных ножек или, в отдельных случаях, из гонад, фиксированных в 96%-ном этаноле.

Амплификацию фрагментов гена *COI* мтДНК проводили с использованием праймеров, модифицированных специально для морских ежей и звезд на основе универсальных для многоклеточных животных праймеров [12], а также гибридных, специфических для иглокожих праймеров [13] с учетом новых данных по последовательностям гена иглокожих. Для амплификации последовательностей ядерных генов *ITS1*, *ITS2* и 5,8S рДНК были разработаны и апробированы праймеры к участкам последовательности генов, кодирующих 18S, 5,8S и 28S рРНК. Расположение этих праймеров на участках соответствующих генов и схема амплификации генов *ITS1*, *ITS2* и 5,8S рДНК показаны на рис. 1. Последовательности всех разработанных и использованных в работе праймеров приведены в табл. 1.

Амплификацию фрагментов генов *COI* мтДНК проводили посредством ПЦР, используя набор Eucylo Plus PCR (ЗАО «Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Условия амплификации: начальная денатурация (94° – 2 мин); 30 циклов инкубации (94° – 30 с, 45° – 30 с, 72° – 1 мин); достраивание цепи (72° – 10 мин). Условия амплификации ядерных спейсеров были аналогичными, но отжиг проводили при 55° в течение 30 с.

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в агарозном геле, нужную полосу вырезали из геля и после очистки с помощью набора для экстракции ДНК из агарозного геля («Цитокин», Россия) использовали непосредственно для определения нуклеотидных последовательностей по двум цепям на автоматическом секвенаторе в ЦКП «Геном» (ИМБ РАН). Полученные последовательности депонированы в GenBank под номерами KX592544–KX592561 для генов *COI* и KX592562–KX592568 для генов *ITS1*, *ITS2* и 5,8S рДНК.

Филогенетический анализ последовательностей, включавший в себя построение филогенетических деревьев и распределение последовательностей по группам, а также определение внутригруппового и межгруппового полиморфизма, проводили с использованием пакета мо-



**Рис. 1.** Схема амплификации последовательностей участка внутренних транскрибируемых спейсеров и гена, кодирующего 5,8S рДНК (*ITS1* – 5,8S рДНК – *ITS2*). Места посадки праймеров и направление амплификации показаны стрелками

лекулярно-генетических программ MEGA6 [14]. Модель эволюции для анализируемых наборов последовательностей выбирали с помощью соответствующей программы из пакета MEGA, филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия на основе общей модели обратимой эволюции [15]. Начальное дерево для эвристического поиска получали методами NJ и BioNJ по матрице расстояний, вычисленных методом MCL [15], с последующим отбором лучшей топологии. Внутригрупповые и межгрупповые расстояния определяли на основе двухпараметрической модели Кимуры [16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Анализ распределения последовательностей генов *COI* и *ITS* по группам.** Полученные последовательности гена *COI* были выравнены относительно гомологичных последовательностей других видов североатлантических и тихоокеанских видов морских звезд, взятых из GenBank, и проведен их филогенетический анализ. Набор для анализа включал последовательности гена *COI* трех наиболее распространенных видов рода *Asterias* (семейство Asteriidae) – *Ast. forbesii*, *Ast. rubens* из западноатлантических и восточноат-

**Таблица 1.** Праймеры, использованные при амплификации последовательностей генов *COI* и области внутренних транскрибируемых спейсеров (*ITS1* – 5,8S рДНК – *ITS2*)

Название праймера	Последовательность праймера
Праймеры к гену <i>COI</i> для морских ежей	
COIEcF1	5'-TTTCTACTAACCACAAGGACATCGG-3'
COIEcR1	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'
Специфические, универсальные для иглокожих праймеры к гену <i>COI</i>	
COIurF1	5'-ACTGCCACGCCCTAGTAATGATATTTTTTATGGTRATGCC-3'
COIurR2	5'-TCGTGTGTCTACGTCCATTCTACTGTRAACATRTG-3'
Праймеры к гену <i>COI</i> , модифицированные для морских звезд семейства Asteriidae	
AsCOIF1	5'-TTTCTACTAAACATAAGGACATTGG-3'
AsCOIR1	5'-CTTCAGGGTGTCCAAAAAATCA-3'
AsCOIR2	5'-ATAATCATAGTAGCGGCAGTAAAG-3'
Праймеры к генам, кодирующим 18S, 5,8S и 28S рДНК	
18d9	5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3'
5,8Sd	5'-TCGATGAAGAACGCTGCCAGC-3'
5,8Sr	5'-GCCAAGAGCGTTCGAAATGTCGA-3'
28Sr1	5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGGT-3'

лантических популяций, нескольких популяций тихоокеанской *Ast. amurensis*, а также пять последовательностей *Aphelasterias japonica* и по одной последовательности *Distolasterias nipon* и *Forcipulatida* sp. в качестве внешней группы.

С целью выявления монофилетических групп последовательностей и выяснения эволюционных отношений между видами рода *Asterias* по данному набору было построено филогенетическое дерево последовательностей гена *COI* (рис. 2). На полученном дереве последовательности всех трех видов образовали монофилетические группы с высокой статистической поддержкой (99%). В свою очередь кластеры *Ast. rubens* и *Ast. amurensis* объединились в группу, поддержанную 76% бутстрэпа, в то время как кластер *Ast. forbesii* оказался равноудаленным от двух первых. В целом группа последовательностей всех трех видов *Asterias* поддержана 98% бутстрэпа. Кластеры последовательностей *Ast. rubens* и *Ast. forbesii* более гомогенны, чем кластер *Ast. amurensis*, в котором выделяются две подгруппы со статистической поддержкой 90 и 86%. Обращает на себя внимание, что на этом дереве тихоокеанский вид *Ast. amurensis* и североатлантический вид *Ast. rubens* более близки друг другу, чем два североатлантических вида *Ast. rubens* и *Ast. forbesii*. В целом на дереве можно выделить семь монофилетических групп. Полученные нами последовательности гена *COI* беломорских *Ast. rubens* вошли в гомогенную группу североатлантических популяций этого вида.

Вместе с тем на дереве следует отметить два артефакта: одна из последовательностей *Aph. japonica* (DQ992560) включилась в группировку, образованную последовательностями *Ast. amurensis*, а последовательность, помещенная в GenBank под номером DQ077915 как принадлежащая *Ast. rubens*, попала в кластер, образованный последовательностями *Ast. forbesii*. Возможные объяснения данных артефактов приведены в разделе «Обсуждение результатов».

Специфические для морских ежей праймеры были использованы для амплификации последовательностей гена *COI* шести индивидов сердцевидного морского ежа *Echinocardium cordatum* из разных районов Японского моря (залив Восток, Уссурийский залив, бухта Патрокл, бухта Троица). Филогенетическое дерево полученных последовательностей совместно со взятыми из GenBank последовательностями гена *COI* этого же вида, а также несколькими последовательностями других видов семейства Loveniidae показано на рис. 3. Все последовательности гена *COI* *E. cordatum* из Японского моря вместе с последовательностью этого же вида с Корейского побережья Желтого моря (SY121347) образовали

единый кластер с высоким уровнем поддержки (Gp6). Последовательность этого вида из Северного моря (FN562581) отстоит от этой группы на заметное расстояние (Gp5). Другой вид этого рода с Атлантического побережья Англии, *E. laevigaster* (AJ639913), отстоит от первых двух групп значительно дальше (Gp4), образуя с ними группу при невысоком уровне поддержки. Следующие группы (Gp3 и Gp2) образуют последовательности двух других родов этого же семейства с уровнем поддержки 80 и 92% соответственно. В корне дерева находится последовательность морского ежа из другого семейства спатангоидных ежей. Приведенные выше результаты показывают, что нуклеотидные последовательности гена *COI* мтДНК на филогенетических деревьях образуют видовые или даже (как в случае гена *COI* *Ast. amurensis*) популяционные кластеры.

Для трех индивидов каждого из видов *Ast. amurensis* (1, 2 и 3) и *Ast. rubens* (BBS1, BBS2 и BBS3), а также одного изолята *Aph. japonica* были амплифицированы и определены последовательности ядерных спейсеров *ITS1*, *ITS2* и 5,8S рДНК суммарной длиной 1365–1466 нуклеотидов. К этим последовательностям после выравнивания была добавлена одна гомологичная последовательность изолята CAF2 *Ast. forbesii* и проведен их филогенетический анализ. Как и в анализе последовательностей гена *COI*, последовательности *ITS1*, *ITS2* и 5,8S рДНК каждого из видов *Ast. rubens* и *Ast. amurensis* образовали монофилетические группы с высоким уровнем бутстрэп-поддержки (99 и 98%). Последовательность *Ast. forbesii* при невысоком уровне поддержки (48%) примкнула к кластеру *Ast. rubens* (рис. 4).

Аналогичный анализ набора из 16 последовательностей только *ITS1* показал (рис. 5), что последовательности беломорских *Ast. rubens* (BBS1, BBS2 и BBS3) входят в гомогенную группу североатлантических популяций этого вида при 100%-ной поддержке. *ITS1* *Ast. amurensis* также образуют кластер с высоким уровнем поддержки (99%), сестринский кластеру *Ast. rubens*, *ITS1* двух изолятов *Ast. forbesii* образуют группу со 100%-ной поддержкой в основании дерева.

**Анализ внутри- и межгруппового полиморфизма.** Для оценки степени внутри- и межгруппового полиморфизма последовательности изученных в данной работе видов распределяли по группам в соответствии с результатами филогенетической реконструкции и определяли генетические расстояния внутри и между группами. Оценка полиморфизма гена *COI* морских звезд семейства Asteriidae показывает, что уровень внутригруппового полиморфизма, оцениваемый по генетическим расстояниям внутри соответствующих

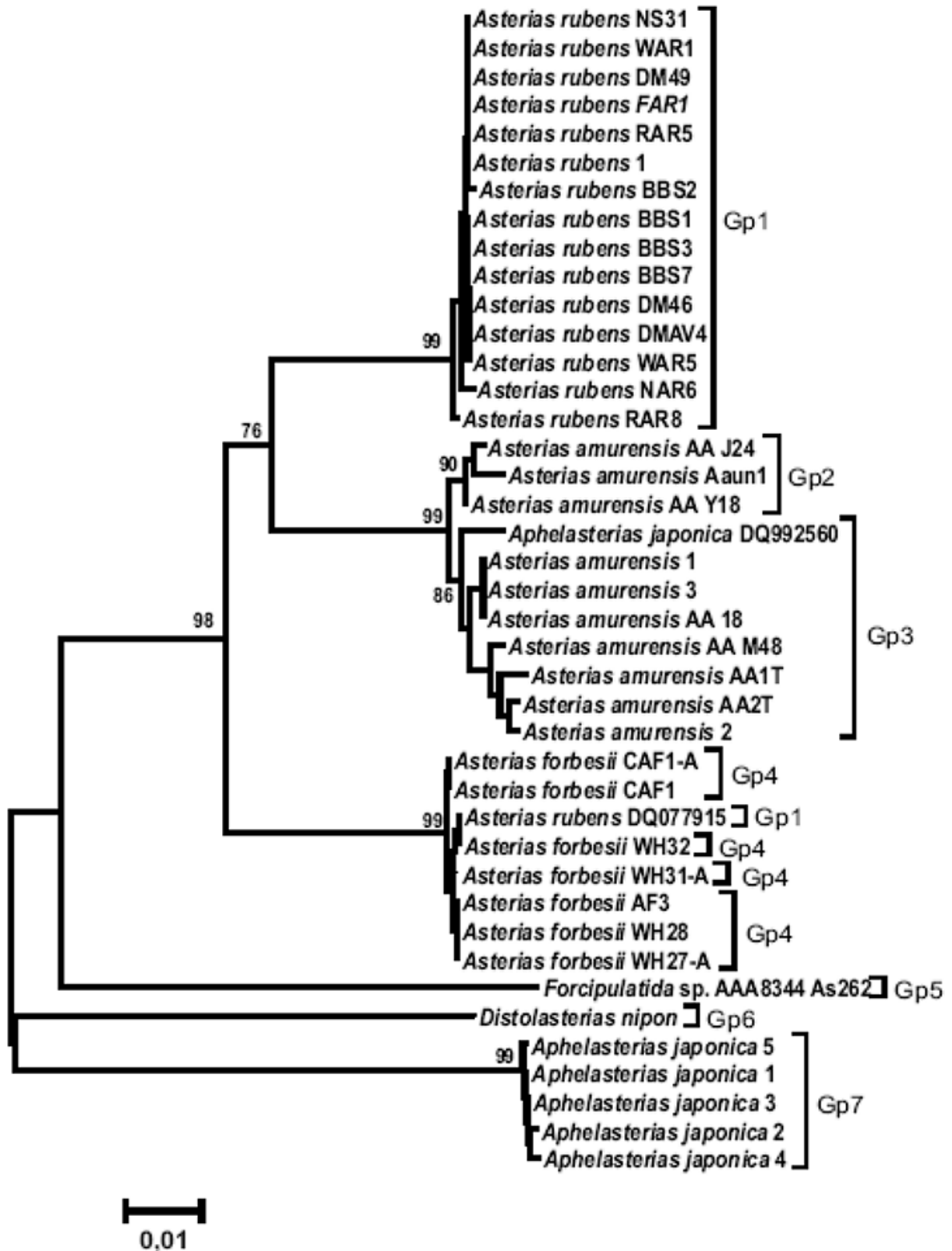
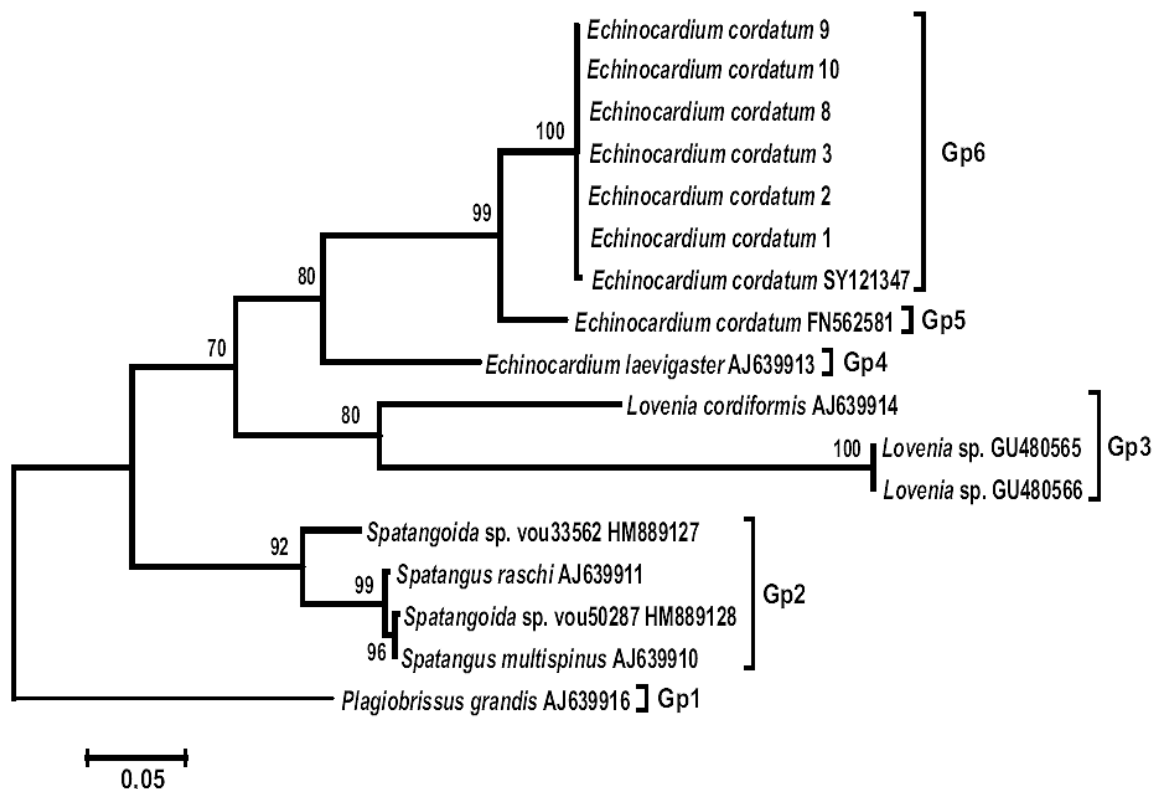
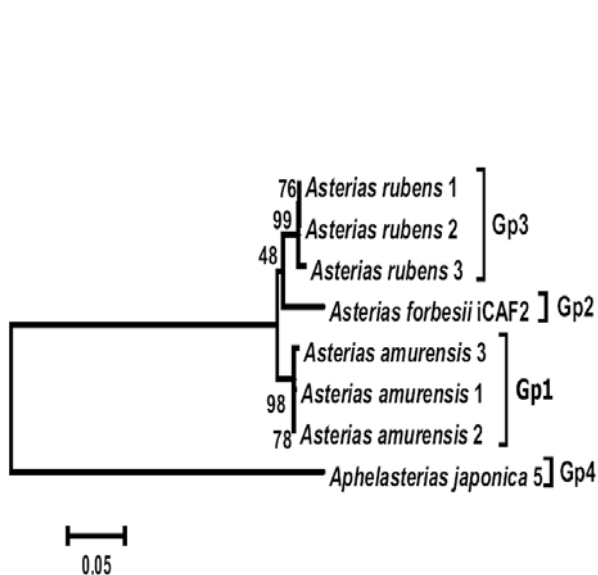


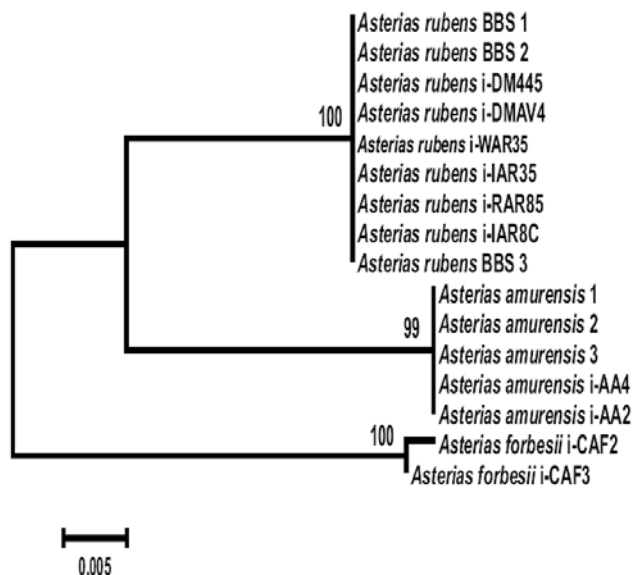
Рис. 2. Филогенетическое дерево последовательностей 5'-концевого фрагмента митохондриальных генов *COI* морских звезд семейства Asteriidae. Представлено дерево с наибольшим значением логарифма правдоподобия (-2417,442). Статистическая поддержка групп последовательностей показана на ветвях, ведущих к соответствующим кластерам. Длины ветвей на дереве масштабированы пропорционально числу замен. В анализ по всем трем кодонам была включена 41 последовательность длиной по 614 позиций



**Рис. 3.** Филогенетическое дерево последовательностей 5'-концевого фрагмента митохондриальных генов *COI* морских ежей семейства Loveniidae. Представлено дерево с наибольшим значением логарифма правдоподобия (-2555,0476). Статистическая поддержка групп последовательностей показана на ветвях, ведущих к соответствующим кластерам. Длины ветвей на дереве масштабированы пропорционально числу замен. В анализ по всем трем кодам были включены 17 последовательностей длиной по 656 позиций



**Рис. 4.** Филогенетическое дерево последовательностей *ITS1*, *ITS2* и 5,8S рДНК морских звезд семейства Asteriidae. Представлено дерево с наибольшим значением логарифма правдоподобия (-4008,5599). Статистическая поддержка групп последовательностей показана на ветвях, ведущих к соответствующим кластерам. Длины ветвей на дереве масштабированы пропорционально числу замен. В анализ были включены восемь последовательностей длиной по 1600 позиций



**Рис. 5.** Филогенетическое дерево последовательностей *ITS1* морских звезд рода *Asterias*. Представлено дерево с наибольшим значением логарифма правдоподобия (-862,2724). Статистическая поддержка групп последовательностей показана на ветвях, ведущих к соответствующим кластерам. Длины ветвей на дереве масштабированы пропорционально числу замен. В анализ были включены 16 последовательностей длиной по 488 позиций

групп, варьирует от 0,003 до 0,009, тогда как уровень межгруппового полиморфизма, оцениваемый по генетическим расстояниям между видами или родовыми кластерами, – от 0,104 до 0,298 (табл. 2).

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что генетические расстояния между видами рода *Asterias* оцениваются значениями 0,104–0,121, а соответствующие значения степени межродовой дивергенции – 0,218–0,298. Таким образом, значения внутривидовых (0,003–0,009) и межвидовых (0,104–0,121) генетических расстояний для видов рода *Asterias* не перекрываются.

Аналогичное определение межгрупповых генетических расстояний для морских ежей се-

мейства *Loveniidae* (табл. 3) показывает значительно больший по сравнению с морскими звездами уровень межвидовой дивергенции последовательностей гена *COI* у рода *Echinocardium* (0,171–0,177). Кроме того, генетическое расстояние (0,068) между последовательностью особи вида *E. cordatum* Северного моря (Gp5) и последовательностями этого вида из Японского и Желтого морей (Gp6) существенно превышает внутривидовые генетические расстояния у морских звезд. Уровень межродовой дивергенции (0,146–0,257) примерно соответствует такому у морских звезд.

Определение генетических расстояний по транскрибируемому ядерным маркерам (*ITS1* –

**Таблица 2.** Матрица межгрупповой дивергенции последовательностей митохондриальных генов *COI* морских звезд семейства *Asteriidae*

Группы	Gp1	Gp2	Gp3	Gp4	Gp5	Gp6	Gp7
Gp1	0	[0,015]	[0,016]	[0,018]	[0,028]	[0,029]	[0,032]
Gp2	0,104	0	[0,005]	[0,018]	[0,028]	[0,033]	[0,030]
Gp3	0,110	0,022	0	[0,019]	[0,027]	[0,033]	[0,031]
Gp4	0,121	0,114	0,121	0	[0,026]	[0,033]	[0,031]
Gp5	0,238	0,238	0,235	0,218	0	[0,031]	[0,036]
Gp6	0,228	0,259	0,258	0,262	0,255	0	[0,032]
Gp7	0,265	0,251	0,267	0,256	0,298	0,259	0

Примечание. Распределение по группам проведено на основании кластирования последовательностей на филогенетическом дереве (рис. 2). Обозначения групп: Gp1 – *Ast. rubens*, 53 изолята; Gp2 – *Ast. amurensis*, 6 изолятов; Gp3 – *Ast. amurensis*, 12 изолятов; Gp4 – *Ast. forbesii*, 20 изолятов; Gp5 – *Forcipulatida* sp., 1 изолят; Gp6 – *Aph. japonica*, 5 изолятов; Gp7 – *Distolasterias nippon*, 1 изолят. Ниже диагонали показаны средние значения межгрупповой дивергенции с учетом внутригрупповой, выраженные в единицах числа нуклеотидных замен на сайт. Выше диагонали в квадратных скобках приведены значения стандартной ошибки. В анализе были использованы 98 нуклеотидных последовательностей с учетом всех трех позиций кодонов. Генетические расстояния рассчитывали согласно двухпараметрической модели нуклеотидных замен [16].

**Таблица 3.** Матрица межгрупповой дивергенции последовательностей митохондриальных генов *COI* морских ежей семейства *Loveniidae* (отряд *Spatangoida*)

Группы	Gp1	Gp2	Gp3	Gp4	Gp5	Gp6
Gp1	0	[0,026]	[0,026]	[0,029]	[0,030]	[0,031]
Gp2	0,215	0	[0,020]	[0,022]	[0,022]	[0,022]
Gp3	0,190	0,149	0	[0,019]	[0,026]	[0,023]
Gp4	0,233	0,163	0,146	0	[0,024]	[0,023]
Gp5	0,251	0,193	0,195	0,177	0	[0,010]
Gp6	0,257	0,194	0,174	0,171	0,068	0

Примечание. Распределение по группам проведено на основании кластирования последовательностей на филогенетическом дереве (рис. 3). Обозначения групп: Gp1 – *Plagiobrissus grandis* AJ639916, 1 изолят; Gp2 – род *Spatangus* и *Spatangoida* sp., по 2 изолята; Gp3 – род *Lovenia*, 3 изолята; Gp4 – *Echinocardium laevigaster*, 1 изолят; Gp5 – *E. cordatum*, 1 изолят; Gp6 – *E. cordatum*, 6 изолятов. Ниже диагонали показаны средние значения межгрупповой дивергенции с учетом внутригрупповой, выраженные в единицах числа нуклеотидных замен на сайт. Выше диагонали в квадратных скобках приведены значения стандартной ошибки. В анализе были использованы 17 нуклеотидных последовательностей с учетом всех трех позиций кодонов.

5,8S рДНК – *ITS2*) для морских звезд семейства Asteriidae показывает значительно меньший уровень межвидовой (0,031–0,045) и более высокий уровень межродовой (0,328–0,350) дивергенции по этим маркерам по сравнению с митохондриальным геном *COI* (табл. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из генетического анализа следует (рис. 2), что последовательности гена *COI* разных популяций одного и того же вида морских звезд образуют монофилетические видовые кластеры. Так, последовательности всех трех представленных в работе видов рода *Asterias* образуют монофилетические группы с высоким уровнем бутстрэп-поддержки (99%). Примечательно, что удаленные географически друг от друга западноатлантические (американские), восточноатлантические (европейские) и беломорские популяции *Ast. rubens* образуют гомогенный кластер, в котором невозможно выделить какие-либо подгруппы. Отмеченные на дереве два артефакта – появление последовательности *Aph. japonica* DQ592560 в кластере *Ast. amurensis* и последовательности *Ast. rubens* DQ077915 в кластере *Ast. forbesii* – скорее всего, объясняются ошибками в определении видов. Очевидно, что последовательность *Aph. japonica* DQ592560 принадлежит виду *Ast. amurensis*, т.к. последовательности пяти других индивидов *Aph. japonica* образуют единый кластер в основании дерева, далеко отстоящий от кластера *Ast. amurensis*. Последовательность *Ast. rubens* DQ077915 принадлежит, скорее всего, *Ast. forbesii*. Виды рода *Asterias* трудно различимы морфологически, и в случае перекрытия ареалов их легко спутать. Действительно, в Северной Атлантике отмечены два вида *Asterias*. *Ast. forbesii* обитает на шельфе североамериканского

побережья от мыса Гаттерас до мыса Кейп-Код, к северу от которого простирается ареал *Ast. rubens*, европейские популяции которого населяют шельф атлантического побережья от Исландии до западной Франции. Ареалы североамериканских популяций *Ast. forbesii* и *Ast. rubens* перекрываются на большом участке шельфа вокруг мыса Кейп-Код [17]. Таким образом, полученные данные, включая и отмеченные артефакты, свидетельствуют о пригодности использованного фрагмента гена *COI* для видовой идентификации морских звезд.

Что касается родственных отношений на более высоком таксономическом уровне, то внутри рода самыми близкими оказываются *Ast. amurensis* (северотихоокеанский вид) и *Ast. rubens* (североатлантический вид), несмотря на значительную удаленность ареалов этих видов. Близость этих двух видов подчеркивается также числом общих специфичных для них признаков: из 36 филогенетически информативных сайтов их объединение поддерживают 13 сайтов, тогда как объединение *Ast. rubens* и *Ast. forbesii* поддерживается только семью сайтами. Вместе с тем североатлантический вид *Ast. forbesii* оказывается равноудаленным от двух других видов, находясь в основании группировки трех видов этого рода. Последовательности видов двух других родов из Японского моря, *Distolasterias* и *Aphelasterias*, своим положением в основании дерева указывают на значительную удаленность этих родов от рода *Asterias*. Следует заметить, что надежность определения родственных связей таксонов иглокожих рангом выше видового на основе гена *COI* может оказаться сомнительной ввиду насыщения гена мутациями вследствие высокого эволюционного возраста таксонов.

Определение видовой или популяционной принадлежности разных форм животных связано с уровнем и характером внутривидовой и

**Таблица 4.** Матрица межгрупповой дивергенции последовательностей ядерных спейсеров *ITS1*, *ITS2* и 5,8S рДНК морских звезд семейства Asteriidae

Группы	Gp1	Gp2	Gp3	Gp4
Gp1	0	[0,006]	[0,004]	[0,019]
Gp2	0,049	0	[0,005]	[0,020]
Gp3	0,031	0,045	0	[0,018]
Gp4	0,350	0,355	0,328	0

Примечание. Распределение по группам проведено на основании кластеризации последовательностей на филогенетическом дереве (рис. 4). Обозначения групп: Gp1 – *Ast. amurensis*, 3 изолята; Gp2 – *Ast. forbesii*, 1 изолят; Gp3 – *Ast. rubens*, 3 изолята; Gp4 – *Aph. japonica*, 1 изолят. Ниже диагонали показаны средние значения межгрупповой дивергенции с учетом внутривидовой, выраженные в единицах числа нуклеотидных замен на сайт. Выше диагонали в квадратных скобках приведены значения стандартной ошибки. В анализе были использованы восемь нуклеотидных последовательностей, включавших вместе с разрывами 1601 позицию. Генетические расстояния рассчитывали согласно двухпараметрической модели [16].



межвидовой дивергенции маркерных последовательностей. К настоящему времени накопилось довольно большое, хотя еще и не вполне достаточное, количество данных по этому вопросу, касающихся в основном дивергенции митохондриального гена *COI*. В большинстве случаев внутривидовая дивергенция этого гена оценивается величиной <1%, редко превышая уровень в 2%; случаи превышения относятся к выборкам одного вида из географически удаленных частей ареала или объясняются наличием скрытых видов [18]. Уровень дивергенции может отличаться в разных группах, хотя чаще всего для разных групп приводятся близкие значения. Так, для моллюсков семейства *Vesicomyidae* уровни внутривидовой и межвидовой дивергенции гена *COI* оцениваются значениями 0,2–0,8 и 3,9–10,3% соответственно [6–8]. Близкие этим значения установлены для моллюсков семейства *Veneridae* [9]. У иглокожих степень внутривидовой дивергенции *COI* варьирует в диапазоне 0,0–3,0% при среднем значении 0,62%, а уровень внутривидовой дивергенции – 0,0–27,06% при среднем значении 15,33% [3–5]. Анализ дивергенции гена *COI* 22 266 популяций и видов разных групп животных дает следующие значения *p*-расстояний для таксонов разного ранга:  $0,89 \pm 0,16$  – внутри популяций и между ними;  $3,78 \pm 1,18$  – для подвидов, полувидов и видов-близнецов;  $11,06 \pm 0,53$  – для морфологически различающихся видов;  $16,60 \pm 0,69$  – для видов разных родов внутри семейства;  $20,57 \pm 0,40$  – для семейств одного отряда [19].

Полученные в настоящей работе данные по уровню дивергенции *COI* морских звезд семей-

ства *Asteriidae* и морских ежей семейства *Loveniidae* укладываются в диапазон приведенных значений. Более того, генетическое расстояние между последовательностями *COI* морских ежей *Echinocardium cordatum* из Северного моря и Японского моря (6,8%) дает основание усомниться в принадлежности этих животных к одному виду, хотя в этом случае нельзя исключить фактор географической удаленности популяций [18].

Возможность использования другого маркера – ядерных спейсеров рРНК – для определения видовой или популяционной принадлежности разных форм животных остается неясной, в т.ч. и после данной работы. По-видимому, применение для этой цели критерия генетического расстояния сомнительно ввиду низкого уровня межвидовой дивергенции (3,1–4,9%). Показано, что в этом случае возможно использование другого критерия – такой особенности, как наличие видоспецифичных компенсаторных замен в последовательности *ITS2*, обнаруживающихся при анализе вторичной структуры [20].

В целом приведенные результаты показывают, что изученные в работе последовательности транскрибируемых ядерных спейсеров *ITS* и митохондриального гена *COI* могут служить надежными маркерами для видовой идентификации иглокожих Японского и Белого морей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-50-00029 «Научные основы создания Национального банка-депозитария живых систем»), а также программы «Дальний Восток» (проекты № 15-1-6-0140 и 15-1-6-0070).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shneyer, V.S. (2007) On the species-specificity of DNA: fifty years later, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1377–1384.
- Shubina, E.A., Ponomareva, E.V., Klimov, A.V., Klimova, A.V., and Kedrova, O.S. (2015) Repetitive DNA sequences as an indicator of the level of genetic isolation in fish, *Mol. Biol. (Moscow)*, **49**, 405–416.
- Ward, R.D., Holmes, B.H., and O'Hara, T.D. (2008) DNA barcoding discriminates echinoderm species, *Mol. Ecol. Resour.*, **8**, 1202–1211.
- Minin, K.V., Petrov, N.B., and Vladychenskaya, I.P. (2015) Sea urchins of the genus *Gracilechinus* Fell & Pawson, from the Pacific Ocean: morphology and evolutionary history, *Marine Biol. Res.*, **11**, 253–268.
- Wares, J.P. (2001) Biogeography of *Asterias*: North Atlantic climate change and speciation, *Biol. Bull.*, **201**, 95–103.
- Goffredi, S.K., Hurtado, L.A., Hallam, S., and Vrijenhoek, R.C. (2003) Evolutionary relationships of deep-sea vent and cold seep clams (Mollusca: Vesicomyidae) of the «*pacifica/lepta*» species complex, *Marine Biol.*, **142**, 311–320.
- Audzijonyte, A., Krylova, E.M., Sahling, H., and Vrijenhoek, R.C. (2012) Molecular taxonomy reveals broad trans-oceanic distributions and high species diversity of deep-sea clams (Bivalvia: Vesicomyidae: Pliocardiiinae) in chemosynthetic environments, *System. Biodivers.*, **10**, 403–415.
- Krylova, E.M., Kamenev, G.M., Vladychenskaya, I.P., and Petrov, N.B. (2015) Vesicomyinae (Bivalvia: Vesicomyidae) of the Kuril–Kamchatka Trench and adjacent abyssal regions, *Deep-Sea Res. Part II*, **111**, 198–209.
- Chen, J., Li, Q., Kong, L., and Yu, H. (2011) How DNA barcodes complement taxonomy and explore species diversity: the case study of a poorly understood marine fauna, *PLoS One*, **6**, e21326.
- Ekimova, E., Korshunova, T.A., Shepetov, D.M., Neretina, T.V., Sanamyan, N.P., and Martynov, A.V. (2015) Integrative systematics of northern and Arctic nudibranchs of the genus *Dendronotus* (Mollusca, Gastropoda), with descriptions of three new species, *Zool. J. Linn. Soc.*, **173**, 841–886.

11. Seregin, A.P., Anackov, G., and Friesen, N. (2015) Molecular and morphological revision of the *Allium saxatile* group (Amaryllidaceae): geographical isolation as the driving force of underestimated speciation, *Bot. J. Linn. Soc.*, **178**, 67–101.
12. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **5**, 294–299.
13. Hoareau, T.B., and Boissin, E. (2010) Design of phylum-specific hybrid primers for DNA barcoding: addressing the need for efficient *COI* amplification in the Echinodermata, *Mol. Ecol. Resour.*, **10**, 960–967.
14. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.*, **30**, 2725–2729.
15. Nei, M., and Kumar, S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*, Oxford University Press, New York.
16. Kimura, M.A. (1980) Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *J. Mol. Evol.*, **16**, 111–120.
17. Franz, D.R., Worley, E.K., and Merrill, A.S. (1981) Distribution patterns of common seastars of the Middle Atlantic Continental shelf of the Northwest Atlantic (Gulf of Maine to Cape Hatteras), *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, **160**, 394–418.
18. Avise, J.C., and Walker, D. (1999) Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 992–995.
19. Картавцев Ю.Ф. (2013) Генетическая дивергенция видов и других таксонов. Географическое видообразование и генетическая парадигма неodarвинизма в действии, *Усп. соврем. биологии*, **133**, 419–451.
20. Muller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J., and Wolf, M. (2007) Distinguishing species, *RNA*, **13**, 1469–1472.

## MOLECULAR-GENETIC MARKERS OF INTRA- AND INTERSPECIES DIVERGENCE WITHIN ASTEROIDS AND ECHINOIDS (Echinodermata)

N. B. Petrov<sup>1\*</sup>, I. P. Vladychenskaya<sup>1</sup>, A. L. Drozdov<sup>2,3</sup>,  
and O. S. Kedrova<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow 119991, Russia;  
E-mail: petr@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

<sup>3</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok 690091, Russia

<sup>4</sup> Moscow State University, Biological Faculty, Moscow 119991, Russia

Received April 21, 2016

Revision received July 21, 2016

5'-fragments of *COI* gene mt DNA were sequenced for multiple individuals of three asteroid species from the family Asteriidae, *Asterias amurensis* and *Aphelasterias japonica* collected in the Sea of Japan, and *Asterias rubens* collected in the White Sea, as well as for multiple individuals of the irregular echinoid *Echinocardium cordatum* (family Loveniidae) from the Sea of Japan. Likewise, the internal transcribed spacers region including 5.8S rDNA (*ITS1* – 5.8S rDNA – *ITS2*) was sequenced for multiple individuals of three asteroid species from the Sea of Japan and the White Sea. Phylogenetic analysis of these sequences together with homologous sequences of the *COI* gene taken from GenBank for *Ast. forbesii*, *Ast. rubens*, and *E. laevigaster* from the North Atlantic and *E. cordatum* from the Yellow and North Seas distributes them strongly into conspecific clusters with high bootstrap support values (all 99%). Two exclusions – the sequence of *Ast. rubens* DQ077915 placed within the *Ast. forbesii* cluster and sequence of *Aph. japonica* DQ992560 placed within the *Ast. amurensis* cluster – are likely to be result of erroneous species identifications. Within the Asteriidae family, values of intraspecific polymorphism for *COI* according to genetic distances are in range of 0.2–0.9%, corresponding congeneric values are in range of 10.4–12.1%, and intergeneric values are in range of 21.8–29.8%. Within the sea urchin family Loveniidae, congeneric divergence of *COI* for the *Echinocardium* genus is significantly higher (11.7–17.7%) compared to that within asteroids, when intergeneric divergence (14.6–25.7%) is similar to that within asteroids. Interspecific genetic distances from nuclear transcribed sequences (*ITS1* – 5.8S rDNA – *ITS2*) within Asteriidae are lower (3.1–4.5%), and intergeneric distances are significantly higher (32.8–35.0%) compared to corresponding distances from the *COI* gene. These results suggest that the investigated molecular-genetic markers are useful for Asterozoa and Echinozoa species delimitation and identification.

**Key words:** molecular evolution, population, speciation, Echinodermata, cytochrome oxidase subunit 1 gene, internal transcribed spacers