

На правах рукописи

Демин Александр Геннадьевич

**АНАЛИЗ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНА *COI* И ЕГО  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ФИЛОГЕНИИ И СИСТЕМАТИКИ ТАКСОНОВ  
С ВЫСОКИМ ВИДОВЫМ РАЗНООБРАЗИЕМ НА ПРИМЕРЕ  
КОМАРОВ-ЗВОНЦОВ ПОДСЕМЕЙСТВА *CHIRONOMINAE*  
(*CHIRONOMIDAE*, *DIPTERA*)**

03.02.07 – генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2011 г.

Работа выполнена на кафедре общей биологии, фармакогнозии и ботаники  
Саратовского государственного медицинского университета  
им. В.И. Разумовского Минздравсоцразвития, г. Саратов

**Научный руководитель:**  
доктор биологических наук

Полуконова Наталья Владимировна  
ГОУ ВПО Саратовский государственный  
медицинский университет им. В.И.  
Разумовского Минздравсоцразвития, г.  
Саратов

**Официальные оппоненты:**  
доктор биологических наук,  
профессор

Гордеев Михаил Иванович  
ГОУ ВПО Московский государственный  
областной университет, г. Москва

доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник

Макарченко Евгений Анатольевич  
Учреждение Российской академии наук  
Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г.  
Владивосток

**Ведущее учреждение:**

Учреждение Российской академии наук  
Зоологический институт РАН, г. Санкт-  
Петербург

Защита состоится «14» октября 2011 г. в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании объединенного диссертационного совета Д 002.214.01 при  
Учреждении Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И.  
Вавилова РАН, по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3. Факс:  
8(499)1358962, электронный адрес: [aspirantura@vigg.ru](mailto:aspirantura@vigg.ru), адрес в Интернете:  
[www.vigg.ru](http://www.vigg.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской  
академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Автореферат разослан «16» \_\_\_\_\_ сентября \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

## Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Подсемейство Chironominae (Chironomidae, Diptera) представляет обширную группу комаров-звонцов, распространенных повсеместно, за исключением Антарктиды (Макарченко, Макарченко, 2006). Подсемейство представлено тремя трибами – Chironomini (не менее 69 родов), Tanytarsini (не менее 16 родов) и Pseudochironomini (не менее 5 родов) (Панкратова, 1983; Wiederholm, 1983, 1986, 1989; Coffman, Ferrington, 1996; Sæther, 2000; Макарченко, Макарченко, 2006; Cranston, Martin, 2007). Несмотря на многолетние исследования комаров-звонцов подсемейства Chironominae, ряд вопросов их систематики и эволюции до сих пор остается нерешенным. Это обусловлено высоким видовым разнообразием, различной степенью морфологической дифференциации родов, отсутствием кариотипических данных для видов многих родов, а также сложностью видовой идентификации большинства представителей Chironominae. До сих пор нет единой филогенетической схемы, описывающей родственные связи триб подсемейства.

Наиболее перспективным решением проблем систематики и эволюции насекомых представляется использование молекулярных филогенетических маркеров. Чаще всего для этих целей используются последовательности нуклеотидов высоко консервативных ядерных генов – *18S rDNA*, *EF-1 $\alpha$* , *CAD* и др., которые у комаров-звонцов известны только для единичных родов.

К данному моменту большие массивы информации накоплены по последовательности 5'-концевого фрагмента гена мтДНК цитохром С оксидазы I (*COI*). Начиная с 2004 года, этот фрагмент гена *COI* широко применяется для штрихкодирования живых организмов (Ratnasingham, Hebert, 2007), к настоящему моменту удалось установить его последовательность более чем у 300 видов Chironominae ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)). ДНК-последовательность *COI* обычно применяется для анализа родственных связей между популяциями и видами, но редко используется в исследованиях таксонов более высокого систематического ранга. Возможность и эффективность применения гена *COI* для реконструкции филогенетических связей родов и триб в группах насекомых с высоким видовым разнообразием, таких как подсемейство Chironominae, до сих пор остается дискуссионной (Cranston et al., 2010; Ekrem, et al., 2010).

Цель работы – изучение эволюционной изменчивости гена *COI* у видов комаров-звонцов из наиболее распространенных родов подсемейства Chironominae (Chironomidae, Diptera), а также установление возможностей его использования для уточнения филогении таксонов надродового уровня.

Были поставлены следующие задачи:

1. Установить ранее не описанные последовательности нуклеотидов 5'-концевого фрагмента гена *COI* у широко распространенных видов комаров-звонцов из родов *Baeotendipes*, *Glyptotendipes*, *Xenochironomus*, *Endochironomus*, *Chironomus*, *Synendotendipes*, *Polypedilum*, *Stenochironomus*, *Cricotopus*.

2. Выявить особенности эволюционной изменчивости 5'-концевого фрагмента гена *COI* в подсемействе Chironominae и определить границы его вариабельности у вида, рода, трибы и подсемейства.

3. С привлечением ранее опубликованных данных реконструировать структурную эволюцию нуклеотидной и аминокислотной последовательностей первой субъединицы цитохром С оксидазы комаров-звонцов подсемейства Chironominae.

4. Оценить информативность филогенетического сигнала, полученного при использовании 5'-концевого фрагмента гена *COI*, с учетом уже существующих схем по другим генам, а также данных цитогенетики и морфологии рассматриваемых представителей Chironominae. Проанализировать возможность использования гена *COI* для датировки времени дивергенции основных эволюционных линий подсемейства.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Впервые установлена нуклеотидная последовательность 5'-концевого фрагмента гена *COI* протяженностью с 100 по 634 п.н. (всего 535 п.н.) у 14-ти видов: *Baeotendipes noctivaga* (JN016823–JN016825), *Glyptotendipes imbecillis* (JN016845), *Glyptotendipes glaucus* (JN016837), *Glyptotendipes gripekoveni* (JN016844), *Glyptotendipes mancurianum* (JN016842), *Xenochironomus xenolabis* (JN016835, JN016836), *Chironomus curabilis* (JN016810, JN016811), *Chironomus usenicus* (JN016806–JN016809), *Endochironomus tendens* (JN016838, JN016839), *Endochironomus albipennis* (JN016840), *Synendotendipes kaluginae* (JN016841), *Polypedilum sordens* (JN016847), *Stenochironomus gibbus* (JN016848), *Cricotopus glacialis* (JN016846).

Впервые реконструирована схема эволюции нуклеотидной последовательности гена *COI* комаров-звонцов подсемейства Chironominae. Показано слабое влияние отбора на характер замещения нуклеотидов в гене *COI* у Chironominae, что позволяет рассматривать аминокислотную последовательность, кодируемую этим геном, в качестве филогенетического маркера при исследовании родственных связей таксонов, начиная с родового уровня. Определены границы изменчивости *COI* у разных таксономических единиц комаров-звонцов подсемейства Chironominae – вида, рода, трибы и подсемейства.

Впервые приведена филогенетическая схема, отражающая родственную связь представителей комаров-звонцов трех триб подсемейства Chironominae. Показана и обоснована необходимость изменения существующей систематики подсемейства Chironominae. Впервые на молекулярном уровне продемонстрировано, что эволюционная линия *Stenochironomus* может претендовать на статус отдельного от Chironominae подсемейства.

Впервые проведена молекулярная датировка основных эволюционных событий в подсемействе Chironominae.

Научно-практическая значимость. Представлена возможность использования штрихкодowego гена мтДНК – *COI* в макросистематике таксонов с высоким видовым разнообразием.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на Международной научной конференции «Ломоносов», 2007; XIII съезде Русского энтомологического общества, 2007; IX конференции «Водные экосистемы, организмы, инновации – 9», 2007; XIII Международной школеконференции молодых учёных «Биология внутренних вод», 2007; 68 научно-практической конференции студентов и молодых ученых Саратовского государственного медицинского университета «Молодые ученые – здравоохранению региона», 2007; XXI Любичевских чтениях «Современные проблемы эволюции», 2007; ежегодных научных конференциях студентов и аспирантов Саратовского государственного университета, 2007 и 2008; Международной научной конференции «Хромосома 2009», 2009; XIV школеконференции молодых учёных «Биология внутренних вод», 2010; V Международной конференции по кариосистематике беспозвоночных животных «KARYO V», 2010; IV всероссийском симпозиуме по амфибиотическим насекомым «Проблемы водной энтомологии России и сопредельных государств» СОГУ, 2010; Международной научной конференции «Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке», 2011.

Декларация личного участия автора. В диссертационной работе использованы экспериментальные материалы, полученные лично автором, а также совместно с Н.С. Мюге (лаборатория экспериментальной эмбриологии ИБР РАН). Секвенирование проводилось совместно с Н.С. Мюге. Полученные результаты обсуждались автором совместно с научным руководителем, а так же с Е.В. Шайкевич (лаборатория сравнительной генетики животных, ИОГЕН РАН) и Н.С. Мюге. Суммарное личное участие автора составило 80%.

Структура и объем работы. Диссертация содержит разделы: введение, обзор литературы, материал и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложения. Работа изложена на 137 страницах, включает 24 рисунка и 17 таблиц, список цитируемой литературы включает 160 ссылок, из которых 100 на иностранном языке.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 работ, включая 11 статей, из которых две в журналах, рекомендованных ВАК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Филогенетический сигнал, получаемый с использованием аминокислотной последовательности, кодируемой 5'-концевым фрагментом широко применяемого в настоящее время «баркодингового» гена *COI*, в пределах подсемейства Chironominae столь же информативен, как и сигнал, получаемый от последовательностей ядерных генов, используемых при филогенетическом анализе надродового уровня.

2. Использование аминокислотной последовательности, кодируемой 5'-концевым фрагментом гена *COI*, позволяет проводить

реконструкции родственных связей в подсемействах с высоким видовым разнообразием и давать оценку времени дивергенции таксонов, начиная с родового уровня.

3. С достоверностью  $\geq 75\%$  пара видов принадлежит одному роду, если уровень аминокислотной изменчивости  $< 1.7\%$ ; – одной трибе – от 1.7 до 4.0%; – разным трибам – от 4.6 до 6.1%; – разным подсемействам –  $> 7.9$ . Полученные диапазоны могут быть использованы как таксономический критерий рода, трибы и подсемейства у Chironominae.

Благодарности. Искренне благодарю своего научного руководителя д.б.н. Н.В. Полуконову. Выражаю признательность к.б.н. Н.С. Мюге, к.б.н. Е.В. Шайкевич, д.б.н. В.В. Аникину и С. Мартину (Германия) за практические рекомендации, а также д.б.н. Н.А. Дурновой за предоставленные образцы для исследования.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал. Использованы личинки IV возраста и имаго комаров-звонцов, собранные в 2007-2009 г.г. в Саратовской, Самарской и Воронежской областях, Краснодарском крае, Калмыкии и Казахстане (табл. 1). Всего было исследовано 35 особей, относящихся к 20 видам из 10 родов комаров-звонцов. При сборе использованы как стандартные гидробиологические и энтомологические методики (Шилова, 1976), так и собственные – с помощью предложенного имагоуловителя (Демина и др., 2009). Материал фиксировали: имаго в 70<sup>0</sup> этиловом спирте, личинок – в спиртоуксусной смеси (Кикнадзе и др., 1991). Видовую идентификацию проводили с помощью морфологического и кариотипического методов (Панкратова, 1983; Шобанов, 1989; Кикнадзе и др., 1991; Полуконова, 2005; Макаренко, 2006).

Определена последовательность нуклеотидов 5'-концевого участка гена *COI* 35 особей, представляющих 20 видов из 10 родов комаров-звонцов (табл. 1).

В работе также использовано 146 нуклеотидных последовательностей гена *COI*, относящихся к 125 видам 29 родов двукрылых (Diptera), депонированные в GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), каталожные номера которых приведены на филограммах. Длина анализируемого фрагмента гена *COI* составила 535 п.н. (с 100 по 634). В филогенетических реконструкциях подсемейства Chironominae, основанных на гене *COI*, использованы сиквенсы 155 представителей, из которых 141 относилась к 133 видам 32 родов Chironominae. Лично было сделано 23 сиквенса 19 видов из 10 родов хирономид. В качестве внешней группы выбраны: представители двух родов наиболее близкого к Chironominae подсемейства Ortocladiinae (Saether, 2000) – *Orthocladus* (4 вида) и *Cricotopus* (6 видов); 2 вида *Culicoides*, принадлежащие наиболее близкому к Chironomidae семейству Ceratopogonidae (Bertone, 2008) и, эволюционно удаленный от хирономид, *Ogcodes basalis* (Acroceridae). Для реконструкции родственных связей видов

рода *Chironomus* использовалась последовательности фрагмента гена *COI* - длиной 595 п.н. (74-669) 33 особей 19 видов. Лично было установлено 13 последовательностей 7 видов из 2 родов. В качестве внешней группы взяты *Baeotendipes sp.*, *B. noctivaga* (Chironomidae) и *Drosophila angor* (Drosophilidae).

Таблица 1

Материал, места сбора и каталожные номера GenBank последовательностей гена *COI* комаров-звонцов

Виды	Места и даты сборов (обозначение популяции)	Катал. № GenBank
<i>Chironomus plumosus</i> (Linnaeus, 1758)	оз. Калач, Саратовской обл. 02.2007 г. (Novous)	JN016829 JN016830
	р. Дон, Воронежской обл., г. Воронеж, 07.2008 г. (Voron)	JN016832
	р. Дон, Воронежской обл., г. Богучары, 07.2008 г. (Boguchar)	JN016833
	р. Зап. Двина, Брянская обл., г. Брянск, 06.2009 г. (Brjansk)	JN016834
	р. Волга, Самарская обл., г. Тольятти, 06.2009 г. (Tol)	JN016831
<i>Ch. curabilis</i> Beljanina, Loginova, Sigareva, 1990	р. Волга, Саратовская обл. п. Банновка; 07.2006 г. (Ban)	JN016811
	р. Волга, Саратовская обл. г. Балаково, 07.2006 г. (Bal)	JN016810
<i>Ch. usenicus</i> Loginova et Beljanina, 1994	оз. Калач, Саратовской обл., 02. 2001, 02.2007 г. (Novous)	JN016806 JN016807 JN016808 JN016809
<i>Ch. balatonicus</i> Devai, Wuelker, Scholl, 1983	оз. Калач, Саратовской обл., 02.2007 г. (Novous)	JN016826
	р. Дон, Воронежской обл., г. Воронеж, 07.2008 г. (Voron)	JN016827
<i>Ch. commutatus</i> Kayl, 1960	о. Сазанка, Саратовской обл., 07.2008 г. (Saz)	JN016828
<i>Ch. bernensis</i> Klotzli, 1973	оз. г. Тольятти, Самарской обл. 07.2008 г. (Tol)	JN016851
<i>Baeotendipes noctivaga</i> Kieffer, 1911	Аральское море, Казахстан, 08.2008 г. (Aral)	JN016824 JN016825
	о. Маныч, респ. Калмыкия, 02.2007 г. (Kalm)	JN016823
<i>Dicrotendipes nervosus</i> Staeger, 1839	Волга, Саратовской обл., 07.2009 г.* (Volga);	JN016849
	р. Терешка, Саратовской обл., 07.2009 г.* (LjisGorji)	JN016850
<i>Endochironomus tendens</i> (Fabricius, 1775)	р. Терешка, Саратовской обл., (Tereshka)	JN016838
	р. Красавка, Саратовской обл., 07.2009 г.* (NAlexan)	JN016839
<i>E. albipennis</i> Meigen, 1830	о. Сазанка, Саратовской обл., 07.2009 г.* (Saz)	JN016840
<i>Glyptotendipes barbipes</i> Staeger, 1839	р. Узень, Саратовской обл., 08.2007 г. (Novous)	JN016843
<i>G. glaucus</i> Meigen, 1804	р. Волга, Саратовской обл., 07.2009 г.* (Engels)	JN016837

\* сбор и определение Н.А Дурновой

Виды	Места и даты сборов (обозначение популяции)	Катал. № GenBank
<i>G. gripekoveni</i> (Kieffer, 1913)	оз. г. Маркс, Саратовской обл., 07.2009 г. * (Marks)	JN016844
<i>G. imbecillis</i> Walker, 1856	р. Волга, Саратовской обл., 07.2009 г. * (Volg Uzm)	JN016845
<i>G. mancinianus</i> Edwards, 1929	оз. г. Маркс, Саратовской обл., 07.2009 г. * (Marks)	JN016842
<i>P. (Pentapedilum) sordens</i> (Van der Wulp, 1874)	р. Красавка, Саратовской обл., 07.2009 г. * (Mih)	JN016847
<i>Stenochironomus gibbus</i> (Fabricius, 1794)	р. Терешка, Саратовской обл., 07.2009 г. * (Tereshka)	JN016848
<i>Synendotendipes kaluginae</i> Durnova, 2010	о. Холодное, Саратовской обл., 07.2009 г. * (Holodn)	JN016841
<i>Xenochironomus xenolabis</i> (Kieffer, 1916)	р. Красавка, Саратовской обл., 07.2009 г. * (NAlexan)	JN016836
	р. Терешка, Саратовской обл., 07.2009 г. * (Tereshka)	JN016835
<i>Cricotopus glacialis</i> Edwards, 1922	р. Волга, Саратовской обл., 07.2009 г.* (Volga)	JN016846

Молекулярно-генетический анализ. Выделение тотальной ДНК проводилось набором Diatom<sup>tm</sup> DNA Prep 100 «Изоген». Амплификация гена *COI* - набором GenePak@ PCR Core «Изоген» на термоциклере «Терцик».

ПЦР-амплификация: структура праймеров для амплификации гена *COI*: COI1490 5'gggtcaacaatcataaagatattgg3'; COI2198 5'taaacttcagggtgacsaaaaaatca3' (Folmer et al., 1994). Условия ПЦР: I. 94° – 1'; II 5 циклов: а) 94° – 1', б) 45° – 1.5', с) 72° – 1.5'; III. 35 циклов: а) 94° – 1', б) 50° – 1.5', с) 72° – 1'; IV. 72° – 5'.

Детекция ПЦР-продуктов проводилась с помощью горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. В качестве буфера использовался стандартный трис-ацетатный буфер. Для элюции ПЦР-продуктов из геля применялся набор Diatom<sup>tm</sup> DNA Elution «Изоген». Определение первичной нуклеотидной последовательности гена проводилось на базе ВНИРО г. Москва на секвенаторе ABI 3100.

Математическая обработка полученных результатов. Для коррекции полученных последовательностей использовалась программа ChromasPro, множественное выравнивание проводилось в ClustalW, филогенетические построения методами Minimum Evolution (ME), Maximum Parsimony (MP) и UPGMA, Tajima-тест и транслирование ДНК-последовательностей - с использованием пакета программ Mega4, построение ML- и Bayesian-дендрограммы с использованием программ PhyML 3,0 и MrBayes 3.1.2. Статистический анализ - в программах Statistica6 и Mega4. Анализ насыщения ДНК-последовательности мутациями проводился по Гриффитсу (Griffiths, 1997). Расчет времени дивергенции с применением модели

\* сбор и определение Н.А Дурновой

релаксированных молекулярных часов выполнялся с использованием пакета программ BEAST v1.6.1. (параметры генерации деревьев закладывались с использованием программы BEAUTi v1.5.1; для построения деревьев использовалась программа BEAST v1.6.1; генерация результирующей хронограммы проводилась в программе TreeAnnotator v1.6.1). Филогенетические деревья визуализировались в программах MEGA4 и FigTree v1.3.1. Нуклеотидные построения проводились с применением эволюционных моделей: p-distance, Jukes Cantor, Tamura-Nej, Kimura 2-parameter и MCL и GTR. Использовались все положения кодона; только нуклеотиды в 1-ом и 2-ом положениях кодона; только нуклеотиды во 2-м положении кодона; только трансверсии в 1-м и 2-м положениях кодона, только несинонимичные замены, только транзиции в 1-м положении кодона, только трансверсии в 1-м положении кодона. В качестве эволюционных моделей замещения аминокислот применялись: JTT matrix, Dayhoff matrix, Equal Input, Poisson correction, p-distance. Оценка достоверности узлов выполнялась с использованием Bootstrap-теста (Felsenstein, 1985).

Калибровка молекулярных часов и оценка диапазона времени дивергенции проводилась с использованием данных о времени обособления семейств Chironomidae и Ceratopogonidae – 213 млн.л.н. (Bertone, 2008), и времени возникновения рода *Sergentia* – 38 млн. л.н. (Paroucheva et al., 2003).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Композиция и изменчивость *COI* и молекулярные границы таксонов комаров-звонцов подсемейства Chironominae

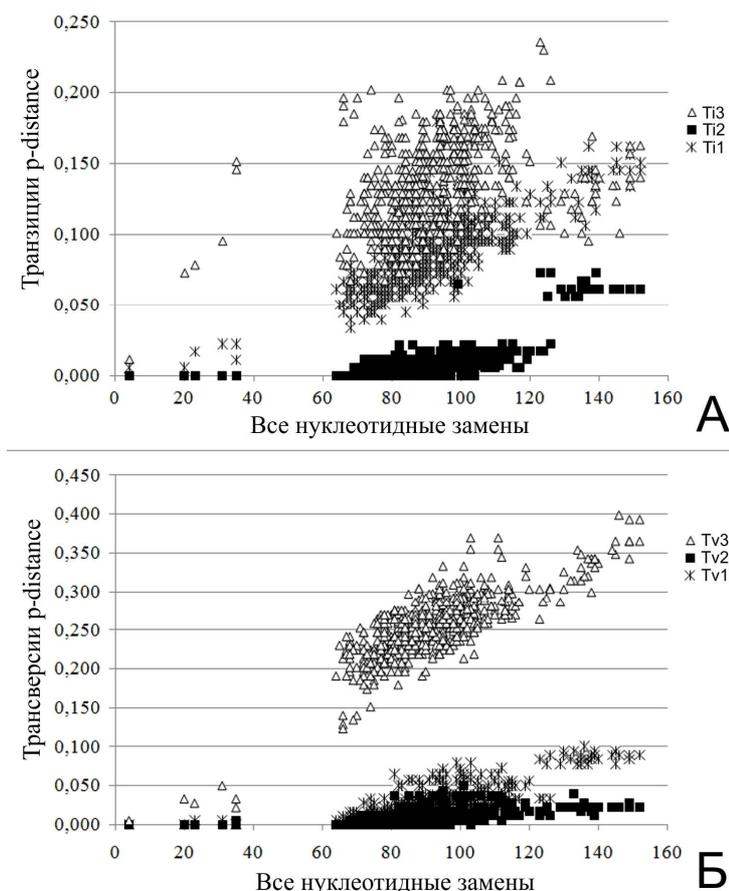
У 133 видов Chironominae на исследуемом участке гена *COI* – 535 п.н. (с 100 по 654) среднее соотношение оснований T/C/A/G составило 38.1%/18.4%/27.9%/15.6%. Количество AT пар в  $1.9 \pm 0.4$  раза выше GC. Сдвиг нуклеотидного состава - не более 20%. Выявлено 254 (47.2%) переменных нуклеотидных сайтов. Среднее отношение транзиций к трансверсиям Ti/Tv составило 0.86. Состав фрагмента аминокислотной последовательности (178 а.к.), кодируемой геном *COI*, характеризовался присутствием 20 аминокислот. Отмечено повышенное содержание лейцина – 15.51% и пониженное – лизина и цистеина – по 0.01%. На участке аминокислотной последовательности количество переменных сайтов составило 52 (29.2%).

### Реконструкция схем эволюции гена *COI* в подсемействе Chironominae

Были получены 25 схем эволюции последовательности нуклеотидов гена *COI*. При использовании транзиций и трансверсий во всех положениях кодона, схемы, полученные разными методами, сильно отличались друг от друга, кластеры в которые группировались последовательности, были плохо дифференцированы, отсутствовало согласование между эволюцией последовательности нуклеотидов гена *COI* рассматриваемых видов комаров-звонцов и их систематическим положением. Причиной подобных несогласований, было выявленное насыщение третьего положения кодона

транзициями и достижение порога насыщения транверсиями (рис. 1). Использование третьего положения кодона для описания эволюции последовательности нуклеотидов гена *COI* в подсемействе оказалось невозможным. Схемы, основанные на использовании первых двух положений кодона, более четко дифференцировали последовательности в кластеры и имели большее сходство друг с другом. Очевидно, при использовании первых двух положений кодона соотношение сигнал/шум повышалось. Комплексный анализ полученных схем позволил выявить основные эволюционные линии гена *COI* исследуемых комаров-звонцов.

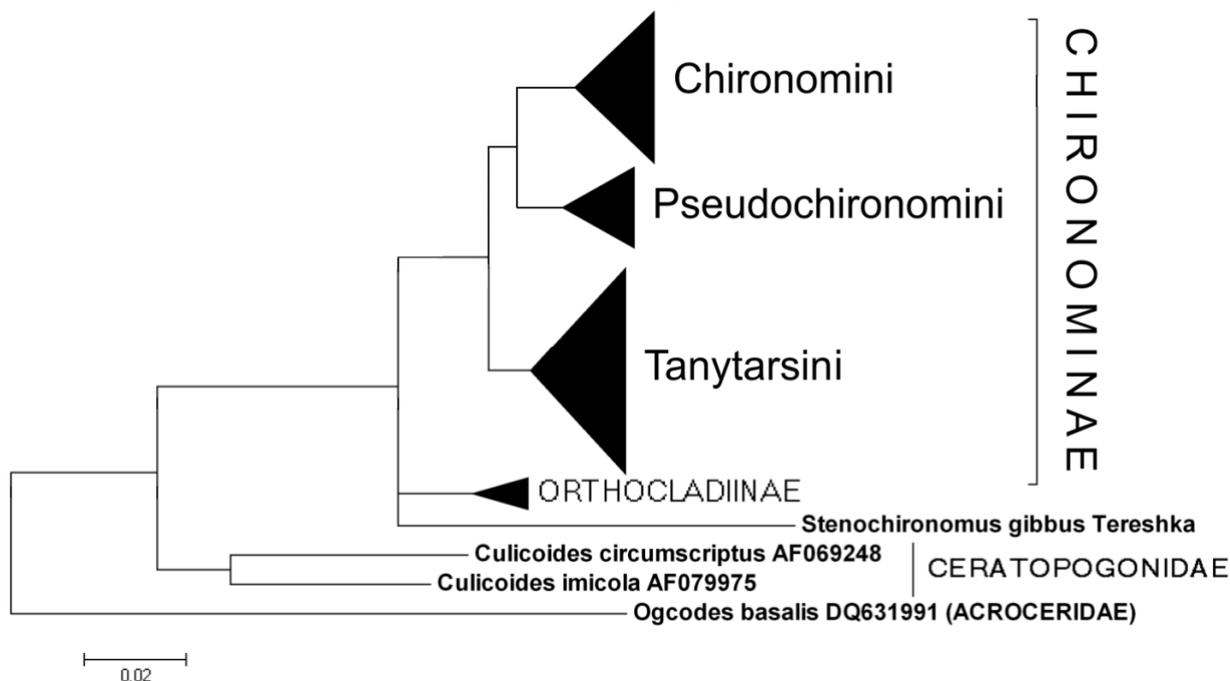
Нуклеотидные реконструкции с высокой достоверностью позволяют сделать следующие заключения: эволюционные линии гена *COI* представителей подсемейств Chironominae и Orthocladiinae хорошо обособлены друг от друга. Внутри подсемейства Chironominae ДНК-последовательности представителей триб Chironomini и Tanytarsini формируют два хорошо дифференцированных кластера. ДНК-последовательности представителей трибы Pseudochironomini - *Pseudochironomus sp.* и *Riethia stictoptera* не формируют самостоятельной эволюционной линии, а группируются вместе с ДНК-последовательностями представителей трибы Chironomini. ДНК-последовательность *Stenochronomus gibbus* формирует ветвь, обособленную от Chironomini и Tanytarsini.



**Рис. 1.** Графики насыщения ДНК-последовательности транзициями в 1-, 2-, 3-положениях кодона (А) и трансверсиями в 1-, 2-, 3- положениях кодона (Б)

T<sub>i</sub> – транзиции, T<sub>v</sub> – трансверсии. Цифрами 1, 2, 3 обозначено положение нуклеотида в кодоне.

Последовательности гена *COI* трибы Chironomini разделяются на два кластера, в один из которых входят последовательности *Endochironomus*, *Sergentia*, *Pseudochironomus*, *Synendotendipes* и *Polypedilum*, а в другой – последовательности остальных исследованных нами родов трибы (рис. 2). Однако связать эволюцию нуклеотидной последовательности *COI* с эволюцией целого ряда родов, таких как *Chironomus*, *Stempillinella*, *Micropsectra*, не представлялось возможным.



**Рис. 2.** Эволюционные линии гена *COI* подсемейства Chironominae

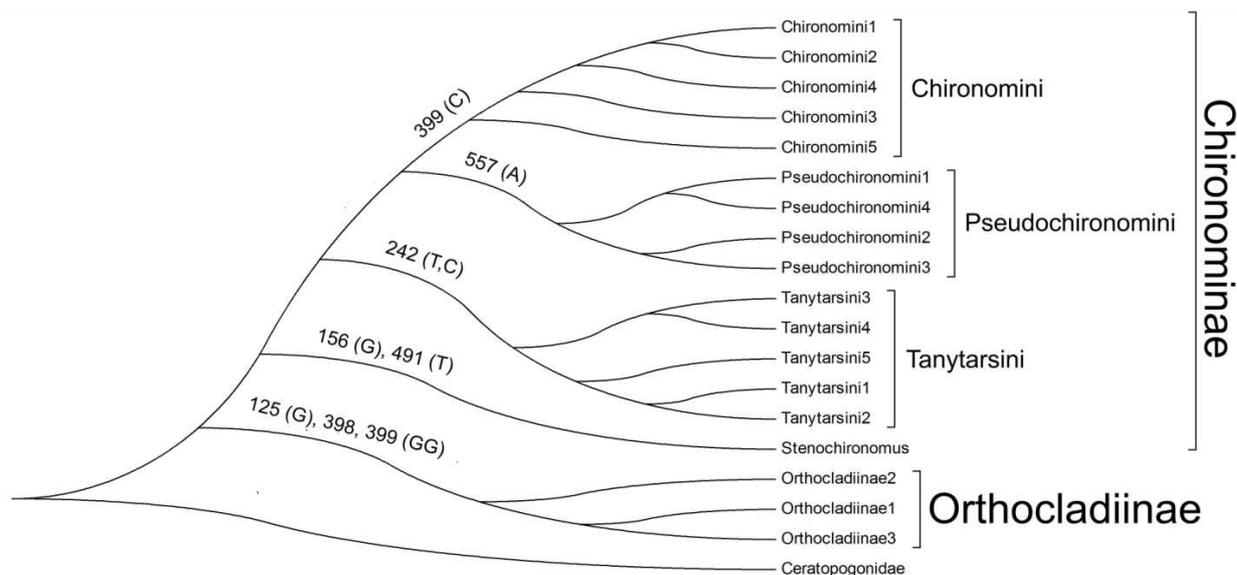
### Эволюционно значимые структурные изменения гена *COI* у комаров-звонцов подсемейства Chironominae

Полученные схемы эволюции гена *COI* комаров-звонцов указывают на существование четырех его эволюционных линий в подсемействе Chironominae (рис. 2): первая линия соответствует родам трибы Tanytarsini (=Tanytarsini), вторая – трибе Pseudochironomini (=Pseudochironomini–*Riethia*+*Endochironomus*+*Synendotendipes*+*Polypedilum*+*Sergentia*), третья – трибе Chironomini (=Chironomini–*Stenochironomus*–*Endochironomus*–*Synendotendipes*–*Polypedilum*+*Riethia*). Четвертая линия, соответствующая *Stenochironomus*, значительно обособлена от трех остальных и возможно представляет собой линию отдельного подсемейства.

Для выявления связи структурных изменений гена *COI* с эволюцией комаров-звонцов подсемейства Chironominae, нами был выполнен поиск нуклеотидных сайтов, несинонимичные замены в которых были бы уникальны для каждой или нескольких из эволюционных линий. Так же в анализ для выявления в рассматриваемых сайтах предковых нуклеотидов Chironominae, были включены эволюционные линии *COI*, соответствующие Orthoclaadiinae и Ceratopogonidae+Acrotridae. Для поиска триплетов, в

которых произошли такие замены, все рассматриваемые последовательности нуклеотидов гена *COI* были транслированы. Длина исследуемого участка аминокислотной последовательности, кодируемой геном *COI*, составила 178 а.к. Выявлено 9 аминокислотных сайтов, соответствующих 9 триплетам или 11 нуклеотидным сайтам, в которых имелись несинонимичные замены, уникальные для рассматриваемой ветви или группы ветвей.

С использованием методов МЕ и МР была получена схема, отображающая преобразование последовательности *COI* только в переменных сайтах 9 выявленных триплетов (рис. 3).

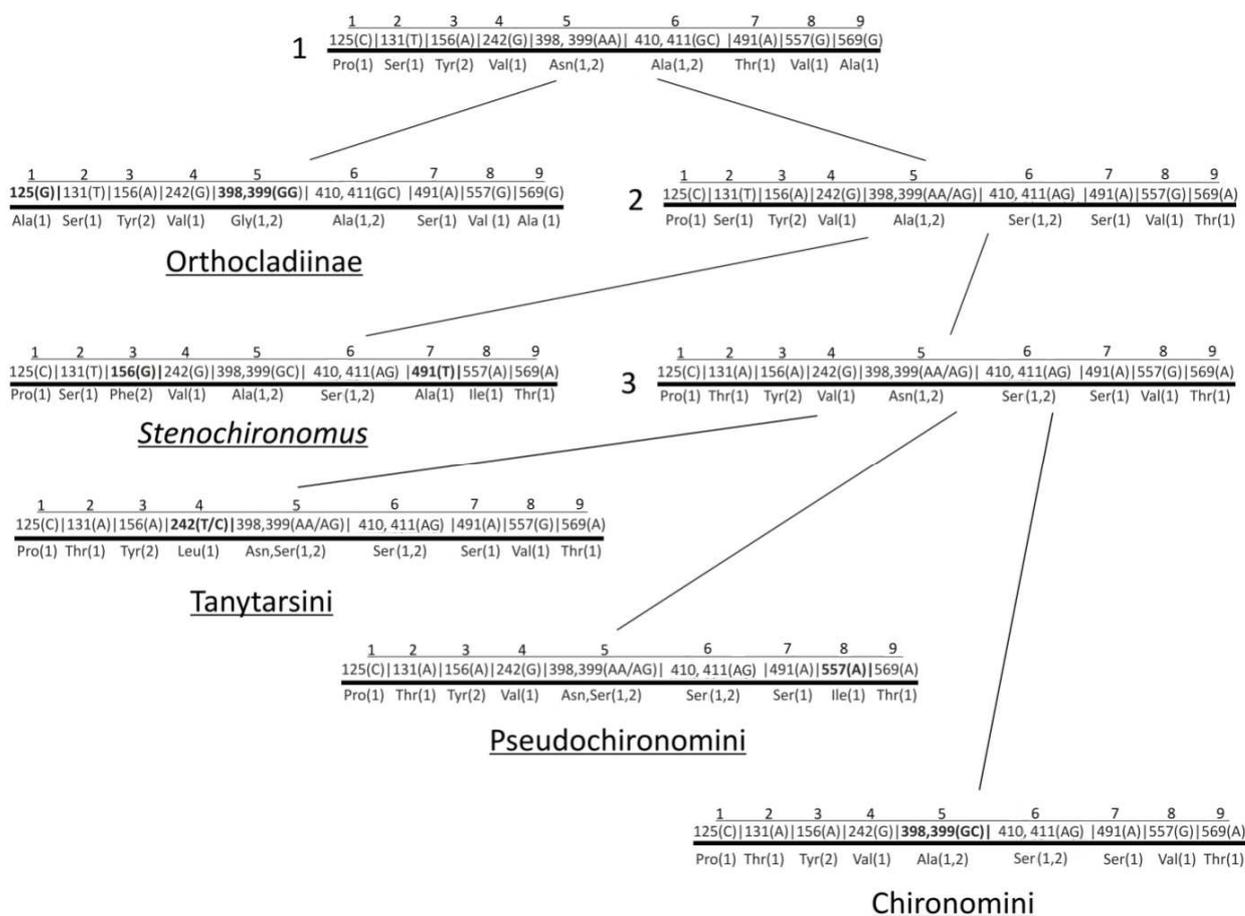


**Рис. 19.** Схема эволюции гена *COI*, основанная на сайтах, содержащих несинонимичные замены, уникальные для эволюционных линий комаров-звонцов подсемейства Chironominae

Цифрами указаны положения нуклеотидных сайтов относительно старт-кодона гена *COI*, латинскими буквами в скобках – соответствующие сайту нуклеотиды.

Для каждой из эволюционных линий найдены все варианты сочетания 9 триплетов в последовательности гена *COI*. В линии Chironomini таких вариантов выявлено 5, в линии Pseudochironomini - 4, в линии Tanytarsini - 5, в линии Orthoclaadiinae - 3, линии Ceratopogonidae+Acroceridae представлял один вариант. Схема подтвердила разделение последовательности нуклеотидов гена *COI* комаров-звонцов на 4 эволюционные линии, идентичные полученным ранее на основе всех 535 нуклеотидных сайтов. Каждую из эволюционных линий маркируют один или несколько сайтов с уникальными нуклеотидными заменами.

Для более детального анализа структурных преобразований выявленных сайтов была составлена схема их эволюции в пределах последовательности *COI* (рис. 4).



**Рис. 4.** Эволюционные изменения 11 значимых нуклеотидных сайтов в последовательности гена *COI* комаров-звонцов подсемейства Chironominae

Горизонтальной жирной чертой показана последовательность нуклеотидов 11 сайтов. Над жирной чертой приведены номера нуклеотидных сайтов относительно первого положения старт-кодона и латинские буквы, обозначающие нуклеотид – (G) или несколько вариантов нуклеотидов (T/C). Тонкой чертой подчеркнуты порядковые номера 9 триплетов. Номера и латинские буквы, отмеченные жирным выделением, обозначают уникальные нуклеотидные замены, свойственные только для последовательности *COI* конкретной эволюционной линии. Под жирной чертой, напротив порядковых номеров триплетов указаны соответствующие им аминокислоты. В скобках рядом с каждой аминокислотой указано положение варибельного нуклеотида в кодоне. Цифрами 1, 2, 3 обозначены гипотетические предковые сочетания нуклеотидов рассматриваемых 11 сайтов: 1 – подсемейств Orthoclaadiinae и Chironominae, 2 – Chironominae и *Stenochironomus gibbus*, 3 – трех триб подсемейства Chironominae.

Из 11 рассмотренных нуклеотидных сайтов только в 7 (3% от 254 варибельных сайтов) наблюдаемые несинонимичные замены приводят к изменению класса аминокислоты и, соответственно, потенциально способны повлиять на пространственную организацию пептида. Такие изменения затрагивают всего 5 триплетов (10% от 52 варибельных сайтов) из 9 отобранных и 178 рассматривавшихся первоначально:

1) 125 позиция – замена нуклеотида С на G (пролин - аланин) могла способствовать обособлению ветви Orthoclaadiinae от остальных хирономид;

2) 398, 399 позиции – замена нуклеотидов AA на GG (аспарагин - глицин) могла способствовать обособлению Orthoclaadiinae от общего с Chironominae предка. Замена нуклеотидов AA на GC (аспарагин - аланин) могла способствовать обособлению *Stenochironomus* от общего с остальными Chironominae предка. Позднее в эволюционной ветви Chironominae эта же замена или замена AG – GC (серин - аланин) могла привести к обособлению Chironomini от Pseudochironomini и Tanytarsini;

3) 410, 411 позиции – замена нуклеотидов GC на AG (аланин - серин) могла способствовать обособлению общего предка *Stenochironomus* и Chironominae от остальных хирономид;

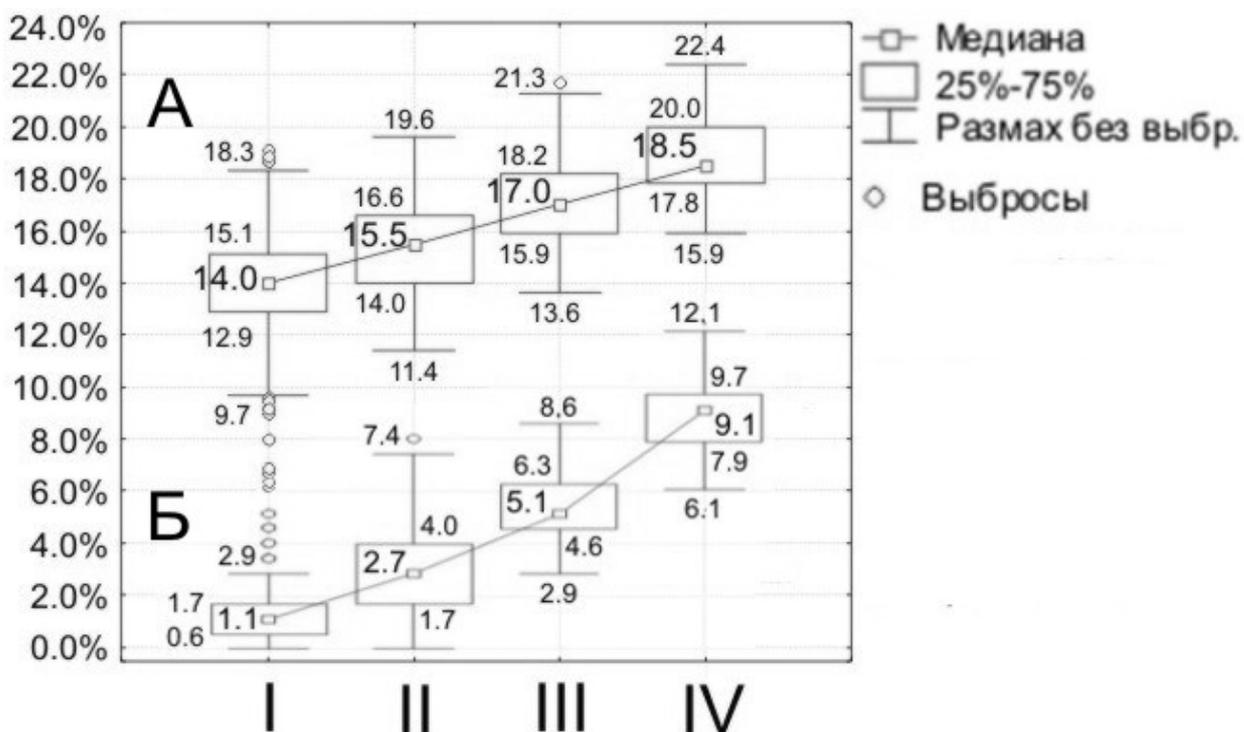
4) 491 позиция – замена нуклеотида A на G (серин – аланин) могла привести к обособлению *Stenochironomus* от остальных хирономид;

5) 569 позиция – замена нуклеотида A на G (треонин – аланин) могла привести к обособлению общего предка Chironominae и *Stenochironomus* от Orthoclaadiinae.

Можно заключить, что именно перечисленные сайты на участке 5'-концевого фрагмента последовательности гена *COI* с 100 по 634 п.н. являются эволюционно значимыми, изменения в них не только маркируют эволюцию хирономид, но и потенциально способны привести к изменению в структуре и функциональных особенностях *COI*. В пределах рассматриваемого фрагмента гена *COI* в 97% вариабельных нуклеотидных сайтов наблюдаются эволюционно нейтральные замены.

Соответственно, в пределах аминокислотной последовательности, кодируемой фрагментом гена *COI*, в 90% вариабельных аминокислотных сайтах наблюдаемые замены так же являются эволюционно нейтральными. Можно полагать, что эволюция аминокислотной последовательности, кодируемой 5'-концевым фрагментом гена *COI*, у комаров-звонцов в целом носит почти нейтральный характер, что делает возможным ее использование в качестве филогенетического маркера в пределах подсемейства Chironominae. Данное заключение подтверждается результатами Tajima-теста, не опровергающими равенство относительных скоростей эволюции аминокислотной последовательности *COI* во всех филогенетических линиях Chironominae.

Оценка аминокислотной и нуклеотидной изменчивости между парами видов одного рода, разных родов одной трибы, разных триб и разных подсемейств (рис. 5) показала, что вариабельность аминокислотной последовательности лучше отражает границы рода, трибы и подсемейства. С наибольшей достоверностью  $\geq 75\%$ , выявляемой по межквартильному размаху, пара сравниваемых видов принадлежит одному роду, если уровень аминокислотной дивергенции  $< 1.7\%$ ; – одной трибе в пределах от 1.7 до 4.0%; разным трибам в пределах от 4.6 до 6.3%; разным подсемействам  $> 7.9$ . Полученные диапазоны могут быть использованы как таксономический критерий рода и трибы в подсемействе Chironominae.



**Рис. 5.** Нуклеотидная (А) и аминокислотная (Б) изменчивость *COI* между парами видов комаров-звонцов различного таксономического ранга

I – виды одного рода (866 набл.); II – виды родов одной трибы (198 набл.); III – виды разных триб (180 набл.); IV – виды разных подсемейств (55 набл.).

Таким образом, для реконструкции эволюционных событий в подсемействе *Chironominae* возможно использовать схему, отображающую эволюцию аминокислотной последовательности, кодируемой 5'-концевым участком гена *COI*. Для проверки данного предположения нами были получены схемы эволюции аминокислотной последовательности, кодируемой геном *COI*, комаров-звонцов подсемейства *Chironominae*.

### **Молекулярная филогения и время дивергенции комаров-звонцов подсемейства *Chironominae*, основанные на аминокислотной последовательности, кодируемой геном *COI***

Из использованных дистантных методов (NJ, ME, UPGMA) наибольшую поддержку получила дендрограмма, построенная методом ME. В качестве модели замещения аминокислот использовался алгоритм Position correction. Из дискретных методов (MP, ML, Bayes), наибольшую поддержку получила топология Bayes-дендрограммы. Параметры Markov Chain Monte Carlo (MCMC): 1000000 генераций, отбор дерева проводился через каждые 100 генераций, эволюционная модель - JTT. Топология полученных дендрограмм в целом была идентичной, в основных узлах имела высокую поддержку и на уровне макросистематики (триб, подсемейств) подтверждалась результатами построений, основанных на нуклеотидной последовательности. Дендрограммы были представлены четкими кластерами, в целом, согласующимися с современными представлениями систематиков (Wiederholm et al., 1983-1989; Макаренко, 2006) о положении

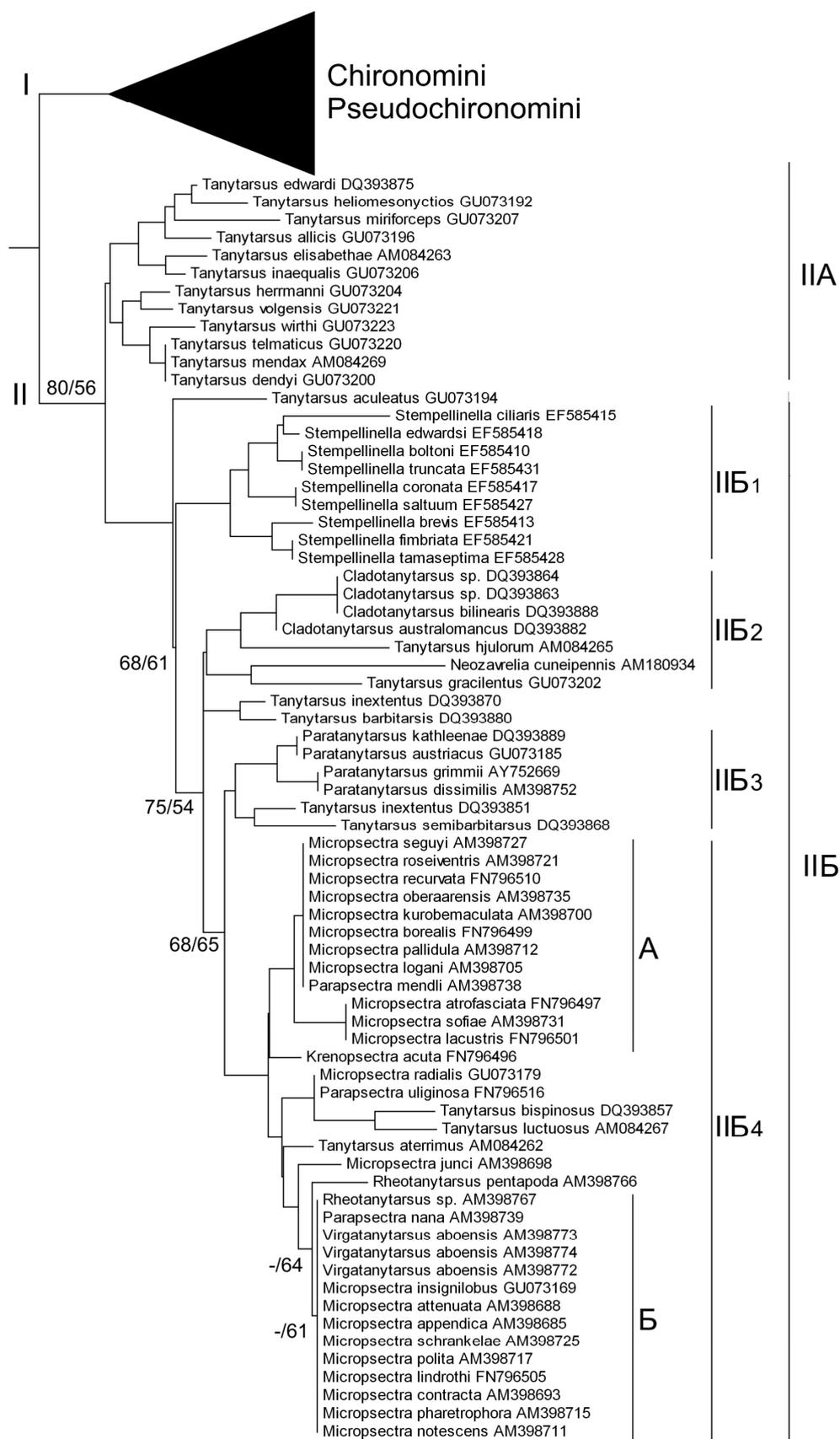
родов и триб в подсемействе Chironominae. За базовую была принята топология ME-дендрограммы, далее именуемая филограммой (рис. 6 а, б), которая использовалась в дальнейшем для описания родственных связей Chironominae. Исследованные рода содержат более 50% видового разнообразия подсемейства, поэтому выполненные построения способны достаточно адекватно отразить филогенетическую структуру Chironominae.

Для установления возраста основных таксонов подсемейства Chironominae так же использовалась частичная аминокислотная последовательность (178 а.к.), кодируемая геном *COI*. Для этого была получена хронограмма, отображавшая время дивергенции 53 представителей 28 родов подсемейства. Расчет времени дивергенции проводился с использованием модели байесовских некоррелированных логарифмически нормальных релаксированных молекулярных часов. Для генерации деревьев использовалась эволюционная модель JTT+I+G (с учетом 4 гамма-категорий) совместно с Yule-моделью процесса ветвления. Параметры МСМС: генерировали 10 миллионов марковских цепей, отбор деревьев проводился через каждую 1000 генераций. Результирующее дерево, далее называемое нами хронограммой (рис. 7), было построено на основе анализа 10000 полученных ранее деревьев за исключением первой 1000 как менее устойчивой. Тип результирующего дерева – «Maximum clade credibility». Диапазон времени дивергенции рассчитывался на основе 95% плотности апостериорного распределения. Возраст узлов хронограммы определяли по медианному значению диапазона времени дивергенции.

Схемы эволюции аминокислотной последовательности *COI* (рис. 6 а, б; 7) хорошо согласуются с данными об экологии, морфологии, цитогенетике и молекулярной генетике комаров-звонцов (Черновский, 1949; Шилова, 1976; Saether, 2000; Полуконова, 2005; Макаrenchенко, Мараченко, 2006; Ekrem et al. 2007, 2010; Cranston et al. 2010; Дурнова, 2010).

Представители Chironominae и Ortoclaadiinae образуют обособленные кластеры, что согласуется с морфологической филограммой Сезера (Saether, 2000). Время формирования этих подсемейств – приблизительно 104 млн. л.н. (конец раннего мела) (рис. 7) совпадает с датировками Кренстона с соавторами (Cranston et al., 2010) - около 105 млн. л.н., основанными на ДНК-последовательностях ядерных генов (*18S*, *28S*, *CAD*) и гене *COI*, а так же подтверждается палеонтологическими данными о появлении Chironominae в поздне меловых отложениях (Калугина, Жерихин, 1975).





**Рис. 6.** Филограмма подсемейства Chironominae  
**б.** Фрагмент филограммы, демонстрирующий положение родов трибы Tanytarsini  
В узлах приведены значения поддержки - Bayes/ME. Вертикальными линиями отмечены кластеры родов.

*Stenochironomus* формирует ветвь, уклоняющуюся от Chironominae и Ortoclaadiinae, что совпадает с нашей реконструкцией, основанной на ДНК-последовательности гена *COII* (Дурнова и др., 2011, в печати). По морфологическим и кариотипическим признакам виды *Stenochironomus* сильно отличаются от других представителей Chironominae (Панкратова, 1983). Особенностью организации их политенных хромосом является слабая степень политении (Дурнова, 2010), характерная для примитивных подсемейств комаров-звонцов, таких, как Tanypodinae (Белянина, 1983).

Рода триб Chironomini и Tanytarsini заметно отличаются как по морфологии, так и особенностям экологии (Шилова, 1976), в связи с чем, их разделение в самостоятельные ветви, произошедшее около 85 млн. л.н. (6 а, б; 7), выглядит вполне предсказуемым.

Ветви триб Chironomini и Pseudochironomini разделились примерно 66 млн. л.н., что подтверждается проведенной Кренстоном с соавторами (Cranston, et al., 2010) оценкой времени дивергенции эволюционных линий *Riethia sp.* (Chironomini) и *Polypedilum prasiogaster* (Pseudochironomini), составляющей около 62 млн. л.н.

*Chironomus*, *Einfeldia*, *Camptochironomus*, *Benthalia* и *Baeotendipes* формируют монофилетическую ветвь в составе трибы Chironomini. Представители данных родов очень сходны по морфологии личинок, куколок и имаго (Шилова, 1976; Панкратова, 1983), их политенные хромосомы обладают гомологией, образуя общие цитологические комплексы (Шобанов и др., 1996), что не свойственно другим родам Chironomini. Эволюционная близость данных родов, показанная нами на основе гена *COI*, вполне согласуется с мнениями ряда авторов. Так, ранее обсуждалось выделение этих родов в отдельную подтрибу (Полуконова, 2005) или их включение в качестве подродов в состав рода *Chironomus* (Martin, 2010).

Обособление таких широко распространенных родов трибы Chironomini, как *Chironomus*, *Baeotendipes*, *Dicrotendipes*, *Glyptotendipes*, по нашему мнению, происходило не ранее 25-30 млн. л.н. Формирование водных энтомофаун современного типа, по данным Калугиной и Жерихина (1976), началось 24 млн. л.н. и проходило на фоне ускоренного эвтрофирования водоемов.

*Xenochironomus xenolabis*, обособившийся примерно 37 млн. л.н., представляет эволюционную линию, уклоняющуюся от других видов Chironomini, что согласуется со способом питания и образом жизни его личинок, паразитирующих внутри пресноводных губок (Панкратова, 1983), в отличие от остальных хирономид-фильтраторов и, реже, факультативных хищников.

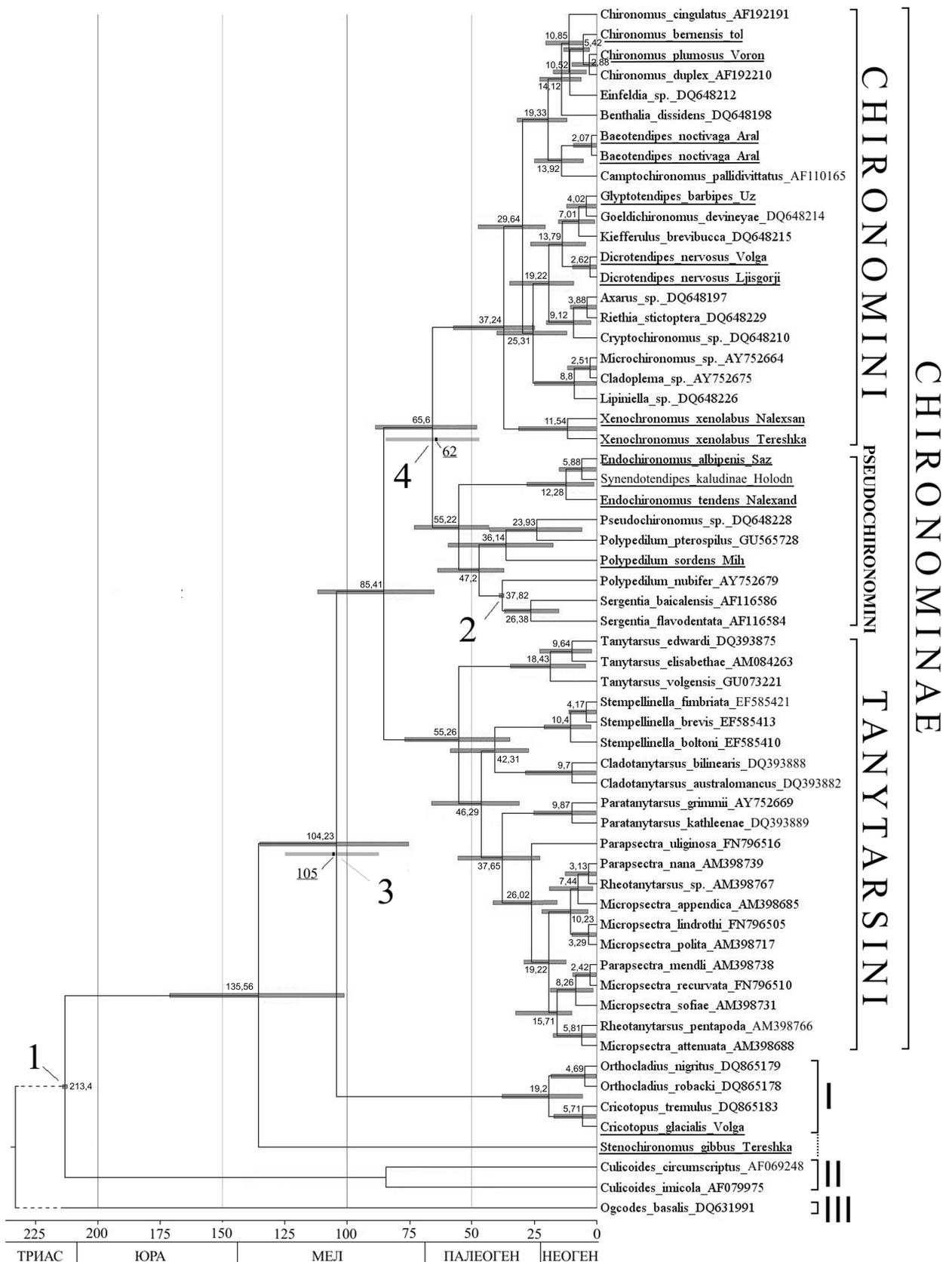


Рис. 7. Хронограмма подсемейства Chironominae, основанная на аминокислотной последовательности, кодируемой геном *COI*

Пояснения к рис. 7. Сиквенсы гена *COI* подчеркнутых таксонов получены автором лично. В узлах хронограммы арабскими цифрами обозначено среднее значение времени дивергенции млн. л., серыми линиями – диапазон времени дивергенции. На шкале обозначено время в млн. л. и геологические периоды. I – Orthoclaadiinae; II – Ceratopogonidae; III – Acroceridae. 1 – время дивергенции семейств Chironomidae и Ceratopogonidae по Бертоне (Bertone, 2008); 2 – время дивергенции рода *Sergentia* по Папушевой с соавторами (Papoucheva et al., 2003); 3 – среднее значение и диапазон времени дивергенции подсемейств Orthoclaadiinae и Chironominae по Кренстону с соавторами (Cranston et al., 2010); 4 - среднее значение и диапазон времени дивергенции *Riethia sp.* и *Polypedilum prasiogaster* по Кренстону с соавторами (Cranston et al., 2010).

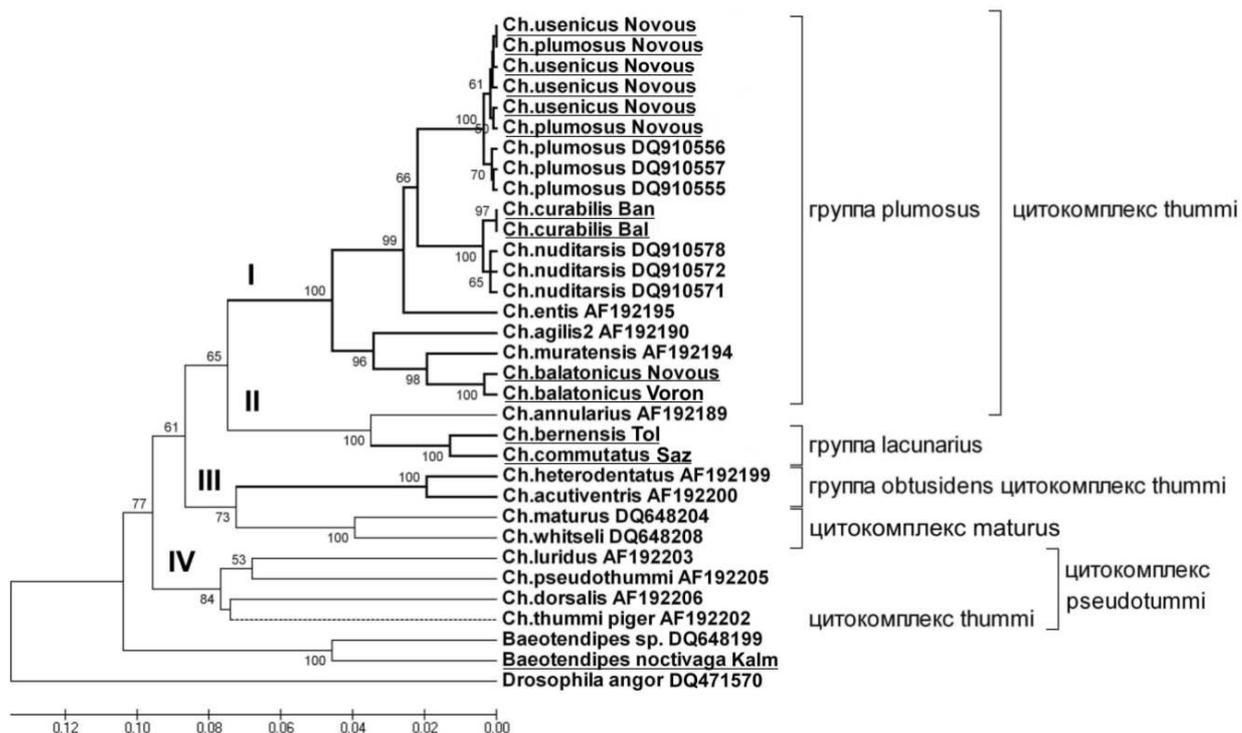
Виды *Endochironomus*, *Synendotendipes*, *Sergentia*, *Polypedilum*, *Pseudochironomus* образуют обособленную ветвь, занимающую промежуточное положение между исследованными нами представителями триб Chironomini и Tanytarsini. Узкие вентроментальные пластинки личинки *Pseudochironomus* (Макарченко, Макарченко, 2006) наличие макротрихий на крыльях имаго у видов *Polypedilum* и *Sergentia*, сходных с Tanytarsini (Goetghebuer, 1937), так же указывает на промежуточное эволюционное положение видов этих родов между двумя трибами.

Представители *Tanytarsus* кластеризуются с видами других родов – *Cladotanytarsus*, *Paratanytarsus*, *Micropsectra*, что свидетельствует о полифилетичности рода *Tanytarsus*, на которую указывал Черновский (1949), рассматривавший три ныне отдельных рода: *Corynocera*, *Cladotanytarsus*, *Paratanytarsus* как подрода рода *Tanytarsus*.

Топология филограммы подсемейства, полученная нами на основании анализа аминокислотных последовательностей, кодируемых участком гена *COI*, в основном хорошо согласуется с результатами исследования видов *Micropsectra* и близких родов *Krenopsectra*, *Parapsectra* и *Paratanytarsus* с использованием трех митохондриальных (*16S*, *COI* и *COII*) и двух ядерных (*CAD* и *Ef-1 $\alpha$* ) генов, проведенного Экремом и соавторами (Ekrem et al., 2010). В этой работе, также как и у нас, подтверждается парафилетичность рода *Micropsectra* по отношению к *Krenopsectra acuta* и 5 видам *Parapsectra*. Монофилетичность рода *Paratanytarsus* выявляется только при включении в анализ высоко консервативного ядерного гена *CAD*, в то время, как использование ДНК-последовательности *COI* не позволяет выделить этот род в отдельный кластер (Ekrem et al., 2010). В этом случае филогенетический сигнал, полученный нами с использованием аминокислотной последовательности, кодируемой геном *COI*, оказывается столь же информативным как сигнал, получаемый от последовательности ядерного гена *CAD*, что подтверждает обоснованность использования аминокислотной последовательности широко применяемого в настоящее время «баркодингового гена» - *COI* при филогенетическом анализе надродового уровня.

## Применение ДНК-последовательности гена *COI* для анализа таксонов родового уровня с высоким видовым разнообразием, на примере *Chironomus*

ДНК-дендрограмма, описывающая родственные связи исследованных видов *Chironomus* из групп видов-двойников (*plumosus*, *obtusidens* и *lacunarius*), группы близкородственных видов *nuditarsis* и хорошо морфологически различающихся видов из цитоконплексов *thummi*, *pseudothummi*, *lacunarius*, *commutatus*, *maturus* была получена методом UPGMA с использованием эволюционной модели MCL (рис. 8).



**Рис. 8.** ДНК-дендрограмма родственных связей *Chironomus*, построенная по гену *COI*

Сиквенсы гена *COI* подчеркнутых таксонов получены автором лично. Арабскими цифрами обозначены значения бутстреп-поддержки в узлах дендрограммы, римскими - кластеры видов, квадратными скобками обозначены группы видов и цитоконплексы.

Полученные данные в целом свидетельствуют о наличии положительной корреляции между эволюционными ветвями ДНК-последовательности *COI* и такими несистематическими единицами, как цитологические комплексы (рис. 8), что подтверждает возможность использования *COI* для реконструкции филогении и уточнения систематики в таксономических группах с высоким видовым разнообразием. Цитоконплекс *thummi*, по-видимому, является базовым для всех других цитоконплексов. Виды *thummi*-комплекса встречаются во всех эволюционных линиях рассматриваемой дендрограммы.

Виды-двойники группы *plumosus* и близкородственные виды - *Ch. curabilis* и *Ch. nuditarsis* на дендрограмме имеют общую эволюционную

линию. Полученные результаты позволяют рассматривать группу *plumosus* в более широком понимании с включением в ее состав не только морфологических видов-двойников, но и близких по цитогенетическим и молекулярно-генетическим показателям видов.

Таким образом, генетические дистанции, рассчитанные с использованием ДНК-последовательности *COI*, позволяют проводить ревизию существующих нетаксономических группировок видов в пределах рода, выделяемых по признакам кариотипа или морфологии.

### Выводы:

1. Впервые установлена последовательность нуклеотидов 5'-концевого фрагмента гена *COI* протяженностью с 100 по 634 п.н. у 14 видов комаров-звонцов: *Baeotendipes noctivaga*, *Glyptotendipes imbecillis*, *Glyptotendipes glaucus*, *Glyptotendipes gripekoveni*, *Glyptotendipes mancurianum*, *Xenochironomus xenolabis*, *Chironomus curabilis*, *Chironomus usenicus*, *Endochironomus tendens*, *Endochironomus albipennis*, *Synendotendipes kaluginae*, *Polypedilum sordens*, *Stenochironomus gibbus*, *Cricotopus glacialis*.

2. Выявлены особенности эволюционной изменчивости 5'-концевого фрагмента гена *COI* в подсемействе Chironominae. Показано, что в 97% переменных нуклеотидных сайтов этого гена наблюдаются эволюционно нейтральные замены. Установлено, что уровень аминокислотной изменчивости лучше нуклеотидной отображает молекулярные границы рода, трибы и подсемейства.

3. Реконструирована схема эволюции нуклеотидной и аминокислотной последовательностей первой субъединицы цитохром С оксидазы комаров-звонцов подсемейства Chironominae. Показано существование четырех эволюционных линий гена *COI*, соответствующих трибам Tanytarsini (=Tanytarsini), Pseudochironomini (=Pseudochironomini – *Riethia* + *Endochironomus*+*Synendotendipes*+*Polypedilum*+*Sergentia*) и Chironomini (=Chironomini – *Stenochironomus*–*Endochironomus*–*Synendotendipes*–*Sergentia* –*Polypedilum*+*Riethia*). Четвертая линия, соответствующая *Stenochironomus*, значительно обособлена от трех остальных и возможно представляет собой линию отдельного подсемейства.

4. Дана оценка информативности филогенетического сигнала, полученного при использовании нуклеотидной и аминокислотной последовательностей первой субъединицы цитохром С оксидазы у Chironominae. Показано, что использование аминокислотной последовательности позволяет точнее нуклеотидной дифференцировать друг от друга виды разных родов и определять положение таксонов надродового уровня.

5. На основе анализа эволюционной изменчивости аминокислотной последовательности, кодируемой геном *COI*, дана датировка эволюционных событий и получена хронограмма подсемейства Chironominae. Показано, что дивергенция *Stenochironomus gibbus* происходила вместе с предковой формой

Chironominae и Orthoclaadiinae приблизительно 135 млн. л.н. в начале мелового периода; время дивергенции трибы Tanytarsini от Chironomini и Pseudochironomini составляет около 85 млн. л.н., а трибы Chironomini от Pseudochironomini - около 66 млн. л.н.

### СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Демин А.Г., Полуконова Н.В. Изученность нуклеотидных последовательностей ядерных и митохондриальных генов хирономид (Chironomidae, Diptera) и основные подходы их использования в эволюционном анализе // сб. науч. тр. XXI Любимцевских чтений «Современные проблемы эволюции». Ульяновск: Ульяновский гос. пед. ун. 2007. С. 157-168.

2. Полуконова Н.В., Ермохин М.В., Воронин М.Ю., Демин А.Г., Катаева И.В., Фёдорова И.А., Козлов М.С. Биологический мониторинг водных экосистем на основе анализа сообществ, популяций, кариотипа и мтДНК хирономид (Chironomidae, Diptera) // Изв. Саратов. ун-та. Сер. биол. 2007. С. 71-78.

3. Полуконова Н.В., Демин А.Г., Катаева И.В., Федорова И.А. Анализ сообществ, популяций и генома хирономид (Diptera) в биомониторинге гидроэкосистем // Тез. 9-й конф. (сессии стендовых сообщений) «Водные экосистемы, организмы, инновации». МГУ, 26 октября 2007. М.: МГУ. 2007. С. 43.

4. Демин А.Г., Полуконова Н.В. Изменчивость митохондриального гена *COX I* у европейских видов *Chironomus* и *Camptochironomus* (Chironomidae, Diptera) // Тез. XIII Междунар. шк.-конф. молодых учёных «Биология внутренних вод». Ин-т. биол. внутр. вод РАН, 23–26 октября 2007 г. Борок. 2007. С. 57.

5. Демин А.Г., Полуконова Н.В. Изменчивость митохондриального гена *COX I* у европейских видов *Chironomus* и *Camptochironomus* (Chironomidae, Diptera) // сб. науч. тр. XIII Междунар. шк.-конф. молодых учёных «Биология внутренних вод». (Ин-т. биол. внутр. вод РАН, 23–26 октября 2007 г.). Борок. С. 64-69.

6. Полуконова Н.В., Мюге Н.С., Демин А.Г., Воронин М.Ю. Сравнение морфологических и цитогенетических методов с молекулярно-генетическими при построении филогении комаров-звонцов (Chironomidae, Diptera) // Проблемы и перспективы общей энтомологии. Тез. докладов XIII съезда Рус. энтомол. о-ва. Краснодар, 9-15 сентября 2007 г. Краснодар.: АРС. 2007. С. 107.

7. Демин А.Г. Популяционная и межвидовая изменчивость вариабельных локусов ядерного гена *globin 2b* у *Chironomus* и *Camptochironomus* (Chironomidae, Diptera) // Тезисы Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва, 11-14 апреля 2007 г. М.: МГУ. 2007. С. 42.

8. **Демин А.Г.**, Полуконова Н.В. Новые данные по молекулярной филогении комаров-звонцов (Chironomidae, Nematocera) подсемейства Chironominae на основе генов мтДНК // Ставрополь.: АГРУС. 2008. С. 248-253.
9. **Демин А.Г.**, Полуконова Н.В. Оценка времени дивергенции комаров-звонцов рода *Chironomus* (Diptera) на основе гипотезы «молекулярных часов» // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье: сб. науч. тр. Саратов: изд-во Саратов. ун-та. 2008. №7. С. 8-13.
10. Полуконова Н.В., **Демин А.Г.**, Шайкевич Е.В., Мюге Н.С. Сравнение *Chironomus usenicus* и *Ch. curabilis* с видами группы plumosus (Diptera) по гену митохондриальной днк *COI* и рисунку дисков политенных хромосом // Генетика. 2009. Т. 45, №8. С. 1-7. Polukonova N.V., **Djomin A.G.**, Muge N.S., Shaikевич E.V. Comparison of *Chironomus usenicus* and *Chironomus curabilis* with Species of the Group plumosus (Diptera) Inferred from the Mitochondrial DNA Gene *COI* and Polytene Chromosomes Banding Pattern // Russian Journal of Genetics. 2009. Vol. 45, № 8. P. 899-905.
11. Демина И.В., Ермохин М.В., **Демин А.Г.** Имагоуловитель для количественного вылета гетеротопных насекомых на границе «земля-воздух» в стоячих водоемах // Поволж. экол. журн. 2009. №1. С. 65 – 68.
12. **Демин А.Г.** Новые данные о молекулярной филогении комаров-звонцов (Chironomidae, Nematocera) // Материалы ежегод. науч. конф. студентов и аспирантов СГУ. Изд-во Саратов. ун-та. 2009. С. 13 – 14.
13. Полуконова Н.В., Демина И.В., **Демин А.Г.**, Кармоков М.Х., Федорова И.А. Возможности и перспективы использования комаров-звонцов (Chironomidae, Diptera) при комплексном подходе в биологическом мониторинге водных экосистем и токсикологических исследования // Материалы IV всероссийского симпозиума по амфибиотическим насекомым и X трихoptерологического симпозиума «Проблемы водной энтомологии России и сопредельных государств». Владикавказ.: СОГУ. 2010. С. 69-73.
14. Полуконова Н.В., **Демин А.Г.** Результаты комплексного анализа видов *Chironomus* группы obtusidens (Diptera, Nematocera) на основе морфологии, кариотипа и молекулярно-генетических данных. Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье: Сб. науч. тр. Саратов.: Изд-во Саратов. ун-та. №8. 2010. С. 8-13.
15. Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., **Демин А.Г.** Направленная эволюция личинок хирономид (Diptera) на основе анализа политенных хромосом и частичной аминокислотной последовательности первой субъединицы цитохром С оксидазы (*COI*) // Тез. V междунар. науч. конф. по кариосистематике беспозвоночных животных «Caruo V». Новосибирск, 16-20 августа 2010 г. Новосибирск. 2010. С. 42.
16. **Демин А.Г.**, Полуконова Н.В., Мюге Н.С. Молекулярная филогения комаров-звонцов подсемейства Chironominae по данным анализа цитохром С оксидазы I (*COI*) // Биология внутренних вод: тез. докладов XIV

Шк.-конф. молодых ученых (Ин-т. биол. внутр. вод РАН, 26-30 октября 2010 г.). Борок. 2010. С. 18.

17. Полуконова Н.В., Демин А.Г. Систематика комаров-звонцов подсемейства Chironominae (Diptera) в свете данных об эволюции их аминокислотной последовательности первой субъединицы цитохром С оксидазы (*COI*) // Материалы Междунар. науч. конф. «Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке». Санкт-Петербург, 16-20 мая 2011 г. Санкт-Петербург. 2011. С. 130.

18. Демин А.Г., Полуконова Н.В., Мюге Н.С. Молекулярная филогения и время дивергенции комаров-звонцов (Chironomidae, Nematocera, Diptera) на основе частичной последовательности гена первой субъединицы цитохром с оксидазы (*COI*) // Генетика. 2011. Т.47, №10. С. 31–43. **Demin A.G.**, Polukonova N.V., Mugue N.S. Molecular Phylogeny and the Time of Divergence of Minges (Chironomidae, Nematocera, Diptera) Inferred from a Partial Nucleotide Sequence of the Cytochrome Oxidase I Gene (*COI*) // Russian Journal of Genetics. 2011. Vol. 47, № 10. P. 1168–1180.