

ВОРОНОВА Н.В., РИЗЕВСКИЙ С.В., КУРЧЕНКО В.П., БУГА С.В.

Белорусский государственный университет

Беларусь, 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4, e-mail: voronoff@list.ru

ОЦЕНКА УРОВНЯ НАСЫЩЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ I ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ С У ТЛЕЙ (*HEMIPTERA: STERNORRHYNCHA: APHIDOIDEA*) КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ВОЗРАСТА ТАКСОНОВ

Эволюционные математические модели, используемые для установления филогенетических взаимоотношений таксонов, базируются на оценке качества и количества нуклеотидных замен, наблюдаемых в сравниваемых последовательностях ортологичных генов [1]. Современные алгоритмы сравнения учитывают эмпирически выявляемые различия в частотах отдельных транзиций и трансверсий, позицию в кодоне, в которой произошла замена, а так же, отчасти, функцию анализируемой последовательности, поскольку давление отбора на разные структурные части генома также различно [2]. Это оптимизирует методы расчета генетических дистанций, повышая их точность. Тем не менее, в ситуациях, когда для анализа использован ген, находящийся под действием строго функционального ограничения (то есть с высоким уровнем элиминации мутантов), а сравниваемые таксоны многочисленны, исследователи сталкиваются с развитием так называемого эффекта насыщения последовательности ДНК.

Насыщение последовательности ДНК представляет собой вырождение филогенетического сигнала в конкретном гене, обусловленное тем, что аминокислотная последовательность, кодируемая этим геном, максимально консервативна. Количество и характер нуклеотидных замен, возможных в подобном участке генома, строго ограничиваются необходимостью сохранения функциональной активности кодируемого белка. Существование ограничений такого рода приводит к тому, что через некое эволюционное расстояние нуклеотиды в варибельных локусах начнут повторяться, экранируя ранее произошедшие замены, и, таким образом, исключая из

анализа ряды эволюционных событий, произошедших в конкретном локусе [3]. Косвенно формирование эффекта насыщения последовательности ДНК можно установить по преобладанию количества наблюдаемых трансверсий над количеством транзиций [4]. Поскольку у близких таксонов соотношение транзиций и трансверсий в последовательности генов обычно варьирует от 5 до 30, его смещение в сторону преобладания числа трансверсий, часто наблюдаемое при сравнении последовательностей далеких таксонов, может быть только следствием экранирования произошедших ранее транзиций новыми заменами в тех же однонуклеотидных локусах.

Очевидно, что уровень насыщения последовательности высоко консервативного гена будет тем выше, чем больше время дивергенции таксонов. В связи с этим было решено установить, существует ли корреляция между уровнем насыщения гена субъединицы I цитохромоксидазы с (*COI*) и возрастом таксонов у тлей, а также оценить возможность использования данного показателя для построения хронологических дендрограмм. Поскольку ген *COI* локализуется в митохондриальном геноме, не имеет полных ядерных копий и кодирует важнейшую в функциональном отношении структурную единицу терминального комплекса дыхательной цепи, несинонимичные мутации в его последовательности чрезвычайно редки. Это ограничивает число возможных нуклеотидных замен в последовательности гена и, по нашему мнению, должно сравнительно быстро приводить к ее насыщению.

Материалы и методы

Для эволюционного анализа в общей сложности использовали последовательности *COI* 340 видов тлей надсемейства *Aphidoidea* (классификация согласно Remadier и Remadier [5]). Сборы исследуемых видов тлей произвели в 2008–2010 гг. на территории Беларуси [6]. Для выделения ДНК использовали DNA Purification Kit (Fermentas), адаптировав методику производителя специально для работы с тлями. Для по-

лучения фрагмента *COI* использовали праймеры LCO1490/HCO2198 [7]. Секвенирование продуктов осуществили на 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), с BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Обработку результатов секвенирования провели с использованием программы визуализатора Chromas Lite 2.01. Кроме того были использованы последовательности *COI*

тлей, полученные из международных баз нуклеотидных последовательностей GenBank и CBOL (табл. 1).

Программное обеспечение для проведения эволюционного анализа включало: MEGA5 (определение модели нуклеотидных замещений, расчет нуклеотидных смещений, генетических дистанций), DnaSP v5 (расчет статистических

параметров нуклеотидных последовательностей), DAMBE (расчет числа и соотношения транзиций и трансверсий, индекса насыщения нуклеотидных замещений), BioEdit (составление консенсусных нуклеотидных последовательностей), WebLogo (составление консенсусных аминокислотных последовательностей).

Таблица 1. Таксономическая структура массива данных и число выявленных гаплотипов COI-5 секции тлей надсемейства *Aphidoidea*

Подсемейства	Число проанализированных родов	Число проанализированных видов	Число выявленных гаплотипов <i>COI</i>
<i>Anoeciinae</i>	1	1	1
<i>Aphidinae</i>	6	233	223
<i>Calaphidinae</i>	17	20	20
<i>Chaitophorinae</i>	2	6	6
<i>Drepanisiphinae</i>	2	4	4
<i>Eriosomatinae</i>	25	37	37
<i>Greenideinae</i>	1	2	2
<i>Hormaphidinae</i>	7	7	7
<i>Lachninae</i>	9	16	16
<i>Lizeriinae</i>	1	1	1
<i>Mindarinae</i>	1	2	2
<i>Neophyllaphidinae</i>	1	1	1
<i>Phyllaphidinae</i>	2	3	3
<i>Pterocommatinae</i>	2	5	5
<i>Saltusaphidinae</i>	3	3	3
<i>Tamaliinae</i>	1	4	4

Результаты и обсуждение

Было проведено сравнение последовательностей COI-5 региона в четырех подтрибах тлей: *Aphidina*, *Rhopalosiphina* трибы *Aphidini*, и *Macrosiphina*, *Anuraphidina* трибы *Macrosiphini* подсемейства *Aphidinae*. Во всех подтрибах число обнаруженных гаплотипов приближалось к числу анализируемых таксонов, что свидетельствует о низком внутривидовом разнообразии *COI* (табл. 2). Соотношение наблюдаемых транзиций и трансверсий очень низко во всех подтрибах. Индекс мутационного насыщения указывает на наличие незначительного насыщения ДНК.

Частота гаплотипов, близкая к единице, обеспечивает высокое постоянство аминокислотного состава белка. На уровне надсемейства в консенсусной аминокислотной последовательности COI-5 секции длиной 206 аминокислот обнаруживается только 14 переменных позиций, причем лишь по 5-ти из них перемен-

ность можно не считать крайне низкой (рис. 1).

Тестирование насыщения последовательности ДНК с использованием алгоритмов пакета DAMBE показало, что в подсемействах *Calaphidinae*, *Eriosomatinae* и *Lachninae* обнаруживается насыщение последовательности COI при приближении генетических дистанций к значению 0,1. На графике, отражающем отношение числа наблюдаемых транзиций и трансверсий к генетической дистанции между последовательностями, видно, что количество трансверсий начинает превышать количество транзиций в подсемействе *Lachninae* – при дистанции, равной 0,03, в *Eriosomatinae* – при дистанции, равной 0,08, в *Calaphidinae* – при генетической дистанции, равной 0,09. В подсемействе *Aphidinae* заметного насыщения последовательности ДНК не происходит (рис. 2).

Таблица 2. Общая характеристика последовательности COI-5 секции отдельных триб тлей подсемейства *Aphidinae*

Параметр	<i>Aphidina</i>	<i>Rhopalosiphina</i>	<i>Macrosiphina</i>	<i>Anuraphidina</i>
Число проанализированных таксонов	63	13	116	41
Число гаплотипов (Hap)	60	13	114	40
Дивергенция гаплотипов (Hd)	0,998±0,003	1,000±0,030	1,000±0,001	0,999±0,006
Модель нуклеотидных замещений	TN93+G+I	GTR+G+I	TN93+G+I	TN93+G+I
Число переменных сайтов (V)	228	155	215	183
Число парсимонично информативных сайтов	182	92	195	140
Количество транзиций (Ti), %	4,684±0,009	4,320±0,008	3,945±0,009	3,739±0,008
Количество трансверсий (Tv), %	2,469±0,007	2,951±0,012	3,168±0,011	2,512±0,112
Общее Ti/Tv смещение	2,59	2,82	2,31	2,86
Нуклеотидное разнообразие (Pi)	0,068±0,001	0,075±0,006	0,061±0,002	0,071±0,002
Коррекция Джукса-Кантора (JC-Pi)	0,0719	0,0794	0,0637	0,0747
G+T содержание, %	24,821	23,458	24,423	24,022
Индекс мутационного насыщения (Iss)	0,105	0,138	0,111	0,136
Iss/Iss.c статистика	6,831	5,347	6,468	5,294



Рис. 1. Консенсусная аминокислотная последовательность COI-5 секции тлей надсемейства *Aphidoidea*

Надсемейство *Aphidoidea* возникло 280–250 миллионов лет назад. В настоящее время полагают, что дивергенция подсемейств происходила в следующем порядке: *Lachninae*, *Eriosomatinae*, *Calaphidinae*, *Aphidinae* [8]. Как было сказано выше, степень насыщения последовательностей ДНК являются функцией эволюционного возраста таксонов. При построении кладограммы филогенетических взаимоотношений подсемейств надсемейства *Aphidoidea*, отделение ветвей на которой соответствует величине генетической дистанции, при которой обнаруживается насыщение последовательности

ДНК, подсемейства располагаются в соответствии с их эволюционным возрастом (рис. 3).

Данный факт позволяет сделать вывод о существовании корреляции между степенью насыщения последовательности *COI* и эволюционным возрастом таксонов у тлей. Таким образом, насыщение последовательности, определяемое как смещение соотношения наблюдаемых транзиций и трансверсий в сторону преобладания трансверсий, может служить косвенным показателем хронологических взаимоотношений таксонов в группе.

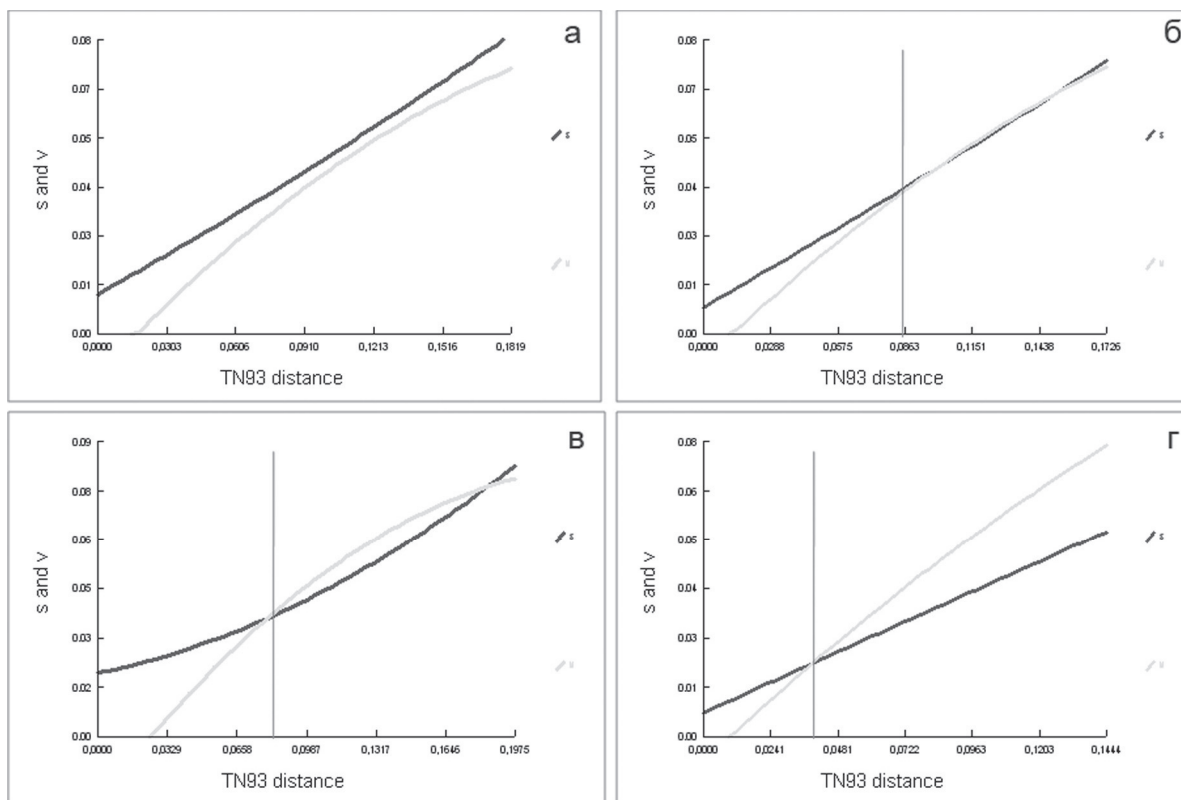


Рис. 2. Сравнительная дивергенция транзиций (s) и трансверсий (v) в COI-5 секции тлей надсемейства *Aphidoidea*: а – *Aphidinae*, б – *Calaphidinae*, в – *Eriosomatinae*, г – *Lachninae*

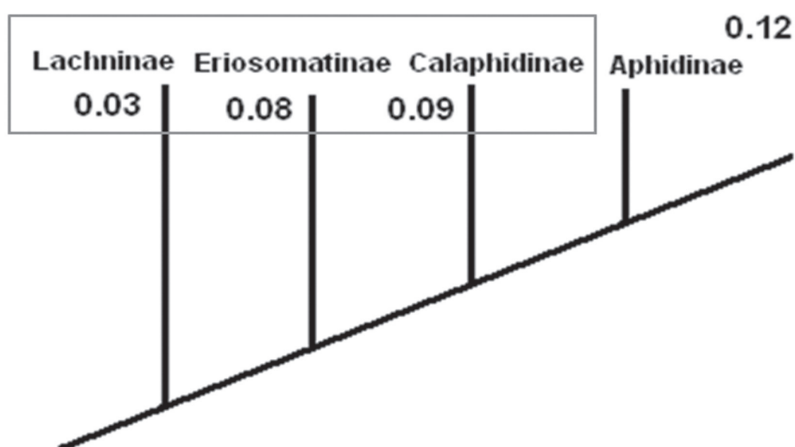


Рис. 3. Кладограмма филогенетических взаимоотношений подсемейств надсемейства *Aphidoidea*

Выводы

На основании полученных данных можно заключить, что:

1. Последовательность *COI* тлей насыщается на уровне подсемейств, что выражается в падении соотношения наблюдаемых транзиций и трансверсий.

2. Насыщение последовательности *COI* у тлей обусловлено высокой консервативностью

аминокислотной последовательности кодируемого геном белка.

3. Из изученных подсемейств наиболее высока вырожденность последовательности *COI* в подсемействах *Eriosomatinae* и *Lachninae*. Наименее – в подсемействе *Aphidinae*, что хорошо соотносится с эволюционным возрастом таксонов.

4. Насыщение последовательности, определяемое как смещение соотношения наблюдаемых транзиций и трансверсий в сторону преобладания трансверсий, может служить показателем хронологических взаимоотношений таксонов в группе.

Литература

1. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. – Oxford University Press, Oxford, 2000. – 350 p.
2. Otsuka J., Kawai Y., Sugaya N. The influence of selection on the evolutionary distance estimated from the base changes observed between homologous nucleotide sequences // *Journal of Theoretical Biology*. – 2001. – Vol. 213, Issue 2. – P. 129–144.
3. Ho S.Y.W., Phillips M.J., Cooper A., Drummond A.J. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times // *Molecular Biology and Evolution*. – 2005. – Vol. 22, №7. – P. 1561–1568.
4. Broughton R.E., Stanley S.E., Durrett R.T. Quantification of homoplasy for nucleotide transitions and transversions and a reexamination of assumptions in weighted phylogenetic analysis // *Syst. Biol.* – 2000. – Vol. 49, Issue 4. – P. 617–627.
5. Remaudière G., Remaudière M. *Catalogue of the World's Aphididae. Homoptera Aphidoidea*. – INRA Editions, Versailles, France, 1997. – 478 p.
6. Воронова Н.В., Курченко В.П., Буга С.В. Подбор молекулярно-генетических маркеров для видовой диагностики тлей и построения филогений // *Труды Белорусского государственного университета*. – 2011. – Т. 6, Ч. 1. – С. 181–192.
7. 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. – Vol. 3, №5. – P. 294–299.
8. Ortiz-Rivas B., Martínez-Torres D. Combination of molecular data support the existence of three main lineages in the phylogeny of aphids (*Hemiptera: Aphididae*) and the basal position of the subfamily *Lachninae* // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2010. – Vol. 55. – P. 305–317.

VORONOVA N.V., RIZEVSKIY S.V., KURCHENKO V.P., BUGA S.V.

Belarusian State University

Belarus, 220030, Nezavisimosti str.4, e-mail: voronoff@list.ru

ASSESSING SATURATION LEVEL ON COI GENE IN APHIDS AS A METHOD FOR DETERMINATION OF RELATIVE AGE OF TAXA

Aims. DNA saturation effect forms in evolutionary conservative genes as a result of repeated nucleotide substitutions which occur at the same variable loci. In order to find out whether there is a correlation between the level of the DNA saturation in COI gene and the age of taxa in aphids, 340 COI sequences from aphids were compared. **Methods.** Evolutionary analysis was conducted using the software: MEGA5, DnaSP v5, BioEdit, WebLogo. The DNA saturation level was determined with DAMBE as the transition/transversion ratio for pairs of sequences versus genetic distance. **Results.** It was found that the DNA saturation effect forms in subfamilies: *Lachninae* when the genetic distance is 0.03, *Eriosomatinae* when the genetic distance is 0.08, *Calaphidinae* when the genetic distance is 0.09. DNA saturation is not registered in subfamily *Aphidinae*. When constructing the subfamilies phylogenetic cladogram, the subfamilies are arranged according to their evolutionary age. **Conclusions.** DNA saturation, defined as the shift of the ratio of the observed transitions and transversions in the predominance of transversions, may serve as an indicator of the chronological relationships of taxa.

Key words: DNA saturation, transition-transversion bias, COI, aphids.