

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-14

Обзор

Маркерные последовательности ДНК для идентификации известных и выявления новых видов растений и животных

О.В. Ваулин✉, И.К. Захаров

Аннотация: В обзоре рассмотрены наиболее часто используемые для идентификации видов растений и животных ДНК-маркеры. Показаны особенности их применимости, преимущества и недостатки при изучении близких видов и для выявления межвидовых гибридов. При наибольшей популярности методов, основанных на анализе митохондриальных и хлоропластных маркеров, тем не менее существенный акцент сделан на участки генов рРНК, так как для них внутри- и межвидовая изменчивость различается более контрастно.

Ключевые слова: идентификация видов; *COI*; гены хлоропластов; межгенные спейсеры; гены рРНК.

Благодарности: Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № 0259-2021-0011.

Для цитирования: Ваулин О.В., Захаров И.К. Маркерные последовательности ДНК для идентификации известных и выявления новых видов растений и животных. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(3):119-123. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-14

Review

Marker sequences of DNA usage for identification of known species of plants and animals and search of new taxa

O.V. Vaulin✉, I.K. Zakharov

Abstract: This review is devoted to most often used DNA markers for plant and animal species identification. We considered features of their suitability, advantages and disadvantages in differentiation on close species and interspecific hybrids. Now, the most popular are methods that are based on mitochondrial and chloroplast markers, however, we made an accent to fragments of rRNA genes, because intra- and between- species diversity are more contrast for them.


Key words: species identification; *COI*; chloroplast genes; intergenic spacers; rRNA genes.

For citation: Vaulin O.V., Zakharov I.K. Marker sequences of DNA usage for identification of known species of plants and animals and search of new taxa. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(3):119-123. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-14 (in Russian)

Надежная идентификация близких видов организмов – важная прикладная задача. Такая задача актуальна, например, при оценке эпидемиологической опасности, если переносчиком заболевания является одна часть видов из группы видов-двойников, а другая часть видов этой группы в качестве переносчиков малоэффективна. Аналогичные задачи могут ставиться и при необходимости разделять сходные виды растений, различающиеся по хозяйственно ценным признакам, например содержанию биологически активных веществ. Такие задачи могут ставиться при отдаленной ги-

бридизации – одном из основных подходов для селекции растений (Колчанов и др., 2017). Можно отметить, что виды могут быть легко различимы на каких-то определенных стадиях развития, но неразличимы на других. Например, часть палеарктических видов малярийных комаров группы *Anopheles maculipennis* легко различима по окраске яиц. В то же время на стадиях личинок и имаго различия между образцами разных видов этой группы носят количественный характер (Сибатаев, Шабанова, 2007). Точно так же для растений: легко выявляемые видодиагностические признаки

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 oleg.v.vaulin@mail.ru

© Ваулин О.В., Захаров И.К., 2021

присутствуют не на всех стадиях жизненного цикла. Более того, болотные растения, в зависимости от того, растут ли они полностью под водой или же находятся в основном в воздушной среде, могут значительно менять внешний вид. Такие морфологические и анатомические вариации прослежены на примере представителей многих групп, например представителей родов *Echinodorus*, *Ludwigia* и *Helosciadium* (Costa, Forni-Martins, 2004; Billet et al., 2018; Herden, Friesen, 2019).

В связи с этим, в целях определения видовой принадлежности, актуально применение молекулярно-генетических методов. Их важная особенность состоит в независимости результатов от стадии развития организма и его физической целостности. Они также позволяют обнаружить новые виды в тех случаях, когда методы морфологического анализа мало применимы. Отметим, что для хорошо различимых видов морфологические методы намного проще и дешевле, по сравнению с многоступенчатыми молекулярно-генетическими. Данная работа представляет собой краткий обзор особенностей применимости анализа последовательности различных участков ДНК для разделения видов как растений, так и животных.

Одним из очевидных критериев подбора видодиагностических маркеров является возможность получения качественных результатов секвенирования изучаемой нуклеотидной последовательности ДНК. В этом отношении удобны участки геномов цитоплазматических органелл (митохондрий и хлоропластов), а также тандемные повторы ядерных генов рРНК. Эти участки ДНК, в связи с высоким количеством копий на клетку, легко нарабатываются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенируются. Несмотря на большую копийность, «генетическое разнообразие» внутри одного организма, как правило, не затрудняет получение качественных результатов секвенирования. Для ДНК хлоропластов и митохондрий действует механизм, приводящий к потере гетероплазмии в клетках и сходный с дрейфом генов в популяциях (Birky, 2001). Для генов рРНК высокое сходство между копиями как внутри одного организма, так и внутри вида, по-видимому, связано с процессами кроссинговера (Nei, Rooney, 2005). В ряде случаев в качестве маркерных участков для идентификации видов используют другие участки ДНК; например, для разделения видов комаров *Culex pipiens* и *C. quinquefasciatus* диагностическим считается участок гена *ace-2* (Bourguet et al., 1998).

Своеобразный «бум видодиагностики» у животных начался с анализа изменчивости митохондриального гена *COI* (субъединицы I цитохромоксидазы). Показано, что в большинстве случаев внутривидовая изменчивость ДНК по этому гену не превышает 1%, а межвидовая, как правило, более 2% (Hebert et al., 2003). Этот двухпроцентный уровень изменчивости обычно и используют как критерий видовой принадлежности. С помощью анализа последовательности *COI* находят новые криптические виды животных, например кровососущих насекомых (Hernández-Triana et al., 2012).

Высокая эффективность методов разделения видов по последовательности *COI* привела к идее использования аналогичных методов на растениях. Изменчивость митохон-

дриального гена *COI* у растений оказалась очень низкой, поэтому видодиагностика по ДНК-маркерам связана, в первую очередь, с хлоропластной ДНК. Проведенный масштабный анализ изменчивости и возможности получения качественных прочтений показал, что наиболее удачными участками являются фрагменты генов *rbcl* (большой субъединицы рибулозы 1.5 бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы) и *matK* (матуразы K) (CBOL Plant Working Group, 2009). Более изменчивые межгенные спейсеры *psbK-psbI* (между генами низкомолекулярных пептидов K и I фотосистемы II) и *trnH-psbA* (между геном гистидиновой транспортной РНК и геном полипептида D1 фотосистемы II) давали менее надежные прочтения. В ряде случаев межгенные спейсеры обогащены блоками повторяющихся одинаковых нуклеотидов, что затрудняет качественное секвенирование методом Сэнгера.

Тем не менее тестирование возможности различных участков хлоропластной ДНК разделять виды растений дает противоречивые результаты. На примере группы растений семейства кутровые (Arosupaceae) было проведено сравнение эффективности для видодиагностики участков *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA* и спейсера *trnL-trnF* (между транспортными РНК лейцина и фенилаланина). При этом продемонстрирована высокая возможность получения более качественных секвенсов для кодирующих участков ДНК, чем для межгенных спейсеров (Cabelin, Alejandro, 2016). Так, для *rbcl* и *matK* удалось получить качественные прочтения для 76.9% образцов, для спейсера *trnH-psbA* – для 69.2%, а для спейсера *trnL-trnF* – только для 53% образцов; полное разделение на конспекцифические ветви достигалось только по маркеру *matK*.

Другие авторы при тестировании участков *rbcl*, *matK* и *trnH-psbA* на пригодность для идентификации видов водных растений: представителей родов *Myriophyllum*, *Ludwigia*, *Cabomba* и семейства Hydrocharitaceae (Водокрасовые) – отметили низкую пригодность *matK* для разделения видов в связи с низкой способностью давать ПЦР-продукт для дальнейшего секвенирования, и участок *trnH-psbA* был признан наиболее эффективным для этих целей (Ghahramanzadeh et al., 2013).

Метод идентификации видов, или баркодинга по цитоплазматическим маркерам, основан на предположении, что в двух рассматриваемых группах организмов после возникновения репродуктивной изоляции под действием мутационного процесса и дрейфа генов сформировались разные наборы нуклеотидных замен. В то же время из-за гибридизаций или предкового полиморфизма такая картина изменчивости может нарушаться, приводя к невозможности разделения видов по цитоплазматическим маркерам. Яркий пример – группа видов комаров, составляющих афротропический комплекс *Anopheles gambiae*. Образцы, относящиеся к разным видам этой группы, случайным образом комбинируются на филогенетических деревьях по митохондриальной ДНК (Besansky et al., 1994). Данные полногеномного секвенирования видов этой группы указывают на обширные интрогрессии геномов (Fontaine et al., 2015). Таким образом, разделение видов по цитоплазматическим маркерам, несмотря на свою общую эффективность, во многих случаях не дает результатов.

Другая крайность состоит в разделении группы особей на отдельные, далеко разошедшиеся ветви (гаплотипы) митохондриальной ДНК, при отсутствии других причин считать носителей разных гаплотипов представителями разных видов (Шеховцов и др., 2020).

Ко второй группе маркеров, используемых для идентификации видов, относятся участки генов рРНК. Гены рРНК являются тандемными повторами и так же, как и гены хлоропластов и митохондрий, в большом количестве копий присутствуют в клетке. Благодаря тандемной организации и процессам неравного кроссигвера копии генов рРНК в высокой степени сходны между собой как внутри одного организма, так и в пределах группы свободно скрещивающихся между собой особей, то есть вида, при существенных межвидовых различиях (Sonnenberg et al., 2007). Поэтому гены рРНК могут быть более эффективны для разделения близких видов, чем цитоплазматические маркеры, по которым полиморфизмы могут перекрываться.

Чаще всего в работах с генами рРНК используют участок *ITS2* (транскрибируемый спейсер 2), реже *ITS1* (транскрибируемый спейсер 1), а также 28S (участок, соответствующий 28S рРНК). У покрытосеменных растений участок, включающий *ITS1* и *ITS2*, в высокой степени консервативен по длине и составляет 500–700 п.н. (Матвеева и др., 2011). В ряде работ показано, что участок *ITS2* более эффективен для видодиагностики растений, чем хлоропластные маркеры, в связи с большим разрывом между внутри- и межвидовыми дистанциями (Gao et al., 2010; Luo et al., 2010), и последовательность этого участка ДНК может быть предложена как основная для видодиагностики растений (Yao et al., 2010).

Для представителей семейства зонтичных (Ariaceae) был проведен сравнительный анализ различных участков ДНК (*rbcl*, *matK*, спейсера *trnH-psbA* и *ITS1-ITS2*) по способности различать виды (Liu et al., 2014). При этом наиболее общепринятая комбинация маркеров *rbcl-matK* смогла разделить только 40% видов, а *ITS1-ITS2* – 73.3%; комбинация *ITS1-ITS2* и *trnH-psbA* продемонстрировала эффективность в 80%.

Аналогичные результаты получены для представителей семейства кленовых (Aceraceae) (Han et al., 2016). В этой работе сопоставлена эффективность участков *matK*, *rbcl* и спейсера *trnS-trnG* (между хлоропластными генами тРНК серина и глицина), а также участка *ITS1-ITS2*. При изучении отдельных локусов наибольшую способность различать виды, то есть размещать на дендрограмме копспецифические образцы в отдельную ветвь, продемонстрировал именно *ITS1-ITS2* (в 50% случаев). Наибольшую эффективность имела комбинация ядерных и хлоропластных маркеров *ITS1-ITS2* плюс *trnS-trnG* (90.5%), использование же всех четырех маркеров разрешающую способность более не увеличивало.

У животных последовательности *ITS1* и *ITS2* значительно варьибельнее по длине, чем у растений. Например, представленная в базе данных ДНК NCBI последовательность, *ITS2* у вида *Anopheles beklemishevi* (номер HE659701) имеет длину 744 п.н., а у относительно близкого вида *An. messeae* (номер HE659702) – 395 п.н. Известно, что рНК-транскрипт, соответствующий *ITS2*, образует определенную структуру из шпилек; на примере обширного набора групп близких видов высших растений, водорослей и животных было по-

казано, что структура из 30 пар нуклеотидов в основании шпильки Helix III строго коррелирует с репродуктивной изоляцией (Coleman, 2009), то есть замена пары нуклеотидов в этом участке шпильки всегда (на примере представителей 30 групп близких видов разных таксонов) соответствовала несовместимости гамет. Тем не менее A.W. Coleman (2009) считает, что какого-то особого механизма в данном случае нет и имеет место сходство темпов расхождения генов, непосредственно предопределяющих репродуктивную изоляцию и накопления замен в этом относительно консервативном элементе *ITS2*.

Последовательности *ITS2* широко использовали для выделения многочисленных видов малярийных комаров (Harbach, 2004). Например, при анализе *ITS2* пары видов *Anopheles funestus* и *An. rivulorum* было выделено три варианта последовательности этого участка ДНК для образцов *An. rivulorum*, эти варианты характеризовались определенными ареалами распространения и маркировали скрытые видовые формы (Hackett et al., 2000). Аналогичная работа по изучению связи вариации *ITS2* с морфологическими признаками у комаров группы *An. bancroftii* позволила выявить шесть вариантов этой последовательности, которые продемонстрировали отсутствие привязки к небольшим морфологическим вариациям, характеризовались определенными ареалами распространения и, по-видимому, соответствуют отдельным близким видам (Beebe et al., 2001).

У последовательностей генов рРНК в качестве маркеров видовой принадлежности есть важные недостатки. При наличии двух или более блоков тандемных повторов генов рРНК в геноме эволюционные процессы в них могут оказаться мало согласованными. Если такого рода вариации носят характер инсерций/делеций, то полноценное прочтение последовательности без дополнительных манипуляций (клонирования) становится невозможным. При высокой эффективности анализа участка *ITS1-ITS2* у растений встречающийся внутригеномный полиморфизм также может затруднять применимость этого участка ДНК для разделения видов растений (Матвеева и др., 2011).

В качестве альтернативы для животных предлагается анализ более консервативного участка генов рРНК – участка D1-D2, относящегося к фрагменту, кодирующему 28S рРНК (Sonnenberg et al., 2007). В то же время относительно высокая консервативность этого участка может не позволить различить виды, разошедшиеся по другим маркерам. Аналогичных работ применительно к растениям нам найти не удалось.

Удачная комбинация ядерных и цитоплазматических маркеров использовалась при масштабном анализе муравьев, происходящих из Пале- и Неарктики с целью ответа на вопрос о существовании «неподразделенных» видов, имеющих голарктический ареал (Schär et al., 2018). В этой работе основным типом ДНК-маркера был *COI*, но при наличии внутри одного вида нескольких четко выраженных филогенетических ветвей по этому маркеру изучали разнообразие по двум кодирующим генам и участку D2 28S. На основании расхождения по комплексу маркеров и строилось представление о коспецифичности/некоспецифичности образцов. Исследователи сделали вывод о действительном

существовании «цельных» видов с голарктическим ареалом, а также случаях антропогенной интрогрессии видов.

В связи с тем что анализ последовательностей методом секвенирования ограничивается его высокой стоимостью и трудоемкостью, альтернативой служит разделение видов по каким-либо единичным вариациям нуклеотидов – SNP (single nucleotide polymorphism – мононуклеотидные замены или небольшие встройки/делеции) в диагностических последовательностях. Для выявления SNP в диагностических последовательностях используется ряд основных методов, например, для разделения видов палеарктической группы малярийных комаров *Anopheles maculipennis* разработаны методы разделения по сайт-специфической ПЦР (Kampen, 2005), рестрикционному анализу (Ваулин, Новиков, 2010) и с помощью вариации Real-Time PCR (Lühken et al., 2016). Виды этой группы различаются по мононуклеотидным заменам и инсерциям/делециям в *ITS2* при обширных и, в одном случае, перекрывающихся полиморфизмах по *COI* (Ваулин, Новиков, 2016). Из-за этих различий виды могут быть разделены по спектрам рестрикции или же, при подборе праймеров под участки инсерций/делеций, – с помощью сайт-специфической ПЦР.

В качестве своеобразной модификации ПЦР для определения видовой принадлежности образцов используется Real-Time PCR – в этом случае сигнал считывается при посадке меченого зонда на ДНК-матрицу. Эффективность приведенного метода заключается в возможности количественно оценить видовой состав выборки при постановке единичной реакции со смесью ДНК от разных особей. Аналогичная вариация Real-Time PCR *ITS2* предложена для идентификации возбудителей кокцидоза кур (одноклеточные рода *Eimeria*), а также случаев заражения разными видами возбудителей болезни (Morgan et al., 2009).

При анализе цитоплазматических маркеров высокий уровень их полиморфизма или перекрывание разнообразия по этим маркерам между близкими видами могут привести к ошибкам при разделении образцов разных видов по SNP. Своеобразное исключение составляют птицы, для которых внутривидовая изменчивость по *COI* крайне мала и в среднем различия между особями одного вида равны 0.27%, то есть примерно две замены на диагностический участок в 658 п.н. (Hebert et al., 2004).

С разделением видов связано также выявление образцов, предположительно имеющих гибридное происхождение. Митохондриальная ДНК у животных наследуется по материнской линии и не может указывать на видовую принадлежность отца. Хлоропласты цветковых растений наследуются в большинстве случаев и от материнского растения. Однако примерно в 20% родов цветковых растений встречается наследование от обоих родителей (Zhang, 2010), а у голосеменных хлоропластная ДНК обычно наследуется от отцовского растения. Гены рРНК оказываются более удобными для выявления гибридов, чем цитоплазматические, так как гибридные особи могут получать гены рРНК от обоих родителей. В этом случае результаты секвенирования генов рРНК или сайт-специфические манипуляции (рестрикция или сайт-специфическая ПЦР) будут давать спектры наложения паттернов, характерных для разных видов.

Приведенный обзор в общих чертах сопоставляет методы разделения видов растений и животных по последовательностям ДНК и может способствовать формированию цельной картины принципов этих методов для организмов разных групп. Цитоплазматические маркеры, соответствующие кодирующим участкам ДНК – *COI* (для животных) и *rbcl+matK* (для растений), дают хорошо читаемые сиквенсы, и поэтому они наиболее практичны для разделения видов. Но в отличие от животных, чаще имеющих выраженную границу между внутри- и межвидовым разнообразием, для растений эта граница более размыта, а дивергенция между близкими формами относительно мала. Поэтому в ряде случаев разделение близких видов связано с использованием более варибельных межгенных спейсеров в ДНК хлоропластов. Внутренние транскрибируемые спейсеры генов рРНК более эффективны для разделения видов как растений, так и животных, но наличие нескольких блоков генов рРНК в геноме с различными вариантами последовательности *ITS1* и *ITS2* ограничивает возможность получения качественных прочтений и, как следствие, применение этих участков генома для разделения видов. В случае с животными в качестве более удобной для прочтения замены спейсерам генов рРНК предлагаются варибельные участки, относящиеся к 28S рДНК, – *D2* или *D1-D2*. По-видимому, наиболее удачна для разделения видов комбинация ядерных и цитоплазматических маркеров. В любом случае важно соотносить расхождение по ДНК-маркерам с реально существующими объектами исследования – их ареалами, особенностями микрогеографического распространения, поведения и тому подобными. Если же за небольшим расхождением по ДНК-маркерам не прослеживается связи с расхождением по другим видовым критериям, то придание ДНК-формам видового статуса мало обосновано.

Список литературы / References

- Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Географическая изменчивость *ITS2* рДНК и *COI* мтДНК и криптические виды малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae). *Информационный вестник ВОВУС*. 2010;14(3):546-157.
- [Vaulin O.V., Novikov Yu.M. Geographical variability of *ITS2* rDNA and *COI* mtDNA and cryptic species of mosquito *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae). *Informatsionnyy vestnik VOGiS = Herald Vavilov Society Genetics Breeding*. 2010;14(3):546-557. (In Russian)]
- Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Филогенетические связи между палеоарктическими видами *Anopheles* комплекса *maculipennis* (Diptera: Culicidae), установленные при использовании разных методов. Проблема консенсуса. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(5):695-703. DOI 10.18699/VJ16.189.
- [Vaulin O.V., Novikov Yu.M. Phylogenetic relationships between Palaearctic species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) revealed by different approaches and markers. The problem of consensus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(5):695-703. DOI 10.18699/VJ16.189. (in Russian)]
- Колчанов Н.А., Кочетов А.В., Салина Е.А., Першина Л.А., Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Состояние и перспективы использования маркер-ориентированной и геномной селекции растений. *Вестник Российской академии наук*. 2017;87(4):348-354.
- [Kolchanov N.A., Kochetov A.V., Salina E.A., Pershina L.A., Khlestkina E.K., Shumny V.K. Status and prospects of marker-assisted and genomic plant breeding. *Vestnik Rossijskoj Akademii Nauk*. 2017;87(2):125-131. DOI 110.1134/S1019331617020113]
- Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович А.Е., Лутова Л.А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики.

- нетики растений. *Экологическая генетика*. 2011;9(1):32-43. DOI 10.17816/ecogen9132-43.
- [Matveeva T.V., Pavlova O.A., Bogomaz D.I., Demkovich A.E., Lutova L.A. Molecular markers for species identification and phylogenetics of plants. *Ecologicheskaja Genetika*. 2011;9(1):32-43. DOI 10.17816/ecogen9132-43. (in Russian)]
- Сибатаев А.К., Шабанова Ю.В. Морфология малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* на территории России. В: Научно-практическое руководство по малярии (эпидемиология, систематика, генетика). Науч. ред. В.Н. Стегний. Томск: ТГУ, 2007;146-186. [Sibataev A.K., Shabanova Yu.M. Morphology of malaria mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex on the territory of Russia]. In: Science-Practice guide of malaria (epidemiology, systematics, genetics) Science ed. V.N. Stegnii. Tomsk, TSU, 2007;146-186. (in Russian)]
- Шеховцов С.В., Ермолов С.А., Держинский Е.А., Полубаярова Т.В., Ларичева М.С., Пельтек С.Е. Генетическая и размерная изменчивость *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida). *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;6(1):5-9. DOI 10.18699/Letters2020-6-01.
- [Shekhovtsov S.V., Ermolov S.A., Derzhinsky Ye.A., Poluboyarova T.V., Laricheva M.S., Peltek S.E. Genetic and body size variation in *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida). *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;6(1):5-9. DOI 10.18699/Letters2020-6-01. (in Russian)]
- Beebe N.W., Maung J., van den Hurk A.F., Ellis J.T., Cooper R.D. Ribosomal DNA spacer genotypes of the *Anopheles bancroftii* group (Diptera: Culicidae) from Australia and Papua New Guinea. *Insect Mol Biol*. 2001;10(5):407-413. DOI 10.1046/j.0962-1075.2001.00278.x.
- Besansky N.J., Powell J.R., Caccione A., Hamm D.M., Scott J.A., Collins F.H. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(15):6885-6888. DOI 10.1073/pnas.91.15.6885.
- Billet K., Genitoni J., Bozec M., Renault D., Barloy D. Aquatic and terrestrial morphotypes of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora*, show distinct morphological and metabolomic responses. *Ecol Evol*. 2018;8(5):2568-2579. DOI 10.1002/ece3.3848.
- Birky C.W. Jr. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu Rev Genet*. 2001;35:125-148. DOI 10.1146/annurev.genet.35.102401.090231.
- Bourguet D., Fonseca D., Vourch G., Dubois M.P., Chandre F., Severini C., Raymond M. The acetylcholinesterase gene *Ace*: a diagnostic marker for the Papiens and Quinquesciatus forms of the *Culex pipiens* complex. *J Am Mosq Control Assoc*. 1998;14(4):390-396.
- Cabelin V.L., Alejandro G.J. Efficiency of *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, and *trnL-F* (cpDNA) to molecularly authenticate philippine ethnomedicinal apocynaceae through DNA barcoding. *Pharmacogn Mag*. 2016;12(Suppl 3):S384-S388. DOI 10.4103/0973-1296.185780.
- CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(31):12794-7. DOI 10.1073/pnas.0905845106.
- Coleman A.W. Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;50(1):197-203. DOI 10.1016/j.ympev.2008.10.008.
- Costa J.Y., Forni-Martins E.R. A triploid cytotype of *Echinodorus tenellus*. *Aqua Bot*. 2004;79:325-332.
- Fontaine M.C., Pease J.B., Steele A., Waterhouse R.M., Neafsey D.E., Sharakhov I.V., Jiang X., Hall A.B., Catteruccia F., Kakani E., Mitchell S.N., Wu Y.C., Smith H.A., Love R.R., Lawniczak M.K., Slotman M.A., Emrich S.J., Hahn M.W., Besansky N.J. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. *Science*. 2015;347(6217):1258524. DOI 10.1126/science.1258524.
- Gao T., Yao H., Song J., Zhu Y., Liu C., Chen S. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. *BMC Evol Biol*. 2010;10:324. DOI 10.1186/1471-2148-10-324.
- Ghahramanzadeh R., Esselink G., Kodde L.P., Duistermaat H., van Valkenburg J.L.C.H., Marashi S.H., Smulders M.J.M., van de Wiel C.C.M. Efficient distinction of invasive aquatic plant species from non-invasive related species using DNA barcoding. *Mol Ecol Resour*. 2013;13:21-31. DOI 10.1111/1755-0998.12020.
- Hackett B.J., Gimign J., Guelbeogo W., Costantini C., Koekemoer L.L., Coetzee M., Collins F.H., Besansky N.J. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol Biol*. 2000;9(4):369-374. DOI 10.1046/j.1365-2583.2000.00198.x.
- Han Y.W., Duan D., Ma X.F., Jia Y., Liu Z.L., Zhao G.F., Li Z.H. Efficient identification of the forest tree species in aceraceae using DNA barcodes. *Front Plant Sci*. 2016;16(7):1707. DOI 10.3389/fpls.2016.01707.
- Harbach R.E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res*. 2004;94(6):537-553. DOI 10.1079/ber2004321.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*. 2003;270(1512):313-321. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hebert P.D., Stoeckle M.Y., Zemlak T.S., Francis C.M. (2004) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol*. 2004;2(10):e312. DOI 10.1371/journal.pbio.0020312.
- Herden T., Friesen N. Ecotypes or phenotypic plasticity – The aquatic and terrestrial forms of *Helosciadium repens* (Apiaceae). *Ecol Evol*. 2019;9(24):13954-13965. DOI 10.1002/ece3.5833.
- Hernández-Triana L.M., Craine J., Hall A., Fatih F., Mackenzie-Dodds J., Shelley A., Zhou X., Post R., Gregory T.R., Hebert P. DNA barcoding for species identification within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the New World. *Zootaxa*. 2012;3514:43-69.
- Kampen H. Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in a PCR assay diagnostic for palaeartic *Anopheles maculipennis* sibling species. *Parasitol Res*. 2005;97(2):113-117. DOI 10.1007/s00436-005-1392-9.
- Liu J., Shi L., Han J., Li G., Lu H., Hou J., Zhou X., Meng F., Downie S.R. Identification of species in the angiosperm family Apiaceae using DNA barcodes. *Mol Ecol Resour*. 2014;14(6):1231-1238. DOI 10.1111/1755-0998.12262.
- Luo K., Chen S., Chen K., Song J.Y., Yao H., Ma X., Zhu Y.J., Pang X.H., Yu H., Li X.W., Liu Z. Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family. *Sci. China Life Sci*. 2010;53:701-708. DOI 10.1007/s11427-010-4009-1.
- Lühken R., Czajka C., Steinke S., Jöst H., Schmidt-Chanasit J., Pftzner W.P., Becker N., Kiel E., Krueger A., Tannich E. Distribution of individual members of the mosquito *Anopheles maculipennis* complex in Germany identified by newly developed real-time PCR assays. *Med Vet Entomol*. 2016;30(2):144-154. DOI 10.1111/mve.12161.
- Morgan J.A., Morris G.M., Wlodek B.M., Byrnes R., Jenner M., Constantinoiu C.C., Anderson G.R., Lew-Tabor A.E., Molloy J.B., Gasser R.B., Jorgensen W.K. Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens. *Mol Cell Probes*. 2009;23(2):83-89. DOI 10.1016/j.mcp.2008.12.005.
- Nei M., Rooney A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet*. 2005;39:121-152. DOI 10.1146/annurev.genet.39.073003.112240.
- Schär S., Talavera G., Espadaler X., Rana J.D., Andersen Andersen A., Cover S.P., Vila R. Do Holarctic ant species exist? Trans-Beringian dispersal and homoplasy in the Formicidae. *J Biogeogr*. 2018;45:1917-1928. DOI 10.1111/jbi.13380.
- Sonnenberg R., Nolte A.W., Tautz D. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers Zool*. 2007;4:6. DOI 10.1186/1742-9994-4-6.
- Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J., Li Y., Pang X., Xu H., Zhu Y., Xiao P., Chen S. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One*. 2010 Oct 1;5(10):e13102. DOI 10.1371/journal.pone.0013102.
- Zhang Q. Why does biparental plastid inheritance revive in angiosperms? *J Plant Research*. 2010;123(2):201-206. DOI 10.1007/s10265-009-0291-z.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.06.2021. После рецензирования 02.07.2021. Принята к публикации 08.07.2021.