



УДК 574:575.858

Применение биоинформационных методов для определения границ видов пиявок рода *Erpobdella*

А. В. Болбат¹, И. А. Кайгородова^{1,2}, Ю. С. Букин^{2,3},
Л. И. Федорова^{2,4}, Н. В. Сороковикова²

¹ Иркутский государственный университет, Иркутск

² Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

³ Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск

⁴ Иркутский государственный аграрный университет имени А. А. Ежевского,
Иркутск

E-mail: irina@lin.irk.ru

Аннотация. В настоящее время экологические исследования и экологический мониторинг требуют точного и быстрого определения уровней биоразнообразия без использования традиционного морфологического анализа. Для решения этой задачи разработан целый ряд методов молекулярной экологии, в частности техника ДНК-штрихкодирования. Однако определение штрихкодowego разрыва бывает затруднено из-за ложноположительных и ложноотрицательных ошибок. В данной работе был апробирован набор биоинформационных методов, обеспечивающих объективную оценку различий между внутривидовой и межвидовой вариабельностью. В качестве модельного объекта использован набор нуклеотидных последовательностей фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы-1 (COI) сибирских пиявок рода *Erpobdella*, неидентифицируемых морфологически. С помощью алгоритма GMYC показано, что порог внутривидовой изменчивости для исследуемого набора генетических данных составляет 1,85 %. Применение программы ABGD позволило обнаружить достоверный штрихкодированный разрыв как минимум в 4 %. Оба метода независимым образом разделили исследуемый набор из 95 последовательностей на 10 филогенетических групп, где 68 последовательностей сибирских пиявок сформировали отдельный кластер. Отсутствие морфологического и генетического сходства с описанными ранее видами может свидетельствовать об обнаружении нового вида кольчатых червей. Одновременно показано, что последовательности, отнесённые к виду *E. ochoterenai*, принадлежат к четырём разным видам, что предполагает необходимость рекуррентного морфологического анализа этой группы. Кроме того, методами GMYC и ABGD неидентифицированный образец из Македонии однозначно отнесён к виду *E. vilnensis*, что демонстрирует успешность концепции ДНК-штрихкодирования. Это позволяет рассматривать биоинформационный подход в молекулярной экологии как пригодный инструмент для объективной делимитации таксонов, в частности, у эрпобделлид, применение которого значительно упростит определение видовой принадлежности аннелид, что существенно усилит экологические исследования, повысит эффективность мониторинга, а также уровень нашего познания и использования биоразнообразия.

Ключевые слова: ДНК-штрихкодирование, GMYC, ABGD, *Erpobdella*.

Введение

Познание биоразнообразия – одна из фундаментальных задач экологии, для решения которой в настоящее время применяется как классический морфологический анализ особей, так и целый комплекс методов молекулярной экологии [3; 7; 22]. Современный подход к систематике организмов включает применение молекулярной филогении и статистических методов обработки её результатов. Данные о генетической структуре таксона позволяют не только определить его родство с остальными, но и предоставить технику надёжного определения места неизвестного образца в существующей классификации. На сегодняшний день для этих целей активно вводится методика ДНК-штрихкодирования (ДНК-ШК). Это стандартизированная методика, использующая определённый молекулярный маркер для создания базы данных, по которой неспециалисты смогут определить местоположение неизвестного образца в систематике. Для большинства многоклеточных животных универсальным маркером служит фрагмент митохондриального гена первой субъединицы цитохромоксидазы (COI) [16]. Этот метод основывается на предположении о существовании так называемого штрихкодного разрыва – достоверного различия в частотах распределения внутривидовых и межвидовых вариаций.

Однако множественные исследования поставили под сомнение концепцию штрихкодowego разрыва, поскольку во время его поиска случаются как ложноположительные, так и ложноотрицательные ошибки [6; 8; 9; 19; 20; 26]. Ложноположительные ошибки появляются в тех случаях, когда разные популяции одного вида имеют достаточно чёткие генетические различия, то есть когда существуют барьеры для потока генов. Однако в этом случае можно предположить существование криптических видов. Ложноотрицательные ошибки происходят, когда между чётко различимыми биологическими видами имеется недостаточно генетических различий. В этом случае уровни внутривидовой и межвидовой вариабельности могут перекрываться, и обнаружение достоверного штрихкодного разрыва становится невозможным.

Таким образом, можно полагать, что ДНК-штрихкодирование применимо не ко всем организмам, а пороговые значения для разграничения видов должны быть установлены индивидуально для каждого конкретного исследования.

Методы молекулярной экологии по-прежнему остаются лишь одним из инструментов систематики и не могут полностью заменить традиционную таксономию. Авторы и сторонники методики ДНК-ШК признают её ограничения и неспособность работать с эволюционно молодыми видами [17]. Тем не менее метод ДНК-ШК активно внедряется, и хотя методика не универсальна, её полезность остаётся неоспоримой. По состоянию на март 2008 г. было доступно 363 584 последовательностей от 50 039 видов, из которых 136 338 последовательностей от 13 761 видов удовлетворяли критериям ДНК-штрихкодирования (минимальная длина – 500 пар оснований и более трёх особей на каждый вид). На тот момент более 65 % всех штрихкодированных образцов были собраны за предыдущие 5 лет. Более 98 % образцов принадлежали к царству животных, из них 65 % представляли насекомых

[12]. К июлю 2016 г. было проанализировано уже 5 млн образцов, включая 60 тыс. видов растений и 450 тыс. видов животных [18].

Для статистического обнаружения порога между внутривидовой и межвидовой вариабельностью недавно разработан метод General Mixed Yule Coalescent (GMYS) [25]. Он опирается на предположение о монофилии вида и исключает горизонтальный перенос генов. Используя готовое ультраметрическое филогенетическое древо, этот метод обнаруживает скачок в частоте событий ветвления. Все ветви после этого порогового значения отражают внутривидовые процессы, тогда как ветви до него выражают таксономические отношения более высокого порядка. Этот метод не требует формулировки изначальной гипотезы и может быть использован в тех случаях, когда не хватает данных не только о положении образца в существующей систематике, но и когда положение того или иного таксона определено недостаточно точно либо имеется неполное описание определённого вида. Однако этот метод не учитывает различные скорости эволюции в разных филогенетических группах, что создаёт определённую долю ошибок в больших наборах данных, где сравниваются несколько родов и таксонов более высокого порядка. Другим неудобством метода является требование высокой вычислительной мощности. Для проведения анализа требуется реконструкция филогении каждого образца, что затруднительно при больших наборах исходных данных.

Для проверки гипотезы о существовании штрихкодного разрыва и разграничения видов в исходном наборе данных был разработан метод Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) [2]. Распределения частот внутривидовых и межвидовых вариаций часто могут перекрываться, и определить их визуально оказывается сложно. Метод ABGD создан для стандартизированного обнаружения статистически наиболее вероятного штрихкодowego разрыва. Он проводит попарное сравнение всех последовательностей в исходном наборе данных и вычисляет долю различий между ними. Обычно частоты распределения этих различий показывают заметный разрыв между пиками. Этот разрыв и называется штрихкодным. Затем обнаруженный штрихкодный разрыв рекурсивно применяется к изначальному набору данных. Все последовательности, различия между которыми ниже этого порогового значения, объединяются в один вид.

Цель данной работы – применение современных биоинформационных методов для объективной делимитации видов. В качестве модельного объекта использованы сибирские пиявки рода *Erpobdella*, морфологическая идентификация которых затруднена ввиду слабой изученности гирудофауны региона, а также высокого уровня внутривидовой вариабельности, наблюдаемой у представителей этого рода.

Материалы и методы

Сбор и морфологический анализ материалов. Сбор материалов проводился в 2011–2016 гг. в пресных водоёмах Восточной и Западной Сибири. Пиявки были собраны в бассейнах рек: Иртыша (реки Иртыш и Кизильцы, Шульбинское и Бухтарминское водохранилища); Оби (р. Обь и Обское во-

дохранилище), Лены (р. Лена, Лебединые озёра, басс. Окунайка – Киренга – Лена; оз. Тонкое (басс. Лены); Ангары (р. Ангара, р. Едогон, басс. Ия – Ангара; Оёка (басс. Куда – Ангара); Оки (пруд в дер. Горхон, басс. Обуса – Ангара), а также в прогреваемых бухтах Чивыркуйского залива и пролива Малое Море оз. Байкал. Отлов пиявок проводился вручную или с помощью гидробиологических сачков в прибрежной части водоёмов в диапазоне глубин 0,5–1,5 м. Собранные образцы фиксировались 80%-ным этанолом. Морфологический анализ фиксированного материала проводился в лабораторных условиях с использованием бинокулярного микроскопа МСП-2 (ОАО «ЛОМО», Россия). Видовую принадлежность пиявок определяли по систематическим ключам в соответствии с современной классификацией [1; 21].

Молекулярный анализ. При выделении ДНК использовали модифицированный стандартный метод [11]. Фолмеровский фрагмент гена mtCOI длиной 709 п. н. амплифицировали с использованием универсальных праймеров [10]. Определение первичной структуры ДНК проводилось в НПК «Синтол» (Москва).

Филогенетический анализ. Выравнивание набора нуклеотидных последовательностей проводилось с помощью программы CLUSTAL W v. 2.0 [5], ассоциированной с программой BioEdit [14]. Оптимальная модель эволюции для построения филогенетического дерева определялась с помощью программы jModelTest v. 0.1 [23]. Выбор модели производился на основе значения байесовского информационного критерия (BIC). Для реконструкции филогенетического дерева использовался байесовский метод, реализованный в программе BEAST v. 1.8.4 [4]. Реконструкция дерева проводилась с учетом гипотезы логарифмически расслабленных молекулярных часов (uncorrelated relaxed lognormal clock) [24]. При реконструкции использовалась филогенетическая модель «Видообразование: процесс рождения-гибели» (Speciation: Birth-Death Process) [13]. Сходимость байесовского анализа оценивалась на основании показателей ESS статистики в программе Tracer v.1.6. Реконструированное дерево было построено с помощью программы TreeAnnotator v. 1.8.4 [4]. С помощью функции GMYC библиотеки splits для статистической среды R на основе реконструированного филогенетического дерева был осуществлён поиск порогового значения генетических дистанций для внутривидовой вариабельности. Графическое оформление филогенетического дерева выполнялось с помощью программы FigTree из пакета BEAST [4]. Для анализа на наличие штрихкодowego разрыва и определения количества потенциальных видов использовалась программа ABGD, размещённая на веб-интерфейсе (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>). Для повышения точности расчётов количество шагов было увеличено до 100, остальные параметры программы были оставлены по умолчанию.

Результаты и обсуждение

В ходе молекулярного анализа расшифрованы нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI длиной 578–678 п. н. для 68 особей сибирских и 5 европейских макрофаговых пиявок рода *Erpobdella*. Сибирские

особи *Erpobdella* sp. морфологически отличаются от всех известных ныне видов. Видовой статус для *E. octoculata* (Украина) подтвердил С. Ю. Утевский (ХНУ, г. Харьков).

Для проведения биоинформационных исследований на основе полученных молекулярных данных построена матрица нуклеотидных последовательностей, выровненных относительно друг друга. В качестве группы сравнения использованы 22 гомологичные последовательности близкородственных видов из международного банка генетических данных (GenBank): *Erpobdella* sp. (HM246537), *E. monostriata* (HM246601, KP300764, DQ009665), *E. obscura* (AF003273, KM612244, KM612133, KM612095, KM612094, KM611933, KM611847), *E. ochoterenai* (DQ235596, DQ235603, DQ235600, DQ235599), *E. punctata* (AF003275, KT705575, KT706410), *E. vilnensis* (DQ009663, HM246551, HM246585, KP300763).

На основании наименьшего показателя ВИС, полученного с помощью программы jModelTest [23], в качестве оптимальной модели эволюции для исследуемого набора данных, состоящего из 95 последовательностей, была выбрана модель НКУ+G+I (Hasegawa-Kishino-Yano [15] + Gamma distribution + Invariant sites). Этот алгоритм был применён для построения высоко разрешённого ультраметрического байесовского дерева в программе BEAST [4], где было сгенерировано 250 млн филогенетических деревьев, выборка из которых проводилась через каждые 12 500 генераций. На основе отобранных 20 000 деревьев было реконструировано консенсусное дерево, которое послужило исходным материалом для анализа внутривидовой и межвидовой вариабельности и разграничения видов путём подгонки моделей ветвления между видами и реконструированным геномным деревом (GMYC). После обработки дерева функцией GMYC был установлен порог внутривидовой изменчивости 1,85 % (рис. 1), что согласуется с концепцией техники ДНК-штрихкодирования, признающей показатель порогового значения внутривидового генетического полиморфизма в пределах 2–3 % [16]. С учётом вычисленного порогового значения набор из 95 нуклеотидных последовательностей был разделён программой GMYC на 10 групп, рассматриваемых в качестве потенциальных видов (рис. 2). Сибирские представители рода *Erpobdella* образуют единый кластер независимо от географического положения водоёма их обитания. Их филогенетическая линия находится на значительном удалении от транспалеарктического вида *E. octoculata*, к которому их относили ранее [1]. Наиболее филогенетически близкой оказалась группа последовательностей *E. vilnensis* с генетической дистанцией от сибирских эрпобделл более 5 % (см. рис. 2), что намного выше пороговой величины, необходимой для делимитации вида согласно принципам ДНК-штрихкодирования [16]. Кроме того, в ходе биоинформационного анализа установлена видовая принадлежность образца *Erpobdella* sp. из оз. Охрид, сиквенс которого размещён в GenBank под номером HM246537. Коллегам из Македонии не удалось идентифицировать этот образец до вида классическим способом, полагаясь только на морфологические признаки. Однако в нашем исследовании с помощью молекулярно-биоинформационных мето-

дов установлено, что этот образец однозначно относится к виду *E. vilnensis*, так как его COI последовательность на филогенетическом древе кластеризуется совместно с представителями вида *E. vilnensis*, образуя единую филогенетическую линию (выделена синим на рис. 2), что, собственно, не противоречит биогеографическим данным о границах ареала этого вида.

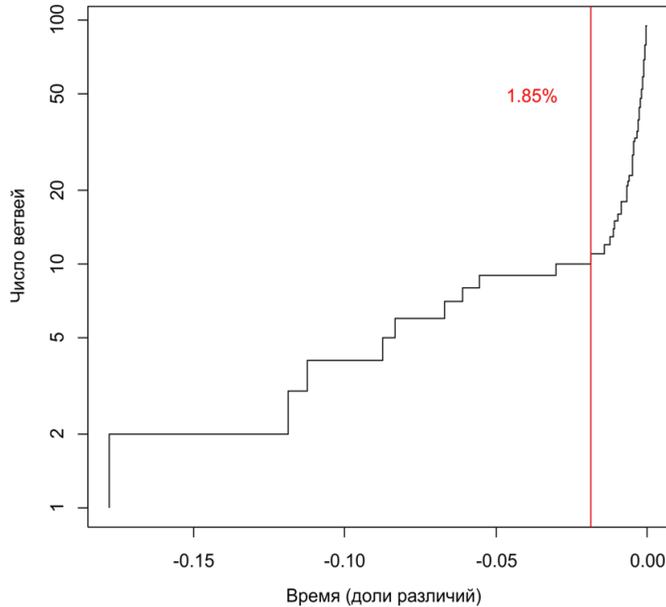


Рис. 1. Порог внутривидовой изменчивости (вертикальная красная линия) в пределах семейства Erpobdellidae согласно результатам GMYC-анализа

При обработке данных по методу ABGD исследуемый набор последовательностей был разделён на 10 групп, полностью соответствующих полученным ранее при использовании GMYC-анализа (см. рис. 2). Таким образом, факт выделения сибирских эрпобделл в отдельный вид, а также определение видового статуса *Erpobdella* sp. из оз. Охрид (Македония) получили подтверждение двумя независимыми методами.

Алгоритм программы ABGD выявил два разрыва в распределении парных различий (рис. 3). Разрыв между рангами 2–3 % и 6–7 % был идентифицирован как штрихкодový разрыв. Дополнительный разрыв между рангами 8–9 % и 11–12 %, вероятно, объясняется наличием группы эволюционно-удалённых последовательностей видов *E. punctata* и *E. ochotrenai*, обитающих в Северной Америке (в Канаде и Мексике соответственно). В то же время последовательности канадского вида *E. obscura* формируют кластер, филогенетически более близкий к остальным представителям рода *Erpobdella* (см. рис. 2). В связи с этим возникает предположение о некорректной классификации образцов *E. ochotrenai* и *E. punctata* на уровне рода.

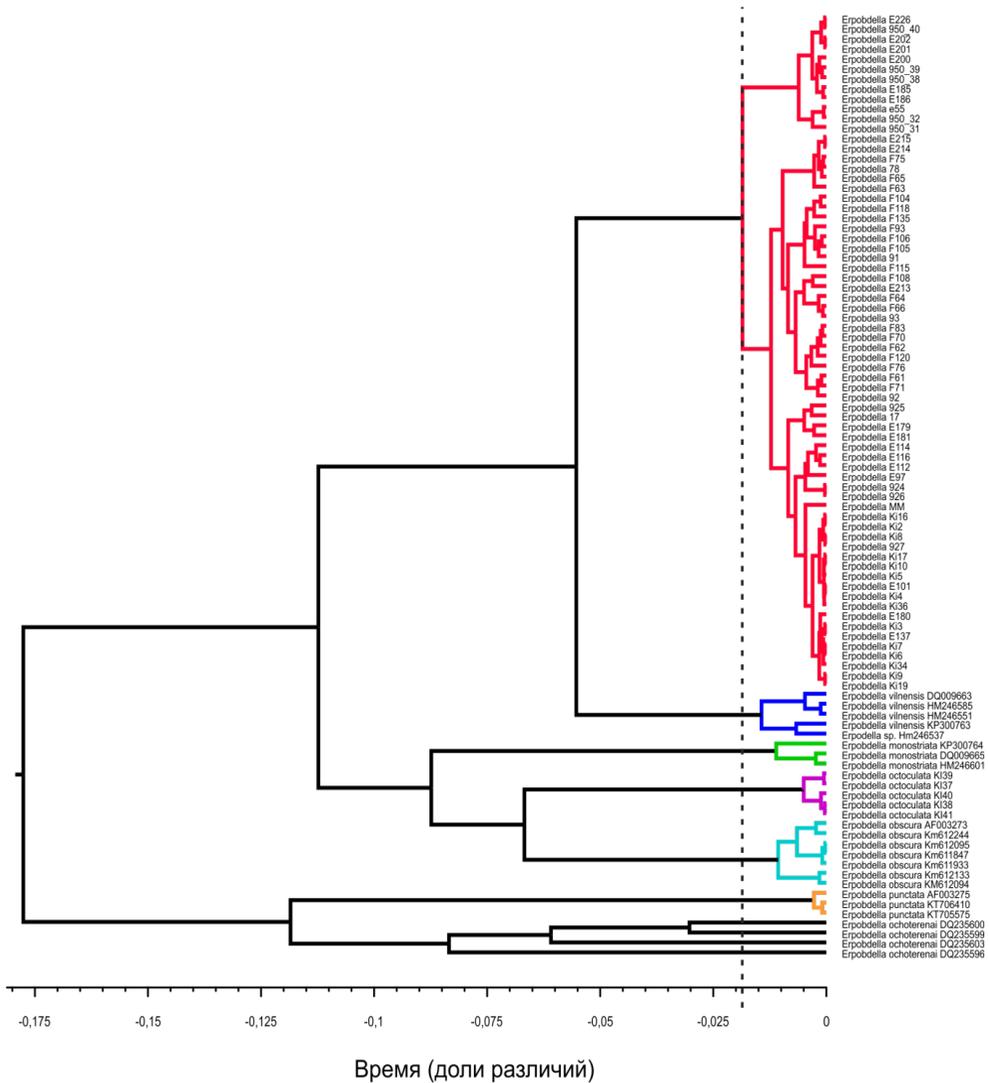


Рис. 2. Филогенетическое древо пиявок рода *Erpobdella*. Порог внутривидовой изменчивости обозначен вертикальной пунктирной линией. Внутривидовые связи сибирских представителей рода *Erpobdella* объединены в общий кластер и выделены красным

Кроме того, в ходе анализа было обнаружено, что последовательности из GenBank (DQ235596, DQ235603, DQ235600 и DQ235599), отнесённые к виду *E. ochoterenai*, на самом деле принадлежат четырём разным видам, так как генетические дистанции между этими линиями на древе гораздо выше порогового значения (см. рис. 2). Этот вывод поддерживается результатами, полученными как с помощью GMYC, так и ABGD, что поднимает вопрос о необходимости ревизии этой группы и более пристального анализа морфологических признаков.

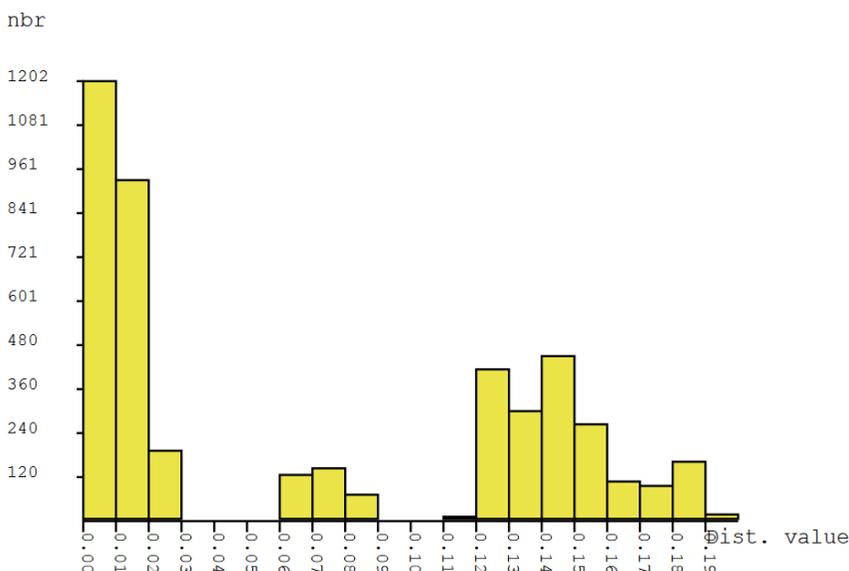


Рис. 3. Распределение попарных различий между последовательностями образцов по ABGD

Выводы

В настоящей работе продемонстрирована применимость современных стандартизированных биоинформационных методов для делимитации видов пиявок рода *Erpobdella*. Два независимых метода – GMYC и ABGD – продемонстрировали разделение набора анализируемых последовательностей на одинаковое количество групп – 10. Согласно обоим методам последовательности 68 сибирских эрпобделл образуют единый кластер, значительно удалённый от вида *E. octoculata*, к которому их причисляли ранее. Более того, филогенетически наиболее близкой к сибирским, но всё же не идентичной группой оказался вид *E. vilnensis*. Ввиду морфологического несовпадения сибирских эрпобделл ни с одним из описанных ранее видов пиявок и генетического удаления более чем на 5 % от остальных можно сделать вывод об обнаружении нового для науки вида.

Показано, что последовательности из GenBank, отнесённые к виду *E. ochoterenai*, на самом деле принадлежат четырём разным видам, что поднимает вопрос о более пристальном рекуррентном морфологическом изучении этой группы.

Двумя независимыми методами неидентифицированный образец из Македонии *Erpodella* sp. однозначно отнесён к виду *E. vilnensis*, что демонстрирует успешность концепции ДНК-штрихкодирования.

Список литературы

1. Лукин Е. И. Пиявки пресных и солоноватых водоемов / Е. И. Лукин // Фауна СССР. Пиявки / АН СССР. Зоол. ин-т. – 1976. – Т. 1. – С. 1–484.

2. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation / N. Puillandre [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2012. – Vol. 21. – P. 1864–1877.
3. Barley A. Assessing the performance of DNA barcoding using posterior predictive simulations / A. Barley, R. Thomson // *Molecular Ecology*. – 2016. – Vol. 25. – P. 1944–1957.
4. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 / A. J. Drummond [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2012. – Vol. 29(8). – P. 1969–1973.
5. Clustal W and Clustal X version 2.0 / M. A. Larkin [et al.] // *Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 23. – P. 2947–2948.
6. Cognato A. I. Standard percent DNA sequence difference for insects does not predict species boundaries / A. I. Cognato // *J. Econ. Entomol.* – 2006. – Vol. 99, N 4. – P. 1037–1045.
7. Coissac E. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals / E. Coissac, T. Riaz, N. Puillandre // *Molecular Ecology*. – 2012. – Vol. 21. – P. 1834–1847.
8. DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides / J. M. Burns [et al.] // *J. Lepid. Soc.* – 2007. – Vol. 61, N 3. – P. 138–153.
9. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success / R. Meier [et al.] // *Syst. Biol.* – 2006. – Vol. 55, N 5. – P. 715–728.
10. DNA primer for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // *Mol. Mar. Biol. Biotech.* – 1994. – Vol. 3. – P. 294–299.
11. Doyle J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J. J. Doyle, J. L. Doyle // *Phytochemistry Bulletin*. – 1987. – Vol. 19 – P. 11–15.
12. Frezal L. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects / L. Frezal, R. Leblois // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2008. – Vol. 8. – P. 727–736.
13. Gernhard T. The conditioned reconstructed process / T. Gernhard // *J. Theor. Biol.* – 2008. – Vol. 253(4). – P. 769–778.
14. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
15. Hasegawa M. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA / M. Hasegawa, H. Kishino, T. Yano // *J. Mol. Evol.* – 1985. – Vol. 22(2). – P. 160–174.
16. Hebert P. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species / P. Hebert, S. Ratnasingham, J. deWaard. // *Proc. R. Soc. Lond. B*. – 2003. – Vol. 270. – P. 96–99.
17. Hebert P. The promise of DNA barcoding for taxonomy / P. Hebert, T. R. Gregory // *Syst. Biol.* – 2005. – Vol. 54, N 5. – P. 852–859.
18. Hebert P. From writing to reading the encyclopedia of life / P. Hebert, P. Hollingsworth, M. Hajibabaei // *Phil. Trans. R. Soc. B*. – 2016. – Vol. 371. – 20150321.
19. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies / M. Elias [et al.] // *Proc. Roy. Soc. Lond. B*. – 2007. – Vol. 274(1627). – P. 2881–2889.
20. Meyer C. P. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling / C. P. Meyer, G. Paulay // *PloS Biology*. – 2005. – Vol. 3, N 12. – P. 2229–2238.

21. Neesemann H. Clitellata, Branchiobdellida, Acanthobdellida, Hirudinea / H. Neesemann, E. Neubert // Süßwasserfauna von Mitteleuropa. – Heidelberg : Spectrum Akademischer Verlag – 1999. – Vol. 6, N 2. – P. 1–178.
22. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach / A. Valentini [et al.] // Molecular Ecology Resources. – 2009. – Vol. 9. – P. 51–60.
23. Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging / D. Posada // Mol. Biol. Evol. – 2008. – Vol. 25, N 7. – P. 1253–1256.
24. Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence / A. J. Drummond [et al.] // PLoS ONE. – 2006. – Vol. 4, N 5. – E. 88.
25. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects / J. Pons [et al.] // Syst. Biol. – 2006. – Vol. 55, N 4. – P. 595–609.
26. Wiemers M. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae) / M. Wiemers, K. Fiedler // Front. Zool. – 2007. – Vol. 4. – E. 8.

Application of Bioinformational Methods for Species Delimitation in the Genus *Erpobdella* (Erpobdellidae, Hirudinea)

A. V. Bolbat¹, I. A. Kaygorodova^{1,2}, Yu. S. Bukin^{2,3}, L. I. Fedorova^{2,4}, N. V. Sorokovikova²

¹ Irkutsk State University, Irkutsk

² Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

³ Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk

⁴ Irkutsk State Agricultural University, Irkutsk

Abstract. At the present ecological surveys and ecological monitoring require accurate and rapid identification of biodiversity level without using traditional morphology analysis. To solve this problem a range of molecular ecological methods was developed, particularly the DNA-barcoding technique. However the detection of barcode gap might be challenging due to false-positive and false-negative errors. In this paper, a set of bioinformatic methods providing objective estimation of difference between intraspecific and interspecific variance was tested. The set of nucleotide sequences of the mitochondrial gene fragment for cytochrome c oxidase I (COI) of morphologically indistinguishable Siberian was used as a model object. The GMYC application showed intraspecific variance threshold at 1.85 %. Using ABGD algorithm allowed to detect a reliable barcode gap of at least 4 %. Both methods independently divided the analyzed set of sequences into 10 phylogenetic groups, where 68 sequences of Siberian leeches formed a separate cluster. The lack of morphological and genetic similarity to previously described species may indicate the discovery of a new species of annelid worms. At the same time it was shown that the sequences previously attributed to species *Erpobdella ochoterenai* actually belong to 4 different species which suggest the necessity of recurrent morphological analysis of this group. Additionally, both GMYC and ABGD unambiguously assigned previously unidentified sample from Macedonia to species *E. vilnensis*, which demonstrates the utility of the DNA-barcoding concept. This allows to consider bioinformatic approach to molecular ecology as a suitable tool for objective species delimitation particularly within Erpobdellidae, significantly simplifying the determining of annelid species relationships,

which will enhance ecological surveys, increase the efficiency of monitoring and our knowledge for using biodiversity.

Keywords: DNA-barcoding, GMYC, ABGD, *Erpobdella*.

Болбат Александр Васильевич
магистрант

Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел. (3952) 24–18–55
e-mail: bolbatav@gmail.com

Bolbat Aleksandr Vasilyevich
Undergraduate

Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–18–55
e-mail: bolbatav@gmail.com

Кайгородова Ирина Александровна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел.: (3952) 42–29–23
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел. (3952) 24–18–55
e-mail: irina@lin.irk.ru

Kaygorodova Irina Aleksandrovna
Candidate of Sciences (Biology),
Senior Research Scientist

Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–29–23
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–18–55
e-mail: irina@lin.irk.ru

Букин Юрий Сергеевич
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник

Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел.: (3952) 42–29–23
Национальный исследовательский
Иркутский государственный технический
университет
664074, г. Иркутск, Лермонтова, 83
тел. (3952) 40–51–53
e-mail: bukininyura@mail.ru

Bukin Yuriy Sergeevich
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist

Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–29–23
National Research Irkutsk State Technical
University
83, Lermontov st., Irkutsk, 664074
tel.: (3952) 40–51–53
e-mail: bukininyura@mail.ru

Федорова Людмила Ивановна
аспирант

Иркутский государственный аграрный
университет имени А. А. Ежевского
664007, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 59
тел.: (3952) 29–06–60
e-mail: ludiko@list.ru

Fedorova Lyudmila Ivanovna
Postgraduate

Irkutsk State Agricultural University
59, Timiryazev st., Irkutsk, 664007
tel.: (3952) 29–06–60
e-mail: ludiko@list.ru

Сороковикова Наталья Вениаминовна
ведущий инженер

Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел.: (3952) 42–29–23
e-mail: nataja@lin.irk.ru

Sorokovikova Natalya Venyaminovna
Leading Engineer

Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–29–23
e-mail: nataja@lin.irk.ru