

РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени А.И.ГЕРЦЕНА

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ,
ЭКОЛОГИЯ И ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ
ЖИВОТНЫХ

Научные труды кафедры зоологии

Выпуск 11

Санкт-Петербург
2011

А.А. Поспелова, Е.Е. Прохорова, Н.В. Цымбаленко, Г.Л. Атаев

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ТРЕМАТОД РОДА *LEUCOCHLORIDIUM* С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Система «трематоды-моллюски» является одной из наиболее часто используемых моделей для анализа паразито-хозяйных отношений. Решение вопроса о специфичности взаимодействий «паразит-хозяин» напрямую зависит от точного определения их видовой принадлежности.

Партениты трематод рода *Leucochloridium* паразитируют в моллюсках *Succinea*, а мариты – в птицах отряда Воробьиные. Разветвленные материнские спороцисты трематод рода *Leucochloridium*, паразитирующие в печени моллюсков *Succinea*, демонстрируют один из интереснейших примеров мимикрии среди беспозвоночных животных. Яркоокрашенные, пульсирующие ответвления этих спороцист, заполненные метацеркариями, очень похожи на личинок насекомых. Они проникают в щупальца моллюска, промежуточного хозяина, и привлекают представителей воробьиных, являющихся окончательными хозяевами данных трематод.

Морфология и окраска ответвлений спороцист послужила основой для систематики партенит *Leucochloridium*. На территории Европы описаны два вида *Leucochloridium*: *L. paradoxum* Cagus, 1835 и *L. perturbatum* Pojmanska, 1965, с ответвлениями спороцист зеленой и коричневой окраски соответственно. Однако форма, число ответвлений спороцист, интенсивность их окраски и характер чередования темных полос на них – чрезвычайно варьирующие признаки.

Поведенческая экология, как и морфология, этих организмов находится под жестким избирательным контролем за привлекательностью для окончательного хозяина. Последнее делает представителей рода *Leucochloridium* отличной моделью для изучения эволюционной экологии паразитов. Однако исследования такого рода также зависят от решения ряда таксономических проблем. Взрослые особи *Leucochloridium* spp. трудно дифференцируемы из-за отсутствия структур, определяющих различия между видами (Pojmańska, 1963, 1967, 1978; Bakke, 1978, 1980, 1982). В связи с этим, оказывается

проблемой идентифицировать взрослых особей, основываясь на обычных морфологических признаках – цвете спороцист, числе и размерах ответвлений, ширине и рисунке чередования окрашенных и неокрашенных полос на отростках.

Для уточнения систематики рассматриваемых видов трематод, а также для оценки уровня внутривидовой изменчивости все чаще используются методы молекулярного генотипирования с применением различных ДНК-маркеров, как неспецифических, т. е. случайных, так и специфических, которые выявляют строго определенный участок ДНК – например рДНК, кодирующий рибосомные РНК.

Структурные элементы рДНК обладают различной степенью эволюционного консерватизма, наиболее вариабельными являются спейсерные последовательности. Сравнительный анализ молекулярно-генетической изменчивости этой части генома эукариот многие годы используется в качестве удобного инструмента для понимания закономерностей эволюционного процесса (Forterre et al., 2002; Hillis et al., 1996).

В настоящее время в литературе имеются немногочисленные работы, которые содержат результаты генотипирования рДНК трематод рода *Leucochloridium*. Это исследования двух групп ученых из лабораторий Великобритании, которые доложили о частичном секвенировании участка рДНК трематод рода *Leucochloridium*: часть ITS1, весь участок, кодирующий 5,8S рРНК и ITS2, а также часть участка гена 28S рРНК, особей *Leucochloridium* spp., имеющих зеленую и коричневую окраску спороцист (Casey et al., 2003); часть последовательностей гена 18S рРНК и часть гена 28S рРНК *Leucochloridium perturbatum* (Olson et al., 2003). Есть сообщение о частичном секвенировании гена 28S рРНК *Leucochloridium perturbatum*, которое осуществили ученые из Киева, Украина (Tkach et al., 2001). Все указанные нуклеотидные последовательности рДНК аннотированы в Gene Bank и доступны для сравнения с новыми результатами секвенирования ДНК трематод рода *Leucochloridium*.

Материалы и методы. *Объектом исследования* послужили партениты трематод *Leucochloridium* spp. зеленого (n=11) и коричневого (n=5) цвета, паразитирующих в гепатопанкреасе моллюсков р. *Succinea*, собранных на территории поселка Вырица Ленинградской области в 2008–2009 гг.

Выделение хромосомной ДНК осуществляли из отдельных стростков спороцист трематод *Leucochloridium* spp. Ткани гомогенизировали в буфере А (10 мМ трис-Cl, pH 8.0; 0.1 М ЭДТА; 0.25 М сахараза) и центрифугировали при 1600g в течение 10 минут. Полученный осадок ресуспендировали в буфере А, наслаивали на 1.5М сахарозную подушку, содержащую 10 мМ трис-Cl, pH 8.0; 0.1М ЭДТА, и центрифугировали в течение 1 ч при 5000 об/мин и 4°C. Осадок ядер ресуспендировали в буфере В, содержащем 10 мМ трис-Cl, pH 8.0; 0.1М ЭДТА, добавляли панкреатическую РНК-азу до концентрации 20 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. К лизату добавляли протеиназу К до конечной концентрации 100 мкг/мл; SDS до конечной концентрации 5 мг/мл и инкубировали при 56°C 2 часа. Экстракцию ДНК проводили смесью фенол-хлороформ (1:1) и двукратной обработкой смесью хлороформ – изоамиловый спирт (24:1). Органическую и водную фазы разделяли центрифугированием при 1600g, 4°C в течение 15 минут. Высокополимерную ДНК осаждали двумя объемами охлажденного 96% этанола. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали до отсутствия запаха этанола, который определяли органолептически, и растворяли в минимальном количестве ТЕ-буфера (10 мМ трис-Cl, pH 7.4 и 0.1 мМ ЭДТА).

Электрофоретический анализ ДНК осуществляли в агарозе, приготовленной на TBE-буфере, pH 8.0, содержащем 0.089М трис-Cl, 0.089М борную кислоту и 0.002М ЭДТА, с 0.5 мкг/мл бромистого этидия по стандартной методике (Sambrook et al., 1991).

Аmplификацию рДНК осуществляли методом полимеразной цепной реакции (Simpson et al., 1993). Специфические праймеры для амплификации подбирали с помощью программы *Gene Runner 3.0* (<http://www.genereunner.com>).

Секвенирование образцов ПЦР-продуктов, полученных с помощью специфических праймеров выполнено в коммерческой фирме «Синтол» (127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42).

Результаты и их обсуждение. Моллюски *Succinea* для исследования были собраны в районе поселка Вырица Ленинградской области в 2008–2009 гг. Зараженные моллюски и спороцисты трематод р. *Leucochloridium* с ответвлениями зеленой и коричневой окраски были каталогизированы и помещены на хранение при –75°C.

Работа выполнена на индивидуальных препаратах хромосомной ДНК из 16 спороцист трематод *p. Leucochloridium*: 5 – из особей с коричневой окраской отростка и 11 – с зеленой окраской. Для исследований по генотипированию выравнивание концентрации ДНК во всех взятых в рассмотрение образцах проводили с помощью программы **Scion Image**.

Для подбора специфических праймеров на участок рДНК, включающий нуклеотидные последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) и последовательности, кодирующие 5,8 S рРНК трематод *Leucochloridium* spp. (рис. 1), использовали ресурсы базы данных **Gene Bank**.

На момент начала наших исследований (октябрь 2009 г.) в Gene Bank были представлены пять последовательностей нуклеотидов рДНК трематод *p. Leucochloridium*, соответствующие разным участкам рибосомных генов (табл. 1).

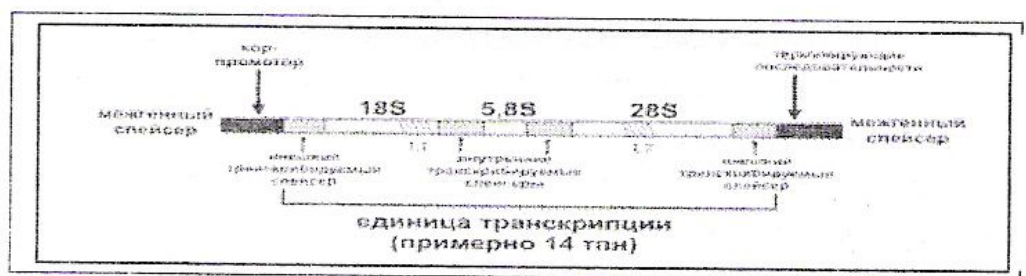


Рис. 1. Организация транскрипционной единицы рДНК

(L1 и L2 – прямой и обратный праймеры для амплификации фрагмента рДНК, содержащего внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2), а также последовательности, кодирующие 5,8S рРНК)

Для подбора специфических праймеров L1 и L2 мы использовали последовательность AY258145.1., которая включает в себя участки внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК (ITS1 и ITS2) и последовательности, кодирующие 5,8 S рРНК (рис. 1, табл. 1). Именно этот участок рДНК отличается наибольшей вариабильностью и изменчивостью, что дает возможность обнаружить отличия между особями, которые относятся к разным видам одного и того же рода. В таблице 2 приведены характеристики праймеров L1 и L2, которые использовали при сравнительном анализе ДНК особей *Leucochloridium* spp. с зелеными и коричневыми спороцистами.

На всех 16 матрицах ДНК, выделенных из индивидуальных

спороцист *Leucochloridium* spp. зеленого и коричневого цвета, в реакциях амплификации с указанными специфическими праймерами были получены ПЦР-продукты ДНК, размеры которых, как видно из рисунка 2, находятся в диапазоне расчетной длины – 921 п.н. (табл. 2).

Нуклеотидные последовательности ПЦР-продуктов, полученных на всех шестнадцати образцах ДНК трематод разной морфологии, анализировали с помощью программы BioEdit между собой и с аннотированными в Gene Bank последовательностями рДНК.

Так, сравнение с последовательностью AY258145, руководствуясь которой подбирали специфические праймеры, по указанными в таблице 2 координатам, показало что сравниваемые последовательности рДНК гомологичны. Гомология составляет 96%. Это указывает на идентичность исследуемого ПЦР-продукта, аннотированному в Gene Bank участку рДНК *Leucochloridium* spp., по которому мы осуществляли дизайн специфических праймеров. Фрагменты рДНК *Leucochloridium* spp. одинаковой окраски, как среди коричневых, так и среди зеленых, оказались идентичными по последовательности нуклеотидов, т.е. все 11 секвеннограмм «зеленых» образцов и 5 «коричневых» гомологичны на 100%. В таблице 3 представлены для сравнения между собой по два образца (А и Б) каждой разновидности *Leucochloridium* spp.

Между последовательностями нуклеотидов в секвеннограммах ПЦР-продуктов, полученных на ДНК спороцист разной окраски, выявлены различия в районе ITS1 и ITS2, составившие 3,88% (табл. 4). На рисунке также видно, что последовательности, кодирующие 5,8S рРНК, которые расположены между обоими участками ITS1 и ITS2, как и начало последовательностей гена 28S рРНК, расположенного сразу за ITS2, гомологичны на 100%.

Таким образом, на участке, соответствующем внутренним транскрибируемым спейсерам 1 и 2 (ITS1; ITS2) рДНК *Leucochloridium* spp., были выявлены различия, составляющие 3,88% от общей длины ПЦР-фрагмента.