

- Hominik W.M. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in British soils / W.M. Hominik, B.R. Briscoe // *Parasitology*. – 1990. – Т.100, 2. – С. 295–302.
- Midutui J.S. Occurrence of entomopathogenic nematodes in the West-Vlaanderen province of Belgium / J.S. Midutui, M. Moens., A. Grisse : Abstr. [22 nd Int. Symp. Eur. Soc. Nematol.], (Ghent, 7–12 Aug.1994) // *Nematologica*. – 1995. – О.41, . 3. – N. 322.
- Mracek Z. Steinernema weiseri n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe / Z. Mracek, D. Sturhan, A. Reid // *Syst. Parasitol.* – 2003. – Т. 56, . 1. – N. 37–47.
- White G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures / G.F. White // *Science*. – 1927, .66. – P. 302–303.
- Ozer N. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Heterorhabditidae) in Turkey / N. Ozer, N.Keskin, Z.Kirbas // *Nematologica*. – 1995. – О.41, 5. – N. 639–640.

ПОЛИМОРФИЗМ ITS-УЧАСТКА РИБОСОМАЛЬНОЙ ДНК ПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД: ПОСЛЕДСТВИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

С. Э. Спиридонов, А. П. Аксенов

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова, Ленинский пр., 33, Москва, 119071, Россия,
s_e_spiridonov@rambler.ru*

Различия в нуклеотидном составе рибосомальных последовательностей в пределах одного вида, а иногда и одной особи паразитических нематод были выявлены уже в самом начале молекулярно-филогенетических исследований (Blouin *et al.*, 1992, Dame *et al.*, 1991). Позднее такой полиморфизм рибосомальных последовательностей был показан и для почвенных энтомопатогенных нематод (Spiridonov *et al.*, 2004). Нередко вариабельность на уровне вида и даже особи выявляется в последовательностях внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальной ДНК (ITS rDNA). Эти последовательности часто используются для разграничения близких видов нематод и выявления внутривидовых групп. Полиморфизм создает определенные неудобства, поскольку ПЦР-продукты, полученные при амплификации ДНК таких особей, не могут быть использованы для прямого секвенирования, так что приходится клонировать ПЦР-продукты. В то же время эта вариабельность оказывается дополнительным ценным инструментом для познания эволюционной истории вида. Такой полиморфизм является отражением взаимодействия различных факторов и процессов. Мутации в спейсерных последовательностях не подвергаются столь же жесткому отбору как домены 18S или 5.8S. В то же время отмечены случаи компенсаторных мутаций в ITS-участке, что, по-видимому, связано с необходимостью сохранения вторичной структуры формирующейся молекулы РНК. Известны также генетические механизмы, выравнивающие вариабельность по этим доменам в пределах популяции (Hillis, Dixon, 1991).

Материал и методы

В качестве пробы для проведения ПЦР использовали ДНК извлеченную из единственных особей нематод. Для этого использовали разные методы, в том числе метод с использованием протеиназы К или NaOH, и, в случае более крупных дирофилярий – колонки Wizard® DNA Clean-Up System фирмы Promega. Использовали предложенные для использования на нематодах Дж. Карраном праймеры TW81 и AB28. Лигацию и клонирование ПЦР-продуктов проводили по прописи фирмы Promega с помощью набора pGEM®-T Vector System II. Не менее 5-и белых (трансформированных) колоний использовалась для постановки ПЦР с векторными праймерами T7 и SP6. Полученный продукт этой реакции очищали и использовали для секвенирования с векторными и первоначальным праймерами. Для сравнительного анализа использовали последовательности, депонированные для соответствующих видов в ГенБанке (NCBI GenBank).

Результаты

Филогенетический анализ полученных последовательностей ITS rDNA *Haemonchus contortus* выявил существование нуклеотидных различий между отдельными клонами. Один из гаплотипов был почти идентичен (различие в одной паре нуклеотидов) последовательности *H. contortus* от овцы из пров. Внутренняя Монголия Китая. По некоторым позициям отдельные клоны отличались от других, но показывали сходство с ITS rDNA-последовательностями этого вида, выявленными в других географических точках. Так клон 2 по нескольким позициям был сходен с последовательностью *H. contortus* из Индии (Рис. 1).

```

H_cont_ChinaHQ844231 : GCATTTGTCCTT-----TAGACAATCCCATTTCAGTTC
Haemclone2          : GCATTTGTCCTT-----AAGACAATCCCATTTCAGTTC
Haemclone5          : GCATTTGTCCTT-----AAGATAATCCCATTTCAGTTC
Haemclone4          : GCATTTGTCCTT-----AAGATAATCCCATTTCAGTTC
Haemclone3          : GCATTTGTCCTT-----GAGATAATCCCATTTCAGTTC
Haemclone1          : GCATTTGTCCTT-----GAGATAATCCCATTTCAGTTC
H_cont_USA_EU086392 : GCATTTGTCCTT-----AAGACAATCCCATTTCAGTTC
AshworthiusEF467325 : GCATTTGTCCTTTCATTCAAATAAGGATAATCCCATTTCAGATC
                    GCATTTGTCCTT                    aGA AATtCCCATTTCAG TC

```

Рис.1. Часть выравнивания ITS rDNA последовательностей нематод *Haemonchus contortus*: отдельные клоны ITS rDNA нематод от козы (Монголия) в сравнении с нематодами *H. contortus* из разных географических точек.

Такие же совпадения ITS rDNA-последовательностей были отмечены между отдельными клонами *Dirofilaria immitis* (Астрахань) и последовательностями нематод этого же вида из Китая и Индии (Рис. 2).

```

DimmitisASTRAKHAN_2 : AGGCAAAT--TTTTACTTACAAATAT--GCATATTGGAATAAATAAT
DimmitisASTRAKHAN_1 : AGGCAAAT--TTTTACTTACAAATAT--GCATATTGGAATAAATAAT
DimmitisCHINA_3      : AGGCAAAT--TTTTACTTACAAATAT--GCATATTGGAATAAATAAT
DimmitisASTRAKHAN_3 : AGGCAAATACSTTTTACTTACAAATATTTACATATTGGAATAAATAAT
DimmitisASTRAKHAN_5 : AGGCAAATACSTTTTACTTACAAATATTTACATATTGGAATAAATAAT
DimmitisINDIA        : AGGCAAATACSTTTTACTTACAAATATTTACATATTGGAATAAATAAT
DimmitisCHINA_2      : AGGCAAAT--TTTTACTTACAAATAT--ACATATTAGGAATAAATAAT
DimmitisCHINA_1      : AGGCAAAT--TTTTACTTACAAATAT--ACATATTGGAATAAATAAT
DimmitisUSA          : AGGCAAAT--TTTTACTTACAAATAT--ACATATTGGAATAAATAAT
DimmitisBRASIL_1     : AGGCAAATACSTTTTACTTACAAATATTTACTTCTTGGAAATAAATAAT
DimmitisBRASIL_2     : AGGCAAATTCSTTTACTTACAAATATCTACTTCTTGGAAATAAATAAT
                    AGGCAAAT TTTtTACTTACA AATATt CaTaTtGGAATAAATAAT

```

Рис.2. Часть выравнивания ITS rDNA последовательностей нематод *Dirofilaria immitis*: отдельные клоны ITS rDNA нематод из Астраханской области в сравнении с нематодами *D. immitis* из разных географических точек.

Обсуждение

Изучение изменчивости ITS rDNA-последовательностей широко распространенных паразитических нематод позвоночных *Haemonchus contortus* и *Dirofilaria immitis*, показало, что на уровне популяции одного вида и даже одной особи, может наблюдаться существенная вариабельность в нуклеотидном составе. Отдельные такие варианты (гаплотипы) оказываются близкими к депонированным в Ген-Банке последовательностям от нематод этих же видов, но собранных в географических точках, удаленных от мест сбора нашего материала. При изучении почвенных энтомопатогенных нематод рода *Steinernema*, нами была выявлена определенная географическая приуроченность отдельных гаплотипов (европейские, азиатские и др.), а также существование популяций, в которых присутствуют 2 разных гаплотипа (Spiridonov *et al.*, 2004). Среди близких к *H. contortus* нематод-остертагиин позвоночных такая вариабельность ITS rDNA может проявляться как наличие нескольких видов вставок длиной около 100 п.н. (Constantine, 2002). Мы не обнаружили у *H. contortus* и *D. immitis* таких крупных вставок, а лишь различия по нескольким позициям. Можно предположить, что гаплотипы сформировались в результате единичных эволюционных событий, а затем, в результате их распространения, могли образовываться смешанные формы, в особях которых были представлены разные гаплотипы.

Литература

- Blouin, M. S., J. B. Dame, C. A. Tarrant and C. H. Courtney. Unusual population genetics of a parasitic nematode: mtDNA variation within and among populations. *Evolution*, 1992, vol. 46, p. 470–476.
- Constantine C.C. Molecular markers, analysis and the population genetics of parasites. Doctor of Philosophy thesis, Murdoch University, 2002, 141 pp.
- Dame, J. B., C. A. Yowell, C. H. Courtney and W. G. Lindgren. Cloning and characterization of the ribosomal RNA gene repeat from *Ostertagia ostertagi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1991, vol. 5, p. 275–280.
- Hillis, D. M. and M. T. Dixon (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly review of Biology*, 1991, vol. 66, p. 411–453.
- Spiridonov, S.E., Reid A.P., Podrucka K., Subbotin S.A., Moens M. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda, Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1+5.8S+ITS2 region of rDNA and morphological features. *Nematology*, 2004, vol. 6, p. 547–566.