

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *WOLBACHIA* ОТ НЕМАТОД *DIROFILARIA IMMITIS*, ПАРАЗИТИРУЮЩИХ В СЕРДЦЕ СОБАК В АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ

С. Э. Спиридонов<sup>1</sup>, О. В. Бойко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова, Ленинский пр., 33, Москва, 119071, Россия, [s\\_e\\_spiridonov@rambler.ru](mailto:s_e_spiridonov@rambler.ru)

<sup>2</sup>ГОУ ВПО «Астраханский государственный университет», Шаумяна пл., 1, Астрахань, 414000, Россия, [oboyko08@mail.ru](mailto:oboyko08@mail.ru)

Бактерии рода *Wolbachia* – это внутриклеточные альфапротеобактерии относящиеся к отряду Rickettsiales. По данным молекулярной филогенетики они близки к таким родам, как *Anaplasma*, *Ehrlichia* и *Rickettsia*. Значительный интерес к изучению вольбахий связан, в первую очередь, с развитием удивительных и разнообразных механизмов влияния вольбахий на их хозяев – беспозвоночных. Среди результатов воздействия вольбахий на хозяев отмечены такие феномены, как феминизация, партеногенез, непригодность спермы для оплодотворения яиц своего же вида, а также полное вымирание самцов. Эволюционное разнообразие вольбахий связано с их способностью передаваться от одной группы хозяев к другой. По недавним оценкам (Werren *et al.*, 2008) более половины видов насекомых могут заключать в себе вольбахий, что делает последних самым крупным родом внутриклеточных бактерий.

Вольбахии нематод образуют, как минимум, 3 линии из 7–8 основных эволюционных линий вольбахий (Werren *et al.*, 2008). Яркой особенностью большей части вольбахий нематод является мутуалистический характер их взаимоотношений с хозяином. Хотя природа воздействия вольбахий на нематоду-хозяина неизвестна (Fenn, Blaxter, 2006), введение антибиотиков позвоночному хозяину, пораженному филяриями, приводит к нарушению процесса линьки микрофилярий, снижению репродуктивных способностей взрослых нематод и др. (Strübing *et al.*, 2010). Было показано, что зависимость филярий от вольбахий открывает значительные перспективы контроля филярий с помощью антибиотиков (Taylor, 2000, Rossi *et al.*, 2010). Известно также, что вызываемые паразитизмом филярий воспалительные реакции связаны скорее с ответом позвоночного на белки поверхности вольбахий, чем ответом собственно на нематод (Taylor *et al.*, 2000).

## Материал и методы

Самец и самка *Dirofilaria immitis* были гомогенизированы, после чего общую ДНК извлекали с помощью наборов Wizard® DNA Clean-Up System (Promega™). Для амплификации (ПЦР) бактериальной ДНК использовали пары праймеров *groELf* (GGTGAGCAGTTRCARSAAGC) и *groELr* (AGRTCTTCCATYTTTRATTCC), *WSP81F* (TGGTCCAATAAGT GATGAAGAAAC) и *WSP691R* (AAAAATTAACGCTACTCCA); *ftsZF* (CTTGGTGCTGGTGCTTTGCCT) и *ftsZR* (TACCAATCATTGCTTTAC CCA); *ftsZUNIF* (GGYAARGGTGCRGCAGAAGA) и *ftsZUNIR* (ATCRATRCCAGTTGCAAG), а также *WSPFILF* (CGCTTGCAAGT ACAATAGTGAG) и *WSPFILR* (GCTTCTGCACCAATAGTGCT). Последняя пара праймеров амплификации с имеющимися гомогенатами не дала. Полученные ПЦР-продукты очищали в геле, выделяли с помощью колонок и преципитации и секвенировали с теми же праймерами, что и для ПЦР.

## Результаты

Праймеры *groELf* и *groELr* дали ПЦР-продукт длиной около 900 п.н., праймеры *WSP81F* и *WSP691R* – около 730 п.н., праймеры *FtsZF* и *FtsZR* – около 550 п.н. и праймеры *FtsZUNIF* и *FtsZUNIR* – около 800 п.н. Полученные последовательности были использованы для анализа с помощью опции BLAST в базе данных NCBI GenBank. Все полученные последовательности оказались идентичными или почти идентичными соответствующим последовательностям бактерий рода *Wolbachia* от нематод *D. immitis*.

Последовательности генов *wsp* и *groEL* считаются наиболее изменчивыми в пределах рода *Wolbachia*. Тем не менее, полученная нами *groEL*-последовательность была полностью идентична *groEL*-последовательности нематоды *Dirofilaria immitis* из Италии (AJ558023 – см. Bazzocchi *et al.*, 2004). Подученные нами последовательности гена *wsp* кодирующего поверхностные белки отличаются от таковых нематод *Dirofilaria immitis* из Италии (AJ252062 – см. Bazzocchi *et al.*,

2000) по 4 позициям (Рис.1), однако сравнение с последовательностями симбиотических *Wolbachia* от других нематод рода *Diroflaria*, показывает, что исследованные нами бактерии наиболее близки именно к симбионтам нематоды *Diroflaria immitis* (Рис. 2). Полученные нами последовательности гена FtsZ идентичны последовательностям этого гена нематод *Diroflaria immitis* из США (AY523519).

```
wsp_DimmitisITALY      : ACTGTTGGCACAGAAGCTGGGTTAATGTTTAATTTTTTA
wsp_DimmitisAstrakhan : ACTGTTGGCACAGAAGCTGGAGTAGCGTTTAATTTTTTA
                        ACTGTTGGCACAGAAGCTGG TA GTTTAATTTTTTA
```

**Рис.1.** Часть выравнивания последовательностей *wsp*-гена *Wolbachia*, полученных от нематоды *Diroflaria immitis* из Италии и Астраханской области.

```
wsp_DimmitisITALY      : AAAAGAAGAGTGC AAAATGCTAATCTAACTACTGAAAATGATC---AGCAGCCTATTAAAGACGGAAATTA
wsp_DimmitisAstrakhan : AAAAGAAGAGTGC AAAATGCTAATCTAACTACTGAAAATGATC---AGCAGCCTATTAAAGACGGAAATTA
wsp_Drepens            : AAAAGAAGAATGCACGATCTGATCTAACTACTGAAAAGTGGTC---AACCACTTCTAAAGACGGAAATCAA
wsp_Dursi              : AAAAGAAGAATGCAGATACTAATCTAACTACTGAAAAGTGGTC---AGCAGCCTACTAAAGACGGAAATCAA
wsp_Onchocerca         : AAAAGATAGTTACTTTGATGATATAATAGGAAAACSTTTTCSTTTAACTGCACACTATTAACTGATGCAA
                        AAAAGAaga TgCa t cT ATgTAAactactgAAA Tg tC A CagCcta TAAagACgGAat AA
```

**Рис. 2.** Часть выравнивания последовательностей *wsp*-гена бактерии рода *Wolbachia* полученных от нематоды *Diroflaria immitis*, с аналогичными последовательностями других вольбахий от *Diroflaria* и *Onchocerca*.

### Обсуждение

Наиболее удивительным для нас результатом изучения *Wolbachia* – симбионтов нематод *Diroflaria immitis* от собак Астраханской области является их почти полная идентичность соответствующим последовательностям вольбахий этих же нематод из других регионов мира. Исследование астраханских *D. immitis* показало значительный уровень внутривидового полиморфизма по ITS rDNA (см. сообщение Спиридонова и Аксенова в этом же сборнике). Такой полиморфизм может рассматриваться как свидетельство сложной эволюционной истории и популяционной структуры вида *D. immitis*. Удивительно, что генетическое разнообразие нематод, не отражается на разнообразии их симбиотических бактерий.

*Исследования по эволюционным взаимоотношениям нематод и бактерий поддерживаются грантом РФФИ 11-04-00590а и Программой фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга».*

### Литература

- Bazzocchi, C., Jamnongluk, W., O'Neill, S.L., Anderson, T.J., Genchi, C., Bandi, C. Wsp gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. *Current Microbiology*, 2000, vol. 41, p. 96–100.
- Bazzocchi, C., Lecchi, C., Kramer, L.H., Genchi, C., Bandi, C. Sequencing of the complete gene coding for the GroEL of the *Wolbachia* of *Dirofilaria immitis* and expression and purification of the recombinant protein. *Parassitologia*, 2004, vol. 46, p. 307–310.
- Fenn, K., Blaxter, M. *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends in Parasitology*, 2006, vol. 22, p. 61–65.
- Rossi M.I.D., Paiva J., Bendasc, A., Mendes-de-Almeida, F., Knackfuss, F., Miranda, M., Guerrero, J., Fernandes, O., Labarthea, N., Effects of doxycycline on the endosymbiont *Wolbachia* in *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). Naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 2010, vol. 174, p. 119–123.
- Strübing U., Lucius, R., Hoerauf, A., Pfarr, K.M. Mitochondrial genes for heme-dependent respiratory chain complexes are up-regulated after depletion of *Wolbachia* from filarial nematodes. *International Journal for Parasitology*, 2010, vol. 40, p. 1193–1202.
- Taylor, M.J. Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem: *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes in the pathogenesis of disease and as a target for control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000, vol. 94, p. 596–598.
- Taylor, M.J., Bandi, C., Hoerauf, M., Lazdins, J. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: A target for control? *Parasitology Today* 2000, vol. 16, no. 5, 179–180.

Werren, J. H., Baldo, L., Clark, M.E.. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews, microbiology*, 2008, vol. 6, p. 741-751.

## ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ХИТИН-ХИТОЗАНОВОГО ОЛИГОМЕРА С ФРАГМЕНТАМИ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В СИСТЕМЕ ТОМАТЫ – ГАЛЛОВАЯ НЕМАТОДА

Ж. В. Удалова<sup>1</sup>, Н. И. Васюкова<sup>2</sup>, Н. Г. Герасимова<sup>2</sup>, С. В. Зиновьева<sup>1</sup>, О. Л. Озерецковская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центр паразитологии ИПЭЭ РАН

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский пр., 33, [udalova.zh@rambler.ru](mailto:udalova.zh@rambler.ru)

Одним из перспективных направлений в защите растений является индуцирование у растений устойчивости к болезням и стрессам с помощью элиситоров. Биополимер хитозан является одним из наиболее эффективных элиситоров, вызывая как локальную (в местах внедрения патогена), так и системную индуцированную устойчивость (СИУ). Для СИУ характерно продолжительность действия во времени и эффективность против широкого круга патогенов. В настоящее время признано, что одной из ключевых молекул сигнального пути формирования индуцированной устойчивости является салициловая кислота (СК), однако исследование ее роли осложняется тем, что в каждой патосистеме существует своя специфика участия СК в индуцировании защитных механизмов. В настоящее время имеется много данных, показывающих, что СК играет центральную роль в защите растений от биотрофных патогенов, которые питаются живыми клетками хозяина. Участие СК в создании иммунного статуса растения связывают с высокой мобильностью молекулы, способной выступать в роли медиатора, воспринимающего, умножающего и передающего информацию из клетки, атакуемой патогеном, на ее генетический аппарат, где происходит экспрессия защитных генов; со способностью ингибировать активность каталазы – фермента, детоксицирующего перекись водорода, что приводит к «окислительному взрыву» в месте атаки патогеном или обработки элиситором; с возможностью подавлять образование жасмоновой кислоты и жасмонатов и, как следствие, индуцируемое ими образование защитных белков.

Содержание СК в тканях растений при действии на них патогенов или элиситоров возрастает в десятки раз. Этот процесс называется «салицилатным взрывом». СК накапливается в растительных тканях только в ответ на инфицирование и не увеличивается при поранении.

Нами были получены данные, которые показали увеличение количества СК в тканях инвазированных галловой нематодой томатов, обработанных биогенными элиситорами (2). На этой же паразито-хозяинной системе томаты – галловая нематода было показано, что различные способы обработки томатов СК (погружение корней в раствор, опрыскивание растений, внесение под корень) снижает зараженность корней галловой нематодой. Это указывает на то, что СК может быть фактором устойчивости растений к нематодам (5).

Ранее нами было установлено, что хитозан повышал содержание свободной формы салициловой кислоты (СК), являющейся важным медиатором сигнальных систем в тканях картофеля, инфицированного фитофторой и томатов, инфицированных галловой нематодой. Добавление СК к хитозану усиливало его способность стимулировать защиту растений в отношении исследованных патогенов. Сравнительный анализ биологической активности в системе картофель-фитофтора нескольких производных хитин-хитозанового олигомера с фрагментами молекулы СК показал, что наиболее активным был препарат N-(2-гидрокси-3-метоксибензил)-N-пиридоксхитозан (в дальнейшем будем называть его R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>-хитозан), содержащий в своей цепи два фрагмента салициловой кислоты. Он стимулировал как защиту от фитофтороза, так и раневую репарацию тканей картофеля (2, 3).

Целью настоящей работы было сравнение эффективности действия хитозана, СК, их комбинации и модифицированного хитозана – R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>-хитозана.

### Материалы и методы

Лабораторные исследования действия низкомолекулярного хитозана (5 кДа), R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>-хитозана, СК проводились в патологической системе томаты – галловая нематода (*Meloidogyne incognita*). Препараты хитозана предоставлены Центром «Биотехнологии». Исследовали устойчивые (F1 Шаганэ) и восприимчивые (F1 Гамаюн) к галловой нематоды гибриды томатов. Обработку проводили замачиванием семян с последующим опрыскиванием вегетирующих растений растворами препара-