

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИЧИНОК ТРЕМАТОД СЕМЕЙСТВА *SCHISTOSOMATIDAE*

С.В. Ризевский, Л.Н. Акимова, В.П. Курченко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Существующая в нарочанском регионе острая эколого-медицинская проблема шистосомного дерматита делает изучение разнообразия опасных для человека трематод семейства *Schistosomatidae* актуальной задачей. В связи с этим, весьма важно: точное определение видовой принадлежности паразитов, сравнение трематод из водоемов Беларуси с другими европейскими представителями и изучение существующего полиморфизма между популяциями одного вида. Использование для идентификации церкарий шистосоматид классических морфологических методов затруднительно, и требует высокой квалификации специалиста. Определение таксонов ниже рода с помощью морфологических методов изучения только личиночной стадии зачастую вообще невозможно.

Возбудителями шистосомного дерматита в Европе являются церкарии группы «*Trichobilharzia ocellata*», принадлежащие семейству *Schistosomatidae* [1, 2, 3]. Группа включает, по меньшей мере, три вида: *T. szidati* (Neuphaus 1952), *T. franki* (Muller и Kimming 1994), *T. regenti* (Horak, Kolarova и Dvorak 1998). Патогенное действие на человека личинок другого рода шистосоматид – *Bilharziella polonica* (Kowalewsky, 1895) в полной мере не доказано и остается предметом дискуссий. Существующая путаница и неоднозначность мнений различных авторов насчет таксономического статуса церкарий группы «*Trichobilharzia ocellata*» заставляет применять новые методы исследований, основанные не только на морфологических показателях, но и на молекулярно-генетических особенностях этих организмов. Такие современные молекулярно-генетические методы исследования как полимеразная цепная реакция в ее различных вариациях (ПЦР со специфическими праймерами и RAPD-анализ) и анализ нуклеотидных последовательностей маркерных участков генома позволяют точно определить таксономическое положение биологического объекта, выяснить филогенетические взаимоотношения между группой организмов, а также судить об уровне внутривидового генетического полиморфизма между особями разных популяций.

Целями и задачами данной работы являлись:

1. Выяснение филогенетических взаимоотношений между представителями фуркоцеркарий трех семейств трематод – *Strigeidae*, *Schistosomatidae*, *Diplostomatidae* - и определение положение церкарий неясной таксономической принадлежности с помощью RAPD-анализа.
2. Подтверждение принадлежности исследованных церкарий шистосоматид к роду *Trichobilharzia* с помощью метода ПЦР с родоспецифическими праймерами.
3. Выяснение видовой принадлежности церкарий группы «*T. ocellata*» на основании анализа размеров первого и второго внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS-1 и ITS-2), а также всего ITS-участка, полученных в результате амплификации.
4. Сравнение нуклеотидных последовательностей ITS-2 исследованных трематод с последовательностями ITS-2 церкарий других европейских стран.
5. Изучение внутривидового полиморфизма между особями церкарий «*Trichobilharzia ocellata*» из популяций двух водоемов – озера Нарочь и озера близ деревни Полоневичи - на основании данных RAPD-ПЦР и анализа полученных нуклеотидных последовательностей.

Материалы и методы

Объект исследования. Церкарии трематод различных родов и семейств были получены из зараженных моллюсков *Lymnaea stagnalis*, *Radix auricularia*, *Radix ovata*, *Planorbarius corneus* и др., собранных в период с мая по октябрь 2007 на озере Нарочь (54° 53' с.ш., 26° 41' в.д.) и на озере близ деревни Полоневичи Держинского района Минской области (53° 38' с.ш., 26° 57' в.д.). Материал помещали в 70% этанол и хранили при -20°C.

Морфологическая идентификация живых церкарий проводилась с использованием микроскопа Zeiss Axiostar plus (Германия). Для детализации внутреннего строения использовался витальный краситель - нейтральный красный. Пробы, предварительно хранившиеся в этаноле, глубокой морфологической идентификации не подвергались ввиду определенных трудностей, связанных с изменениями препарата при длительном хранении.

В качестве объекта исследования использовали церкарии трематод 6 родов из 4 семейств: сем. *Schistosomatidae*: *Bilharziella polonica*, *Trichobilharzia* sp.; сем. *Strigeidae*: *Cotylurus* sp.; сем. *Diplostomatidae*: *Diplostomum* sp., *Tylodelphys* sp.; сем. *Echinostomatidae*: *Echinostoma* sp.

Также в работе исследовались церкарии неясной таксономической принадлежности, выделенные из проб, хранившихся в 70% этаноле. Предварительно эти объекты были идентифицированы как церкарии шистосоматид, однако, в свете наших сегодняшних представлений есть объективные причины для сомнения в достоверности этих данных. Во избежание неправильной оценки эти объекты в работе обозначили как cercaria 1, cercaria 2, cercaria 3, cercaria 4 и cercaria 5.

Выделение ДНК. Из печени инвазированного моллюска под бинокулярным микроскопом извлекали спороцисты и отдельные церкарии. Их промывали несколько раз в бидистиллированной воде для предотвращения загрязнения проб посторонней ДНК. Затем спороцисты и церкарии помещали по одному экземпляру в пробирки для ПЦР, куда вносили 50 мкл 5% водной суспензии Chelex 100 (Bio Rad). В смесь добавляли 1 мкл протеиназы К до конечной концентрации в смеси 100 мкг/мл и инкубировали при 65°C 30 минут. Смесь перемешивали на Vortex каждые 10 минут. После этого смесь термостатировали 8 минут при 99°C и центрифугировали на микроцентрифуге Eppendorf (США) 3 минуты при 12500 об/мин. Надосадочную часть переносили в новые пробирки и хранили выделенную ДНК при -20°C.

ПЦР с RAPD-праймерами. Для исследования церкарий *Trichobilharzia*, полученных из инвазированных моллюсков из двух различных водоемов, был применен RAPD-ПЦР с праймерами OpB-01 (5'-GTTTCGCTCC-3'), OpE-06 (5'-AAGACCCCTC-3'), OpF-05 (5'-CCGAATTCCC-3'). ПЦР проводили в смеси, объемом 20 мкл. Смесь содержала: 180 мкМ dNTP, 750 мкМ праймера, 3,0 мМ MgCl₂, 1x Taq Buffer (10мМ Tris-HCl, 50мМ KCl, 0.8% Nonidet P40), 1 ед. Taq-polymerase, 2 мкл р-ра ДНК. ПЦР проводили в режиме: 94°C 4 мин, 40 циклов (94°C 1 мин, 38°C 1 мин, 72°C 2 мин). Получаемые в результате продукты разделяли методом электрофореза в 2% агарозном геле. По полученным электрофореграммам определяли количество общих и уникальных ПЦР продуктов для каждой из исследованных проб. Размер фрагментов определяли с помощью программы FragneNT Analisis Aplicacion v 1.1a (Molecular Dynamics) путем сравнения со стандартом 1Kbp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Учитывалось общее количество амплифицированных фрагментов (N), количество полиморфных фрагментов (Np). На основании наличия или отсутствия фрагмента определенного размера для каждой пары проб вычислялись коэффициенты подобия (SC) по формуле $SC_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, где N_{xy} – количество общих фрагментов для проб x и y, N_x и N_y – количество фрагментов для проб x и y, соответственно [4]. Генетическое расстояние (GD) вычисляли по формуле $GD_{xy} = 1 - SC_{xy}$. SC и GD

вычисляли с использованием программы Treecon for Windows v 1.3b [5]. Данные по генетическим расстояниям для всех исследованных проб объединяли в матрицу попарных расстояний, на основании которой строили филограмму в программе MEGA 4 [6] методом Neighbour Joining [7]. Статистическую достоверность топологии полученных филогенетических деревьев определяли методом Bootstrap test [8] в программе Treecon. Индексы бутстрэпа, подсчитывали для 1000 псевдореplik. В качестве внешней группы использовали пробу *Echinostoma sp.* Уровень полиморфизма определяли по формуле $P=Np/N$.

ПЦР с родоспецифическими для *Trichobilharzia* праймерами. В ходе работы использовали специфичные для рода *Trichobilharzia* праймеры T1323-1 (5'-GTGACTTGCTACAGGTTGG-3'), T1323-2 (5'-GACGACAATAGTTGGGGT-3') и T1323-R (5'-GGCAAGCTCGTATACCATTC-3'), описанные в литературе [9]. ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Смесь содержала: 180 мкМ dNTP, 500 мкМ каждого праймера, 3,5 мМ MgCl₂, 1x Taq Buffer (10мМ Tris-HCl, 50мМ KCl, 0.8% Nonidet P40), 1 ед. Taq-polymerase, 5 мкл р-ра ДНК. ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (Россия) в режиме: 95°C 4 мин, 36 циклов (95°C 1 мин, 55°C 1 мин, 72°C 1 мин), 72°C 10 мин. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Визуализацию результатов проводили на гель-сканере VDS-CL (Amersham Biosciences).

ПЦР с ITS-праймерами. Применение ПЦР с ITS-праймерами основано на том, что участки генома, содержащие фрагменты, кодирующие рибосомальные РНК, имеют в своем составе как консервативные (собственно, участки, кодирующие рРНК), так и вариабельные спейсерные последовательности (рис 1). Консервативные участки позволяют подобрать праймеры для амплификации всей ITS-области и отдельных ее частей. Благодаря вариабельным участкам, получаемые в результате ПЦР продукты у различных организмов могут различаться по величине и иметь различные последовательности. Фрагмент ДНК ITS-2, наряду с ITS-1, является наиболее часто используемым маркером в филогенетических исследованиях близкородственных организмов. Данные маркеры являются подходящими для определения систематического положения птичьих шистосоматид, что неоднократно описано в литературе [10 - 13].

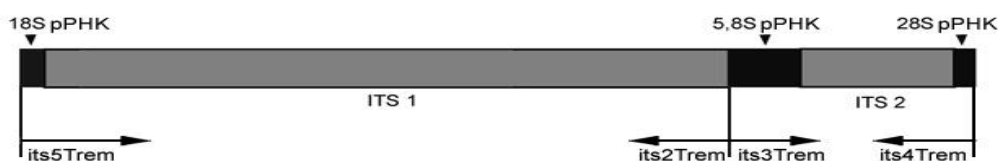


Рисунок 1 – Схема ITS-области трематод. Черным цветом показаны участки, кодирующие рРНК. Серым - вариабельные последовательности. Стрелками - места и направления отжига праймеров

Была проведена амплификация ДНК *Trichobilharzia* с тремя парами ITS-праймеров – its5Trem и its4Trem; its5Trem и its2Trem; its3Trem и its4Trem, описанными в литературе [10] и имеющими нуклеотидные последовательности: its5Trem (5'-GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), its4Trem (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), its3Trem (5'-GCGTCGATGAAGAGTGCAGC-3'), its2Trem (5'-GCTGCACTCTTCATCGACGC-3'). ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Смесь содержала:

180 мкМ dNTP, 500 мкМ каждого праймера, 3,5 мМ MgCl₂, 1x Taq Buffer (10мМ Tris-HCl, 50мМ KCl, 0.8% Nonidet P40), 1 ед. Taq-polymerase, 5 мкл р-ра ДНК. ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (Россия) в режиме: 95°C 4 мин, 36 циклов (95°C 1 мин, 55°C 1 мин, 72°C 1 мин), 72°C 10 мин. Применяя праймеры в разных комбинациях, был амплифицирован полный ITS-участок, а также его части: ITS-1 и ITS-2. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Определение нуклеотидной последовательности.

Фрагмент, содержащий ITS-2, был получен в результате амплификации ДНК *Trichobilharzia* с праймерами ITS3seq (5'-GTAAACGACGGCCAGTGCCTCGATGAAGAGTGCAGC-3') и ITS4seq (5'-CAGGAAACAGCTATGACTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). ПЦР-продукт выделяли из агарозного геля с использованием набора реактивов DNA Extraction Kit (Fermentas). Затем секвенировали в обоих направлениях, используя набор реактивов CycleReader Auto DNA Sequencing Kit (Amersham), меченые Cy5 праймеры Oligo1 (5'-GTAAACGACGGCCAGT-3'), Oligo2 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') и автоматический секвенатор ALFexpress II (Amersham). Множественное выравнивание последовательностей и построение филограмм проводили с помощью программы MEGA 4 [6]. Филограммы строили с помощью алгоритма Neighbour Joining [7], статистическую достоверность топологии полученных филогенетических деревьев определяли методом Bootstrap test [8] в программе Treecon [5]. Индексы бутстрэпа, подсчитывали для 1000 псевдореплик.

Для сравнительного анализа использовали нуклеотидные последовательности ITS-2 из GenBank: *Trichobilharzia szidati* (AY713961, AY713965, AY713967, AY713968, AY713972, EF094530, EF094536, EF094541); *Trichobilharzia franki* (AY713964, AY713966, AY713969, AY713973); *Trichobilharzia regenti* (EF094533, EF094534, EF094535, EF094537, EF094538, EF094540); *Bilharziella polonica* (EF094539); *Allobilharzia visceralis* (DQ067561); *Dendritobilharzia sp.* (AY713962); *Gigantobilharzia sp.* (AY713963); *Schistosoma mansoni* (AF531314); *Echinostoma sp.* (AF026791).

Результаты и их обсуждение

В результате RAPD-PCR с тремя различными праймерами было получено от 27 до 34 различных фрагментов (рис. 2). Для расчетов генетического расстояния и для построения филограмм в анализе использовались фрагменты размером 290 – 2300 пар нуклеотидов. В целом учитывалось 586 амплифицированных фрагментов.

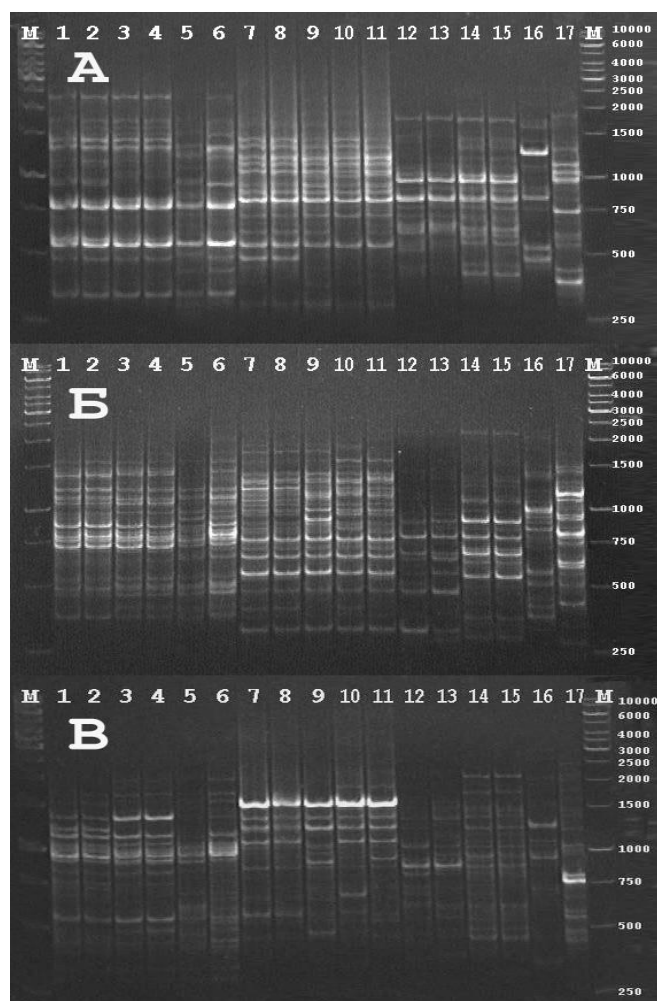


Рисунок 2 – Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами А - Opb-01, Б – Ope-06, В – Opf-05. Дорожки: 1 – cercaria 4; 2 – cercaria 5; 3 – Diplostomum sp. 1; 4 – Diplostomum sp. 2; 5 – Tylodelphys sp. 1; 6 – Tylodelphys sp. 2; 7 – Cotylurus sp. 1; 8 – Cotylurus sp. 2; 9 – cercaria 1; 10 – cercaria 2; 11 – cercaria 3; 12 – Trichobilharzia sp. 1; 13 – Trichobilharzia sp. 2; 14 – Trichobilharzia sp. 3; 15 – Trichobilharzia sp. 4; 16 – Bilharziella polonica; 17 – Echinostoma sp.; М – стандарт 1Kbp DNA Ladder

Для количественной оценки RAPD-полиморфизма и определения дивергенции между исследованными объектами полученные данные были представлены в виде суммарной матрицы состояния бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в

RAPD-спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно. На основании суммарной матрицы RAPD-спектров с помощью программы Треезон определены генетические расстояния между исследованными объектами. Полученные данные были сведены в матрицу попарных генетических расстояний. На основе матрицы попарных генетических расстояний методом ближайшего соседа (Neighbour-Joining) построили дендрограмму, демонстрирующую филогенетические отношения между исследованными образцами (рис. 3).

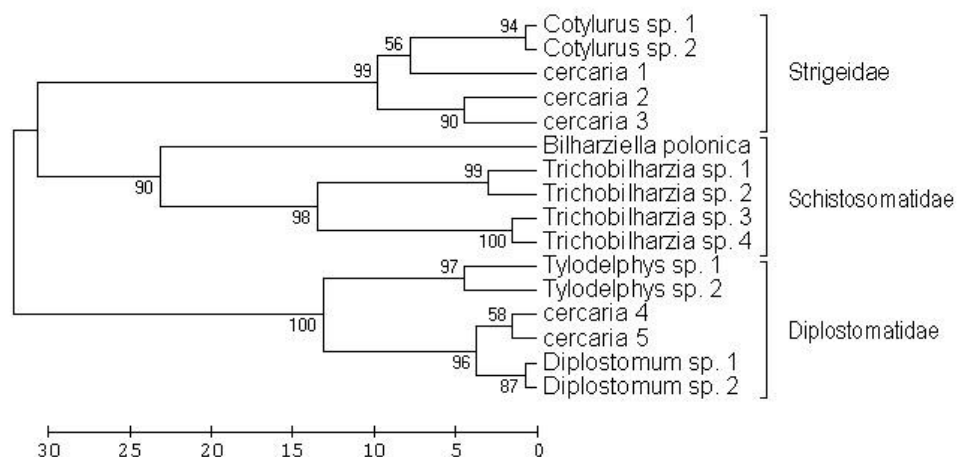


Рисунок 3 – Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между исследованными трематодами, построенная на основании анализа генетических расстояний

В результате исследованные трематоды образовали 3 достоверно разнесенных группы, соответствующие трем семействам трематод: *Strigeidae*, *Diplostomatidae* и *Schistosomatidae*. Важно отметить, что церкарии неопределенной таксономической принадлежности попали в группы, соответствующие семействам *Strigeidae* (для cercaria 1-3) и *Diplostomatidae* (для cercaria 4 и 5), хотя по предварительному морфологическому определению были отнесены к *Schistosomatidae*. Этот факт подтверждает преимущество молекулярно-генетических методов (в частности, RAPD-анализа) при установлении таксономического положения морфологически слабо различающихся организмов и биологического материала, идентификация которого невозможна в силу изменений, наступивших в результате длительного хранения. Высокий уровень достоверности топологии построенного филогенетического дерева позволяет с уверенностью отнести эти церкарии к семействам *Strigeidae* и *Diplostomatidae*. Церкарии *Trichobilharzia* и *Bilharziella* образовали обособленную группу, соответствующую семейству *Schistosomatidae* и их ДНК использовалась в дальнейшем исследовании.

Определение видовой принадлежности церкарий семейства *Schistosomatidae*. Для подтверждения принадлежности исследованных шистосоматид к роду *Trichobilharzia*, выделенная из церкарий ДНК была амплифицирована с родоспецифическими праймерами. T1323-1 и T1323-R (рис. 4). В качестве негативного контроля использовали ДНК,

выделенную из церкарий трематод семейств *Strigeidae* и *Diplostomatidae*. Также была амплифицирована ДНК из *Bilharziella polonica*.

В результате амплифицировалась ДНК, выделенная из церкарий *Trichobilharzia* (дорожки 1 и 2). Наличие специфических продуктов (~ 200 и ~ 600 пар нуклеотидов) согласовывалось с данными литературы [9] и доказывало родовую принадлежность исследованных церкарий. ДНК, выделенная из церкарий семейств *Diplostomatidae* и *Strigeidae*, не давала продуктов амплификации (на фореграмме представлены результаты только для *Strigeidae* – дорожка 4).

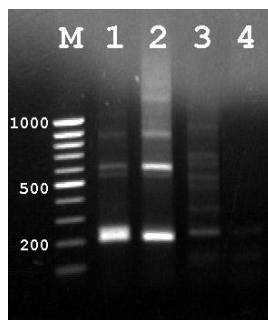


Рисунок 4 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *Trichobilharzia* из *L. stagnalis* (дорожка 1), *Trichobilharzia* из *R. auricularia* (дорожка 2), *Bilharziella* из *P. corneus* (дорожка 3) и церкарии сем. *Strigeidae* из *P. corneus* (дорожка 4) с праймерами T1323-1 и T1323-R. Дорожка М - стандарт 1Kbp DNA Ladder

ДНК *Bilharziella* давала в результате ПЦР слабую амплификацию и большее число продуктов, по сравнению с *Trichobilharzia*. Использование данных праймеров для *Bilharziella* в литературе не описано, и полученные данные свидетельствуют о близком родстве этих двух родов и подтверждают их принадлежность к одному семейству *Schistosomatidae*.

Видовая принадлежность исследованных церкарий семейства *Schistosomatidae* была установлена с помощью метода ПЦР с ITS-праймерами. Разные виды шистосоматид, имея различные вариабельные последовательности внутри всего ITS-участка, в результате амплификации будут давать продукты различной массы. В связи с этим была проведена амплификация ДНК исследуемых экземпляров *Trichobilharzia* и *Bilharziella* с тремя парами ITS-праймеров – its5Trem, its4Trem; its5Trem, its2Trem; its3Trem, its4Trem. Полученные в результате амплификации фрагменты представлены на электрофореграмме (рис. 5).

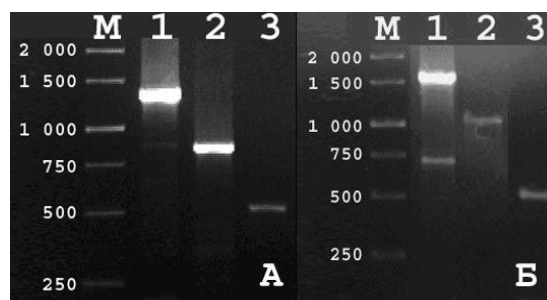


Рисунок 5 – Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК *Trichobilharzia* из *L. stagnalis* (А) и *R. auricularia* (Б) с праймерами *its5Trem*, *its4Trem* (дорожка 1); *its5Trem*, *its2Trem* (дорожка 2); *its3Trem*, *its4Trem* (дорожка 3). Дорожки М – стандарт 1Kbp DNA Ladder

С помощью программы Fragment Analysis v 1.1a (Molecular Dynamics) рассчитаны размеры продуктов. В качестве образца сравнения были использованы маркеры молекулярных масс ДНК (дорожка 1). В результате амплификации ДНК трематод были получены следующие продукты, соответствующие всему ITS-участку, ITS-1 и ITS-2: ~1300 п.н., ~850 п.н., ~500 п.н. (для *Trichobilharzia* из *L. stagnalis*); ~1650 п.н., ~1100 п.н., ~500 п.н. (для *Trichobilharzia* из *R. auricularia*); ~1775 п.н., ~1270 п.н., ~520 п.н. (для *Bilharziella* из *P. corneus*).

На основании данных литературы [10 - 13] и GenBank были проанализированы расшифрованные последовательности ITS-участка различных видов *Trichobilharzia* и *Bilharziella polonica*. Проведенный анализ позволил рассчитать размеры ITS-участка различных видов, наиболее распространенных и изученных в Европе: *T. szidati*, *T. franki*, *T. regent*, *B. polonica*. Данные о размерах этих фрагментов и о продуктах амплификации, полученных в ходе исследования, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Размеры фрагментов ITS-области различных видов трематод сем. *Schistosomatidae*

Вид трематоды	<i>its5Trem-its4Trem</i>	<i>its5Trem-i</i> <i>ts2Trem</i>	<i>its3Trem-i</i> <i>ts4Trem</i>	№ в GenBank	Авторы
<i>T. regenti</i>	1914	1428	506	AF263829	Dvorak,J. et al., 2002
<i>B. polonica</i>	1770	1268	522	EF094539	Rudolfova,J., et al., 2006
<i>T. franki</i>	1555	1069	506	AF356845	Dvorak,J. et al., 2002
<i>T. franki</i>	1586	1098	508	AY713973	Rudolfova,J., et al., 2005
<i>T. franki</i>	1578	1092	508	AY713966	Rudolfova,J., et al., 2005
<i>T. szidati</i>	1330	848	502	AF263828	Dvorak,J. et al., 2002
<i>T. szidati</i>	1329	847	502	AY713972	Rudolfova,J., et al., 2005
<i>T. szidati</i>	1203	721	502	AY713967	Rudolfova,J., et al., 2005
<i>T. szidati</i> (Нарочь, <i>L. stagnalis</i>)	~1310	~850	~500	-	данная работа
<i>T. franki</i> (Нарочь, <i>R. auricularia</i>)	~1650	~1100	~500	-	данная работа
<i>B. polonica</i> (Полоневичи, <i>P. corneus</i>)	~1775	~1270	~520	-	данная работа

Сравнительный анализ размеров ITS-участка и его фрагментов (таблица 1) показал, что исследованная *Trichobilharzia* из *L. stagnalis* принадлежит виду *T. szidati* (Neuhaus, 1952); *Trichobilharzia* из *R. auricularia* - виду *T. franki* (Muller и Kimming 1994); церкарии из моллюска *P. corneus* – это *Bilharziella polonica* (Kowalewsky, 1895).

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей ITS-2. Для выяснения положения исследованных церкарий среди шистосоматид других европейских популяций проведен анализ нуклеотидной последовательности второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-2). Полученные в ходе работы последовательности церкарий *T. szidati* из двух водоемов (озеро Нарочь и озеро близ деревни Полоневичи) и *Bilharziella polonica* (оз. Полоневичи) сравнены с данными GenBank. Методом Neighbour Joining в MEGA 4 построены дендрограммы, демонстрирующие филогенетические отношения между трематодами.

Филогенетическое дерево, включающее представителей трех видов *Trichobilharzia* представлено на рисунке 6 (в качестве внешней группы – *Bilharziella polonica*).

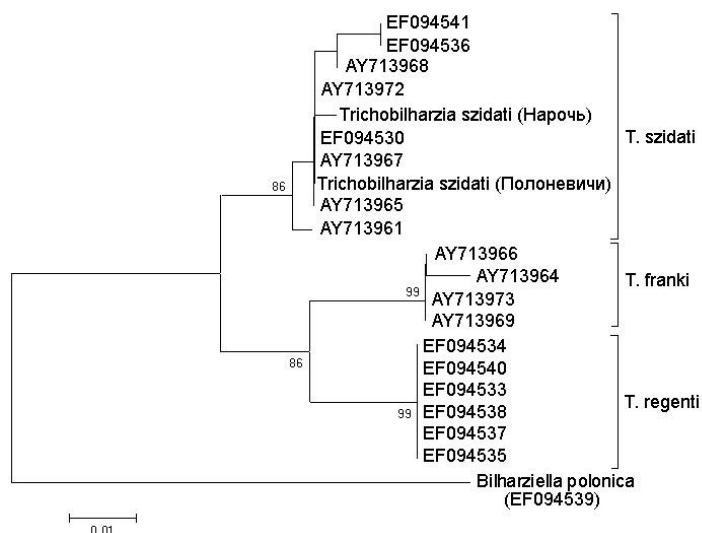


Рисунок 6 – Дендрограмма, демонстрирующая филогенетические взаимоотношения между представителями рода *Trichobilharzia*

Включенные в анализ представители шистосоматид образовали 3 четко разделенные группы, соответствующие 3 видам *Trichobilharzia*. Исследуемые образцы попали в группу «*T. szidati*». Среднее значение попарных генетических расстояний между проанализированными 25 сиквенсами составило 0,030. Среднее значение попарных генетических расстояний внутри групп составило 0,0057 (для *T. szidati*), 0,0032 (для *T. franki*) и 0,0000 (для *T. regenti*). Величина генетического расстояния между группами: 0,047 (пара *T. szidati* – *T. franki*), 0,045

(пара *T. szidati* – *T. regenti*) и 0,034 (пара *T. franki* – *T. regenti*). Отличие величин средних генетических расстояний внутри и между группами на порядок и высокая статистическая поддержка топологии дерева (индексы бутстрепа для групп >85%) свидетельствуют о существовании трех достоверно дифференцированных видов и доказывают, что исследованные церкарии принадлежат виду *Trichobilharzia szidati*.

Для определения таксономического положения исследованной *Bilharziella polonica* построено филогенетическое дерево, включающее различных представителей шистосоматид (рис. 7).

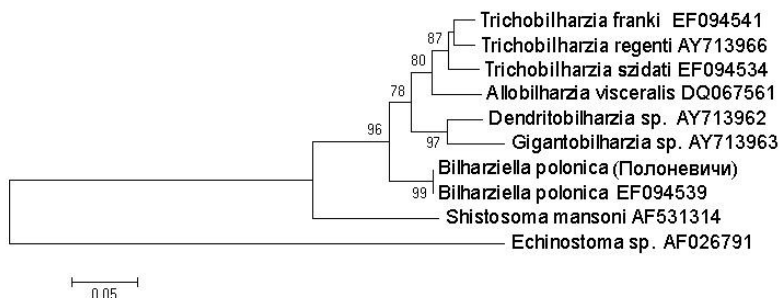


Рисунок 7 – Филограмма взаимоотношений между представителями семейства *Schistosomatidae*

В анализ были включены такие роды шистосоматид, как *Trichobilharzia*, *Allobilharzia*, *Bilharziella*, *Dendritobilharzia*, *Gigantobilharzia* и *Schistosoma*. В качестве внешней группы использовали последовательность *Echinostoma* sp. (семейство *Echinostomatidae*). Исследованная *Bilharziella* заняла в филогенетическом дереве положение рядом с *Bilharziella polonica* EF094539. Гомология последовательностей ITS-2 этих двух трематод составила более 99%. Это позволяет достоверно отнести исследованных церкарий к одному виду.

Таким образом, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей позволил доказать принадлежность церкарий из *L. stagnalis* из Нарочи и Полоневич к виду *Trichobilharzia szidati*, а церкарий из *P. corneus* – к *Bilharziella polonica*.

Исследование генетического полиморфизма церкарий *Trichobilharzia szidati* из двух популяций. Внутривидовой полиморфизм, выявляемый с помощью ПЦР с произвольными праймерами. В результате амплификации с произвольными праймерами было получено 14-15 различных по размеру продуктов (рис. 8).

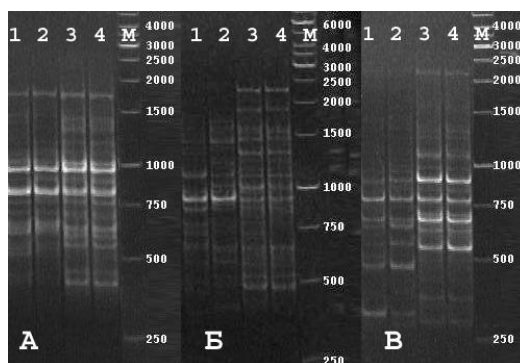


Рисунок 8 – Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами А - Opb-01, Б – Opе-06, В – Opf-05. Дорожки: 1,2 – *T.szidati* из оз. Нарочь, 3,4 - *T. szidati* из оз. Полоневичи, М - стандарт 1Kbp DNA Ladder

В ходе статистического анализа учитывались фрагменты размером от 250 до 2500 пар оснований. Общее число проанализированных фрагментов составило 46 для праймера OpB-01, 50 для праймера OpE-06 и 40 для праймера OpF-05. RAPD-паттерны церкарий с тремя исследованными произвольными праймерами (рис. 8 А, Б, В) из оз. Нарочь (дорожки 1, 2) отличались от паттернов церкарий из оз. Полоневичи (дорожки 3, 4). Внутри групп из каждого водоема результаты амплификации были одинаковыми. Таким образом, был выявлен внутривидовой полиморфизм между двумя популяциями *Trichobilharzia szidati* из озер Нарочь и Полоневичи. Коэффициенты сходства различались для каждого используемого праймера. При амплификации с праймером OpB-01 коэффициент сходства (SC) между популяциями составил 0,78; с праймером OpE-06 SC = 0,8; с праймером OpF-05 SC = 0,60. Уровень внутривидового полиморфизма составил P = 33% для праймеров OpB-01 и OpE-06, P = 57% для праймера OpF-05.

Полиморфизм ITS-2. RAPD-анализ выявил генетические различия церкарий *T. szidati* из двух исследованных водоемов. Для изучения генетического полиморфизма на уровне последовательности нуклеотидов и для дополнительного подтверждения принадлежности к одному виду *Trichobilharzia szidati*, было проведено секвенирование внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-2), расположенного между генами 5,8S рРНК и 28S рРНК.

В ходе исследования были определены последовательности ITS-2 для *Trichobilharzia szidati* из озер Нарочь и Полоневичи. Полученные последовательности были сравнены с ITS-2 участками банка данных GenBank для *T.szidati* из водоемов других стран. Внутри ITS-2 определено 7 полиморфных сайтов, различающихся у европейских представителей вида (таблица 2).

Таблица 2 – Положение полиморфных сайтов фрагмента ITS-2 у *Trichobilharzia szidati* из разных стран

Вид, географическая область	Полиморфный сайт участка ITS-2							№ доступа в GenBank
	98	119	252	258	270	313	361	
<i>T.szidati</i> , Чехия	G	A	G	T	G	T	C	AY713972
<i>T.szidati</i> , Чехия	.	.	A	.	A	.	.	AY713961
<i>T.szidati</i> , Чехия	.	G	.	.	.	.	.	AY713968
<i>T.szidati</i> , Чехия	A	G	.	G	.	.	.	EF094541
<i>T.szidati</i> , Польша	A	G	.	G	.	.	.	EF094536
<i>T.szidati</i> , Польша	.	.	.	.	.	.	A	AY713967
<i>T.szidati</i> , Польша	.	.	.	.	.	.	.	AY713965
<i>T.szidati</i> , Польша	.	.	.	.	.	.	.	EF094530

<i>T.szidati</i> , Германия	.	.	.	.	.	.	.	AY713971
<i>T.szidati</i> , Нидерланды	.	.	.	.	.	.	.	AY713970
<i>T.szidati</i> , Беларусь, оз. Нарочь	.	.	.	.	.	А	.	Данная работа
<i>T.szidati</i> , Беларусь, оз. Полоневичи	.	.	.	.	.	.	.	Данная работа

Сравнение полученной в ходе работы нуклеотидной последовательности второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-2) церкарий *T. szidati* с данными по другим странам Европы показало, что исследуемый генетический маркер внутри вида является достаточно консервативным. Из последовательности ITS-2 длиной в 370 нуклеотидов полиморфными для данного вида оказались лишь 7 сайтов. Географической закономерности между количеством замен выявлено не было. Гомология последовательности внутри европейских представителей вида составила от 99,2% до 100%. Церкарии из озер Нарочь и Полоневичи по результатам анализа сиквенсов можно достоверно отнести к виду *Trichobilharzia szidati*. Исследованные последовательности ITS-2 церкарий двух популяций отличаются между собой только по 1 замене нуклеотида в положении 313 и на 100% и 99,7% гомологичны ITS-2-участку *T. szidati* из популяций Чехии, Польши, Германии и Нидерландов.

Выводы

В ходе работы сделаны следующие выводы:

1. Проведенный RAPD-анализ позволяет выяснить филогенетические взаимоотношения между трематодами и установить таксономическое положение морфологически неопределенных церкарий. Исследованные в работе церкарии по результатам RAPD-анализа образуют 3 обособленных группы, соответствующие трем семействам трематод: *Strigeidae*, *Schistosomatidae* и *Diplostomatidae*.

2. Применение ПЦР со специфическими к роду *Trichobilharzia* праймерами T1323-1 и T1323-R позволяет идентифицировать опасные для человека церкарии среди представителей морфологически сходных личинок других семейств. Специфичность данных праймеров в отношении указанного рода не оказалась абсолютной. Амплификации, хотя и более слабой, с большим числом неспецифических продуктов подвергается также ДНК из *Bilharziella polonica*. Объясняется это, видимо, сходством геномов этих организмов, обусловленным близким родством.

3. На основании сравнительного анализа размеров фрагментов, полученных в результате ПЦР с ITS-праймерами, установлена видовая принадлежность церкарий семейства шистосоматид. Церкарии группы «*Trichobilharzia ocellata*» из *L. stagnalis* оказались представителями вида *T. szidati*, церкарии из *R. auricularia* – *T. franki*. Размеры продуктов ITS-ПЦР для *Bilharziella polonica* из *P. corneus* соответствовали данным литературы.

4. В результате анализа последовательности второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-2) церкарий *T. szidati* из двух водоемов определено положение данных трематод внутри рода. Доказана видовая принадлежность и подтверждена возможность определения вида на основании размеров продуктов амплификации с ITS-праймерами. Выяснено положение церкарий *Bilharziella polonica* среди трематод семейства *Schistosomatidae*. Гомология с ранее изученным чешскими исследователями представителем вида составила более 99%.

5. Методом RAPD-анализа выявлен внутривидовой генетический полиморфизм между двумя популяциями *T. szidati* из озер Беларуси. Нуклеотидные последовательности

ITS-2 церкарий двух исследованных популяций различаются между собой 1 заменой в положении 313.

Авторы выражают благодарность доценту кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ, Ph.D., Никалайчику Е.А. за помощь при проведении секвенирования.

Литература

1. Horák P., Kolářová L., Adema C.M., Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia* // Adv. Parasitol. 2002. N 52. P. 155–233
2. De Gentile L., Picot H., Bourdeau P., Bardet R., Kerjan A., Piriou M., Guennic A.L., Bayssade-Dufour C., Chabasse D., Mott K.E., Le Guennic A. Cercarial dermatitis in Europe: a new public health problem? // Bull World Health Organ. 1996. N 74 (2). P. 159–163
3. Verbrugge L.M., Rainey J.J., Reimink R.L., Blankespoor H.D. Swimmer's itch: incidence and risk factors // Am. J. Public Health. 2004. N 94 (5). P. 738–741
4. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. N 76. P. 5269–5273
5. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Applic. Biosci. 1994. N 10. P. 569–570
6. Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Molecular Biology and Evolution. 2007. N 10. P. 1093
7. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Molecular Biology and Evolution. 1987. N 4. P. 406–425
8. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. N 39. P. 783–791
9. Hertel J., Hamburger J., Haberl B. and Haas W. Detection of bird schistosomes in lakes by PCR and filter-hybridization // Exp. Parasitol. 2002. N 101. P. 57–63
10. Dvořák J., Vaňáčová Š., Hampl V., Flegr J., Horák P.. Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS-1 and ITS-2 sequences // Parasitology. 2002. N 124(3). P. 307–313
11. Rudolfová J., Hampl V., Bayssade-Dufour C., Lockyer A.E., Littlewood D.T., Horák P. Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host // Parasitol. Res. 2005. N 95(2). P. 79–89
12. Semyenova S.K., Chrisanova G.G., Filippova E.K., Beer S.A., Voronin, M.V., Ryskov A.P. Individual and population variation in cercariae of bird schistosomes of the *Trichobilharzia ocellata* species group as revealed with the polymerase chain reaction // Genetika. 2005. T.41. N 1. P. 17–22
13. Rudolfová J., Littlewood D.T.J., Sitko J., Horák P. Bird schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland // Folia Parasitol. 2007. N 54. P. 88–93

MOLECULAR-GENETIC FEATURES OF TREMATODE LARVAE OF *SCHISTOSOMATIDAE* FAMILY

S.V. Rizevsky, L.N. Akimova, V.P. Kurchenko
Belarusian State University, Minsk, Belarus

The polymerase chain reaction with arbitrary primers (RAPD-PCR) was used to find out the relationship between trematodes of 3 families (*Strigeidae*, *Schistosomatidae*, *Diplostomatidae*) and to estimate the taxonomical place of morphologically unidentified samples.

The comparative analysis of amplified fragments of ITS region of «*Trichobilharzia ocellata*» cercaria from 3 host snails revealed the presence of 3 species: *T. szidati*, *T. franki* and *Bilharziella polonica*. This data was proved by the analysis of obtained ITS-2 sequence.

The genetic polymorphism, based on the results of RAPD-PCR and ITS-2 sequence diversity, of 2 *T. szidati* from 2 different populations was studied.