

На правах рукописи  
УДК 575.17.174.015.3

МОРОЗОВА ЕЛЕНА ВАЛЕРЬЕВНА

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ПЕЧЁНОЧНОГО  
СОСАЛЬЩИКА *Fasciola hepatica***

Специальность 03.00.26 – молекулярная генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва

2004

Работа выполнена в лаборатории организации генома

Института биологии гена РАН

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН

А. П. Рысков

кандидат биологических наук С. К. Семёнова

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор, чл.-корр. РАН

Л. И. Корочкин

доктор биологических наук, профессор С. А. Безр

Ведущая организация: НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозёрского,

МГУ им. М. В. Ломоносова

Защита состоится 27 декабря 2004 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 002 037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им В. А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан 27 ноября 2004 года.

Учёный секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

 Фрабовская Л. С.

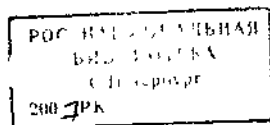
2004 - 4  
1091

2346262

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Изучение геномной вариабельности различных таксономических групп животных представляет одно из важных направлений современной биологии. Различные ядерные и митохондриальные полиморфные ДНК широко используются для выявления родственных взаимосвязей между отдельными особями или группами особей, для изучения динамики генетических процессов в популяциях, описания структуры вида, истории и времени его возникновения (Avice, 2004). С этой точки зрения особый интерес представляют сложные биологические системы, состоящие из двух или нескольких организмов, находящихся в тесной взаимозависимости, например, паразитов и их хозяев. Среди них следует выделить паразитических червей – возбудителей гельминтозов позвоночных животных и человека. Исследование вариабельности генома паразитов имеет не только прикладной, медико-ветеринарный характер. Общебиологический интерес представляют процессы систематики и филогении паразитов, взаимодействия паразита с окружающей средой, в качестве которой выступает не только комплекс природных абиотических факторов, но и сам организм животного-хозяина. Молекулярно-генетические исследования могут также оказаться весьма перспективными для выяснения механизмов адаптаций, возникающих при разных способах размножения и смены животных-хозяев.

Трематоды (класс Trematoda, тип Plathelminthes) составляют одну из наиболее древних групп плоских червей. Они отличаются от всех остальных ныне существующих червей наличием сложного жизненного цикла, связанного со сменой животных-хозяев и с чередованием нескольких последовательных партеногенетических и одного гермафродитного поколения (гетерогония). Все трематоды – эндопаразиты, взрослые особи которых обитают преимущественно в разных отделах пищеварительной системы позвоночных, которые являются дефинитивными (окончательными) хозяевами. Роль промежуточного хозяина всегда выполняют разные виды моллюсков, а некоторые виды трематод имеют второго, дополнительного, промежуточного хозяина, в качестве которого могут выступать самые



разные животные – от кишечноподостных и гребневику до млесопитающих (Скрябин 1948; Гинецинская 1968).

Объектом данной работы является печёночный сосальщик *Fasciola hepatica*, который паразитирует в желчных протоках печени крупного и мелкого рогатого скота, и значительно реже – в печени человека. Природные очаги фасциолёза могут повсеместно поддерживаться также за счет многочисленных диких млесопитающих, в первую очередь копытных, грызунов и зайцеобразных. Фасциолёз человека распространён преимущественно в Южной Америке, в северной Африке, Иране, в странах Западной Европы (Mas-Coma et al., 1999).

На евроазиатском континенте *F. hepatica* весьма неоднородна по морфологии, что позволило Д. Ф. Сипицину ещё в 1915 году выделить только на территории Московской губернии три варианта (Сипицын, 1915). Увеличение морфологического разнообразия обнаружено в выборках печёночного сосальщика из стран юго-восточной Азии, где зачастую наблюдается перекрытие ареалов двух близкородственных видов *F. hepatica* и *F. gigantica* (Hashimoto et al. 1997). Наибольшее число современных исследований посвящено изучению генетического состава этих локальных выборок и молекулярно-генетической идентификации двух видов (Agatsuma et al., 1994, 2000; Itagaki et al., 1997, 1998, 2001; Itagaki and Tsutsumi, 1998; Terasaki et al., 2000).

В настоящее время генетическая структура популяций установлена для небольшого числа видов, принадлежащих преимущественно к классу круглых червей (Nematoda) и характеризующихся отсутствием промежуточного хозяина. При изучении полиморфизма отдельных участков митохондриального генома обнаружено низкое генетическое разнообразие и наличие изолирующих межпопуляционных барьеров у некоторых нематод-паразитов растений, насекомых и человека (Hugall et al., 1994; Blouin et al., 1995; Anderson, Jaenike, 1997). Более высокий уровень изменчивости обнаружен у нематод домашних животных (овца и корова). Как выяснилось, для этих видов существует зависимость между генетическим разнообразием в популяции паразита и изменениями структуры популяции

хозяина. Так, у паразитов диких копытных выявлена локальная географическая дифференциация. По сравнению с ними у паразитов домашних животных, которые могут перемещаться при перевозках скота на более отдалённые расстояния, обнаружен высокий уровень изменчивости, свидетельствующий о наличии обмена генами между географически удалёнными популяциями (Blouin et al., 1992, 1995, 1999). Среди трематод наиболее изученную группу составляют кровяные сосальщики из рода *Schistosoma*, различные виды и штаммы которых подробно изучены с помощью маркёров ядерного и митохондриального генома. Это позволило подтвердить наличие внутри рода четырех основных морфо-экологических групп, а также выявить ряд новых закономерностей в распределении и происхождении латиноамериканских и афро-азиатских видов и популяций (Rollinson, 1996).

Печёночные сосальщики рода *Fasciola* также имеют широкое распространение на евроазиатском континенте и в Африке, но до сих пор остаются практически неизученными

**Цель и задачи исследования.** Цель работы: с учетом малой исследованности вида *F. hepatica* оценить генетическую вариабельность и дифференциацию популяций печёночного сосальщика из различных частей ареала с помощью полиморфных маркёров ядерного и митохондриального генома. Учитывая возможность межвидовой гибридизации, провести сравнительный анализ геномной вариабельности двух близкородственных видов *F. hepatica* и *F. gigantica*.

В ходе исследования предполагалось решить следующие задачи:

1. Провести поиск новых мультилокусных ядерных молекулярно-генетических маркёров (RAPDs) для выявления генетической вариабельности и оценки внутривидового полиморфизма и дифференциации печёночного сосальщика *F. hepatica* на уровне отдельных животных-хозяев, популяций и регионов.

2. Оценить генетическую вариабельность и дифференциацию популяций *F. hepatica* по отдельным монолокусным участкам митохондриального (гены *ND1* и *CO1*) и ядерного (ITS2 рДНК) генома.

3 Для выяснения происхождения и особенностей эволюции провести сравнительный анализ изменчивости участков митохондриального генома двух видов печёночного сосальщика – *F. hepatica* и *F. gigantica*, а также определить время молекулярной дивергенции между ними.

**Научная новизна и практическое значение работы.** Впервые с использованием различных мультисеквенционных маркёров проведён анализ генетической изменчивости печёночного сосальщика на уровне одного окончательного животного-хозяина, нескольких животных-хозяев одной или нескольких популяций и регионов. На основании данных о генетической вариабельности митохондриальных маркёров проведена идентификация двух видов печёночного сосальщика из Восточной Европы, Средней Азии и Кавказа. Для *F. hepatica* из восточноевропейской части ареала впервые выявлено наличие двух линий митогенов, различающихся происхождением, а также обнаружена генетическая уникальность популяции гельминтов из Армении.

Полученные результаты имеют практическое значение для создания генных диагностических тест-систем, для поиска генов устойчивости к действию антигельминтных препаратов, а также могут найти своё применение при разработке медико-ветеринарных программ в соответствующих учреждениях РАН и РАСХН, таких как Институт паразитологии РАН, Всероссийский институт гельминтологии им. К. И. Скрябина, ветеринарных академиях, институтах, факультетах и других учреждениях медико-ветеринарного профиля.

#### **Апробация работы.**

1. Sixth National Conference of Parasitology with International Participation, Sofia, Bulgaria, 2001
2. Международная конференция «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология», Москва, 2001
3. Sixth International Congress of Systematic and Evolutionary Biology, Patras, Greece, 2002.

- 4 Региональная научная конференция, посвящённая 60-летию Института зоологии НАН РА, Ереван, Армения, 2003.
- 5 International Symposium dedicated to 125-year Anniversary of K. I. Skryabin and 60-years Anniversary from foundation of Helminthological Laboratory of USSR AS Institute of Parasitology RAS, Moscow, 2004.
6. IX European Multicolloquium of Parasitology, Valencia, Spain, 2004.
7. Международная конференция «Сохранение генетических ресурсов», Санкт-Петербург, 2004.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 3 печатные работы (в том числе одна зарубежная).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 220 наименований. Работа содержит 16 таблиц и 16 рисунков.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Материалом для исследования послужили фиксированные в ЭДТА или спирте взрослые особи (мариты) печёночного сосальщика двух видов семейства Fasciolidae – *Fasciola hepatica* L., 1758 и *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855 собранные от разных видов домашних и диких животных-хозяев (КРС, овца, олень, мышь) из России, Беларуси, Украины, Болгарии, Армении, Азербайджана, Грузии, Туркменистана, Узбекистана, Таджикистана, Турции и Китая. С помощью молекулярных маркёров RAPD, *ND1*, *CO1* (фрагменты генов) и ITS2 было исследовано всего 292 гельминта, из них 261 особь *F. hepatica* и 31 особь *F. gigantica*.

Для каждой выборки (группы) трематод от разных животных, а также для региональных и суммарной выборок рассчитывали следующие популяционные показатели: уровень полиморфизма (доля полиморфных локусов  $P$ ), среднее генетическое разнообразие (индекс Шеннона  $H$ ) или нуклеотидное разнообразие  $\pi$ , попарное и внутривидовое сходство  $S$ , индекс популяционной подразделённости  $F_{ST}$ . Иерархическое разложение дисперсии AMOVA осуществляли с помощью программного пакета ARLEQUIN ver. 2.000. С помощью методов кластерного анализа (UPGMA) строили дендрограммы генетических различий между отдельными особями или популяциями. Филогенетическое дерево митотипов строили отдельно для *ND1* и *COI*, а также для комбинаций митотипов двух локусов методом Neighbor-Joining (программа MEGA ver. 3.0) на основании нуклеотидных замен в переменных сайтах у *Fasciola sp.* и *Paragonimus westermani* (внешняя группа). Надёжность ветвления оценивалась на основании расчетного индекса бутстрепа (1000 реплик). Для изображения филогенетических связей между митотипами были построены также сети, отражающие генеалогию каждого гена (*ND1* и *COI*) или двух генов (программа TCS ver. 1.18).

Нуклеотидные последовательности *ND1*, *COI* и ITS2 выравнивались вручную по отношению к соответствующим участкам депонированной в GenBank полной последовательности мтДНК *F. hepatica* (NC002546) и *P. westermani* (AF219379), последовательности фрагмента рибосомной ДНК *F. hepatica* (Hashimoto et al., 1997), а также к другим опубликованным последовательностям двух видов *Fasciola*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа геномной variability печёночного сосальщика *F. hepatica* были использованы маркеры полиморфизма ядерного (RAPDs и ITS2) и митохондриального (*ND1* и *COI*) генома. При описании изменчивости ITS2, *ND1* и *COI* использовались образцы из популяций двух видов печёночного сосальщика *F. hepatica* и *F. gigantica*.

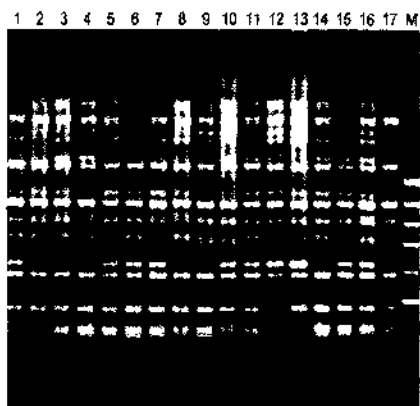


## Полиморфизм ядерного генома печёночного сосальщика.

### 1. RAPD-изменчивость популяций *F. hepatica*.

Для описания геномной изменчивости единичных особей печёночного сосальщика *F. hepatica*, выделенных от разных животных-хозяев (КРС, овца) из разных популяций использованы пять случайных праймеров, каждый из которых позволяет выявлять в геноме печёночного сосальщика от 33 до 62 амплификационных фрагментов размером 150–1500 п. н. На рис. 1 представлен образец RAPD-спектров *F. hepatica* из разных выборок, полученных с помощью праймера SB2.

**Рис. 1.** RAPD-изменчивость печёночного сосальщика *F. hepatica* из разных выборок, выявленная с помощью праймера SB2. М-маркер молекулярных масс (100 bp Ladder, Biotech, Moscow)



Для популяционного анализа печёночного сосальщика из суммарного спектра был отобран 121 чёткий, стабильно воспроизводящийся в каждой выборке фрагмент. В табл.1 представлены оценки RAPD-изменчивости в шести выборках печёночного сосальщика.

Наиболее полиморфными оказались выборки из Армении, Украины и Беларуси (85,1 %, 81,0 % и 81,0 %), наименее – выборка из Болгарии (45,5 %). Доля полиморфных локусов в выборках из Московской области и Мордовии составила 73,6 % и 70,2 %. Аналогичное ранжирование выборок по уровню полиморфизма сохраняется при сравнении числа специфических фрагментов: среди армянских фасциол – 6, но 2 фрагмента найдено в выборках

из Украины и Беларуси, по одному фрагменту найдено в выборках из Московской области и Мордовии, а в выборке из Болгарии специфичных фрагментов не найдено вообще

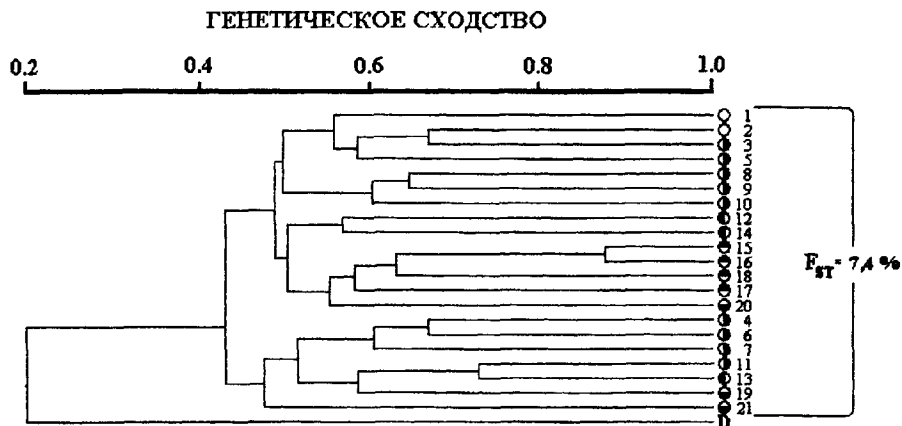
**Таблица 1.** RAPD-изменчивость печёночного сосальщика из украинской (I), армянской (II), московской (III), мордовской (IV), белорусской (V) и болгарской (VI) популяций.

Праймер	Размер фрагментов, п.н.	Число локусов	Число полиморфных локусов в популяциях						Число полиморфных локусов в объединённой выборке (%)
			I	II	III	IV	V	VI	
P29	150-1000	24	23	23	22	24	21	8	23 (95,8)
R45	230-810	21	16	17	18	14	16	7	20 (95,2)
OPA01	150-930	23	16	17	13	14	17	11	23 (100)
OPA11	220-880	27	22	25	18	15	23	13	27 (100)
SB2	300-1000	26	21	21	18	18	21	16	26 (100)
Суммарно (%)		121	98 (81,0)	103 (85,1)	89 (73,6)	85 (70,2)	98 (81,0)	55 (45,5)	119 (98,3)

Оценки RAPD-изменчивости червей, паразитирующих в разных животных-хозяевах из разных популяций (индексы S и H) свидетельствуют о том, что популяции практически не отличаются между собой по среднему значению этих показателей. Индексы внутригруппового сходства S паразитов от разных животных варьируют от 0,424 до 0,693, а индексы генетического разнообразия H изменяются в пределах 0,161-0,384. Исключение составляет выборка фасциол из Украины, в которой найдено значительно меньшее сходство между паразитами от разных хозяев ( $p < 0,001$ ).

Генетические связи между трематодами от разных животных-хозяев из украинской популяции изображены на дендрограмме (рис. 2).

**Рис. 2.** Дендрограмма генетического сходства между особями печёночного сосальщика украинской популяции, выделенными из печени пяти коров.



Обозначения: ○ – особи *F. hepatica*, выделенные из печени коровы № 1 (№№ паразитов 1, 2), ● – № 2 (3–11), ● – № 3 (12–14), ● – № 4 (15–18), ● – № 5 (19–21), D – *D. dendriticum* (внешняя группа)

Все особи *F. hepatica* объединяются в два неравных кластера, каждый из которых представляет собой смешанную группу, состоящую из паразитов от 3–4 коров. Три из пяти выборок печёночного сосальщика разбиваются на две генетически различающиеся группы. Коэффициент подразделённости суммарной выборки  $F_{ST}$  оказался равным 7,4 %, что свидетельствует об отсутствии жёстких изоляционных барьеров между исследуемыми группами *F. hepatica* от разных животных-хозяев из данного региона. Для четырёх других выборок сосальщика из Армении, Мордовии, Московской области и Беларуси  $F_{ST}$  составляют 6,2 %, 6,5 %, 6,5 % и 6,8 %, что указывает на отсутствие чётких генетических различий между паразитами от разных животных внутри одного региона.

Наличие высокой индивидуальной RAPD-изменчивости червей, паразитирующих в одном животном-хозяине, достоверно подтверждается при иерархическом анализе молекулярной изменчивости (AMOVA) печёночного сосальщика, собранного от разных

животных-хозяев из шести популяций (регионов). Наибольший вклад в общую изменчивость вносит индивидуальная изменчивость паразитов из одного хозяина (84,0 %,  $p < 0,0001$ ). Значительно меньший вклад в общую дисперсию вносит изменчивость между разными животными-хозяевами из одной популяции (7,5 %,  $p < 0,0001$ ), а также изменчивость между разными популяциями или регионами (8,5 %,  $p < 0,05$ ).

**Рис. 3.** Дендрограмма

генетических различий между  
выборками печеночного  
сосальщика из шести  
регионов, полученная на  
основе изменчивости 121  
RAPD-маркера.



Таким образом, предлагаемые RAPD-маркеры выявляют на изученном ареале шесть высокополиморфных и слабодифференцируемых географических популяций. О достоверности выделения этих групп свидетельствует также дендрограмма генетических различий, построенная на основании распределения частот 121 RAPD-локуса в шести популяциях *F. hepatica* (Рис.3). Пять изученных популяций разделены на две группы (индекс бутстрена ИБ 88 %), в одну из которых объединены различающиеся между собой (ИБ 75 %) украинская и белорусская популяции из западной части исследуемого ареала. В другую

группу объединены три популяции из восточной части ареала и Кавказа: московская, мордовская и армянская (ИБ 99 %) Московская популяция достоверно отличается от армянской и мордовской (ИБ 99 %), различия между которыми не столь определенные (ИБ 49 %). Обособленное положение занимает выборка фасциол из Болгарии, что может определяться не только генетическим составом, но и малым размером выборки ( $n = 6$ ).

## 2. Полиморфизм второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) рДНК в популяциях печёночного сосальщика *F. hepatica* и *F. gigantica*.

Для подтверждения видового статуса исследуемых выборок мы провели секвенирование участка второго внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 рДНК у отдельных представителей пяти популяций *F. hepatica* и трёх популяций *F. gigantica* (Табл. 2). Его размер составляет 362 п.н. для *F. hepatica*, и 361 п.н. для *F. gigantica*

Начиная с работы Адларда с соавт. (1993), видовая принадлежность исследуемых образцов однозначно определялась по наличию или отсутствию делеции одного нуклеотида (в положении 451) и четырьмя характерными заменам в положениях 358, 397, 403 и 461 последовательности ITS2 рДНК. Мы подтвердили видовой статус исследованных образцов *F. hepatica* из России, Беларуси, Украины, Армении и одной особи из Туркмении. Нуклеотидные последовательности ITS2 особей из этих популяций не отличались от известных ранее последовательностей *F. hepatica* из Австралии, Испании, Венгрии, Новой Зеландии и Уругвая. Исключение составляет одна особь *F. hepatica* из Армении, для которой найдена новая, неизвестная трансверсия С-С в положении 217

Принадлежность трёх выборок из Туркменистана, Узбекистана и Таджикистана к виду *F. gigantica* также не вызывает сомнений. Кроме того, в трёх данных популяциях обнаружены дополнительные переменные сайты ITS2. Так, среди 12 червей из Туркменистана и Узбекистана найдены две особи с транзицией в 334 положении (Т-С), характерной для представителей из Индонезии и Малайзии. В туркменской выборке найдена одна транзиция Т-С в 425 положении, присутствующая только у африканских червей из Замбии. Две другие

транзиции (С-Т и Т-С) в положениях 455 и 468, выявленные у среднеазиатских фациол, являются уникальными. Таким образом, на исследованном нами ареале встречаются только представители двух видов печёночного сосальщика и отсутствуют межвидовые гибриды *F. hepatica* x *F. gigantica*.

**Таблица 2.**

Распределение полиморфных сайтов на участке ITS2 рДНК в популяциях *F. hepatica* и *F. gigantica*

\* – литературные данные  
 \*\* – нуклеотиды и номера сайтов даны по Hashimoto et al. (1997) (последовательность *F. hepatica* из Австралии (537 п. н.)) Затемненым выделены диагностические сайты, отличающиеся у двух видов. Знаком вопроса здесь, а также в таблицах 4 и 5, обозначено отсутствие данных.

Регион (размер выборки)	Сайты мутаций в ITS2												Число особей	Вид		
	217	334	358	397	403	411	425	451	455	461	468	469				
<i>F. hepatica</i> **	С	Т	Т	С	С	С	Т	Т	С	Г	Т	А				
Россия (n = 8)														8	<i>F. hepatica</i>	
Беларусь (n = 4)														4		
Украина (n = 3)														3		
Армения (n = 28)	Г													27	<i>F. hepatica</i>	
Туркменистан (n = 7)														1		
														1		
		С												2		
Узбекистан (n = 5)							С				С			1	<i>F. gigantica</i>	
														1		
	?	?									?			1		
														1		
														2		
Таджикистан (n = 3)														1	<i>F. gigantica</i>	
														1		
														1		
Венгрия* (n = ?)												?	?	?	<i>F. hepatica</i>	
Испания* (n = ?)														?		
Франция* (n = ?)												А	Т	?		
Австралия* (n = ?)														2		
Новая Зеландия* (n = ?)														1		
												?	?	?		
Уругвай* (n = 3)							Т							3		
Мексика* (n = ?)							Т							?		
Китай* (n = ?)													А	Т		?
Замбия* (n = 2)			А				С							1		
Индонезия* (n = ?)		С												2		
		?	С											1		
		?	С									?	?	?		
Малайзия* (n = ?)			С											2		
Китай* (n = ?)			С										?	?	?	
Китай* (n = ?)												А	Т	?		

## Полиморфизм митохондриального генома печёночного сосальщика.

### 1. Анализ нуклеотидного и гаплогипического разнообразия в популяциях *F. hepatica* и *F. gigantica*.

Для выявления полиморфизма митохондриального генома печёночного сосальщика *F. hepatica* исследовали два участка митохондриальных генов *ND1* и *COI*, расстояние между которыми составляет примерно 800 н.н. Кроме того, подобный анализ проведен нами для представителей близкородственного вида *F. gigantica*. Анализируемый фрагмент гена *ND1* *F. hepatica* содержал 316 п. н., *F. gigantica* – 351 п. н.; длина фрагмента *COI* составила 429 п. н. для *F. hepatica* и 161–442 п. н. для *F. gigantica*.

*F. hepatica* и *F. gigantica* различались по числу полиморфных сайтов, обнаруженных в *ND1* и *COI* (Табл. 3). У *F. hepatica* найдено по 16 замен в *ND1* и *COI*, тогда как у *F. gigantica* – 20 и 18 замен соответственно. У обоих видов ген *ND1* оказался менее вариабельным, чем ген *COI* при пересчёте на длину исследуемого фрагмента. Так, доля полиморфных сайтов в *ND1* составила 5,06 и 5,7 % (*F. hepatica* и *F. gigantica*), в *COI* – 3,73 и 4,07 %. В обоих генах транзиции преобладали над трансверсиями, однако отношение транзиции/трансверсии было выше для гена *ND1* (7 и 5,7), чем для *COI* (4,3 и 3,5). Было обнаружено, что большая часть замен приурочена к третьему положению кодона (13–16 замен), а наиболее редки оказались мутации во втором положении (0–1).

Отношение синонимичных и несинонимичных замен варьировало от 5,7 до 17 и зависело как от исследуемого локуса, так и от вида. У *F. hepatica* три несинонимичные мутации (положения 5194, 5195 и 7606) приводят к замене валина на фенилаланин, аланин и изолейцин. У *F. gigantica* найдены четыре другие несинонимичные мутации (положения 5443, 5491, 5524 и 8028), которые приводят к замене аланина на серин, серина на глицин, треонина на аланин и изолейцина на метионин. Из семи указанных замен, обнаруженных в мтДНК двух видов, пять замен зарегистрировано в гене *ND1* и две – в гене *COI*. Эти несинонимичные мутации неодинаково представлены в суммарной исследованной выборке фасциол. Так,

замена  $V \rightarrow A$  встречается у 42,4 % особей *F. hepatica*, четыре замены ( $V \rightarrow I$ ,  $A \rightarrow S$ ,  $S \rightarrow G$  и  $T \rightarrow A$ ) найдены примерно у 4–5 % особей двух видов, а мутация  $V \rightarrow A$  весьма редка (0,7 % у *F. hepatica*).

**Таблица 3.** Характеристика полиморфных *ND1* и *COI*, обнаруженных в различных выборках *F. hepatica* и *F. gigantica*

Характеристика	<i>F. hepatica</i>			<i>F. gigantica</i>		
	<i>ND1</i>	<i>COI</i>	<i>ND1</i> + <i>COI</i>	<i>ND1</i>	<i>COI</i>	<i>ND1</i> + <i>COI</i>
Длина фрагментов, п. н.	316	429	745	351	442	793
Число полиморфных сайтов	16	16	32	20	18	38
Доля полиморфных сайтов, %	5,06	3,73	4,29	5,7	4,07	4,79
Отношение транзиции/трансверсии	14 / 2 = 7	13 / 3 = 4,3	27 / 5 = 5,4	17 / 3 = 5,7	14 / 4 = 3,5	31 / 7 = 4,4
Отношение замен в первом, втором и третьем положениях	2 / 1 / 13	2 / - / 14	4 / 1 / 27	5 / - / 15	2 / - / 16	7 / - / 31
Отношение синонимичных и несинонимичных аминокислотных замен	14 / 2	15 / 1	29 / 3	17 / 3	17 / 1	34 / 4
Несинонимичные мутации, их положения по NC002546 и представленность в суммарной выборке (%)	$V \rightarrow F$ (5194), 0,66 %; $V \rightarrow A$ (5195), 42,38 %	$V \rightarrow I$ (7606), 4,48 %		$A \rightarrow S$ (5443), 4,55 %; $S \rightarrow G$ (5491), 4,55 %; $T \rightarrow A$ (5524), 4,55 %	$I \rightarrow M$ (8028), 4 %	
Число митотипов	18	15	28*	9	9	9*

В популяциях *F. hepatica* было выделено 18 митотипов для *ND1* и 15 – для *COI*, причём практически во всех выборках, численность которых составляет не менее пяти особей, встречается два митотипа – N1 и N2 (Табл 4 и 5).

В популяциях *F. gigantica* найдено 9 митотипов по *ND1*, а по *COI* – от 9 (апализируемый фрагмент в 161 п. н.) до 13 (442 п. н.) митотипов (данные не приведены). Наиболее частыми митотипами по *ND1* оказались FgN2 и FgN1, доля которых в суммарной выборке составила 33,3 и 22 %. Наиболее частыми митотипами по *COI* являются FgC1 и FgC2, которые составляют 40 и 24 % от суммарной выборки.



При иерархическом анализе молекулярной изменчивости (АМОВА) по каждому из двух локусов показано, что наибольший вклад в общую изменчивость *F. hepatica* вносит индивидуальная изменчивость паразитов из одной популяции (*NDI* – 85,1%; *COI* – 86,6%;  $p < 0,0001$ ) и значительно меньший вклад вносит изменчивость между разными популяциями или регионами (*NDI* – 14,9%; *COI* – 13,4%,  $p < 0,001$ ).

Таблица 4. Вариабельные сайты в *NDI* и распределение митотипов в выборках печёночного сосальщика *F. hepatica*.

Регион (размер выборки)	Вариабельные сайты во фрагменте гена <i>NDI</i>														Число особей	Доля в выборке, %	Митотип				
	3190	3194	3195	3211	3233	3286	3322	3337	3335	3383	3421	3429	3431	3473				3481	3491		
НС002546	G	G	T	G	A	T	T	G	A	G	T	T	C	C	T	T				N1	
Россия (n = 40)			C	A									C	T	T	T		17	42,5	N2	
					G													13	32,5	N1	
																		3	7,5	N3	
			C	A									C	T	C			1	2,5	N4	
			C	A				A					C	T				1	2,5	N5	
			C									G						1	2,5	N6	
				A			?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	2	5		
			C	A									?	?	?	?	?	1	2,5		
			C			G		?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	2,5		
Беларусь (n = 17)			C	A									C	T	T	T		10	58,8	N2	
																		4	23,5	N1	
			C	A									C	T				1	5,9	N7	
															C			1	5,9	N8	
										Б								1	5,9	N9	
Украина (n = 11)			C	A									C	T				6	54,5	N1	
																		5	45,5	N2	
Болгария (n = 5)			C	A									C	T				3	60	N2	
																		2	40	N1	
Армения (n = 61)		A											A					22	36,07	N1	
				C	A													9	14,75	N10	
														C	T			8	13,12	N2	
													A					8	13,12	N11	
			T	C		G										T		7	11,46	N12	
																T		1	1,64	N13	
													A				C	1	1,64	N14	
													A					1	1,64	N15	
Азербайджан (n = 8)							?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	3	4,92		
			C	A									C	T				5	62,5	N2	
																		5	62,5	N1	
																		4	80	N1	
		?	?	?	?									C				1	20	N18	
																		2	100	N1	
Грузия (n = 2)																					
Гурджистан (n = 1)													A		T			1	100	N17	
Екатй (n = 1)																		1	100	N1	
Австралия* (n = 7)	?	?	?	?	?	?	?							C	T			7		N1	
США* (n = 7)			C	A														7		N19	
Уругвай* (n = 3)			C	A			?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	3	100		

\* литературные данные

Таблица 5. Вариабельные сайты в *COI* и распределение митотипов в выборках печёночного сосальщика *F. hepatica*.

Регион (размер выборки)	Вариабельные сайты во фрагменте гена <i>COI</i>																Число особей	Доля в выборке %	Митотип	
	7596	7606	7630	7684	7692	7707	7746	7749	7767	7797	7875	7908	7935	7968	7983	8001				8007
<i>FCO02/346</i>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>			
Россия (n = 36)	<b>A</b>		<b>C</b>							<b>G</b>							<b>A</b>	14	38,9	<b>C2</b>
																		14	38,9	<b>C1</b>
	<b>A</b>		<b>C</b>					<b>A</b>			<b>T</b>						<b>A</b>	2	5,5	<b>C3</b>
	<b>A</b>		<b>C</b>								<b>G</b>							1	2,8	<b>C4</b>
						<b>C</b>					<b>G</b>							1	2,8	<b>C5</b>
	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?						<b>A</b>	2	5,5	
	<b>A</b>		<b>C</b>		<b>G</b>						<b>G</b>							1	2,8	<b>C14</b>
	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	<b>G</b>							1	2,8	
										<b>G</b>								5	50	<b>C2</b>
Беларусь (n = 10)	<b>A</b>		<b>C</b>							<b>G</b>							5	50	<b>C1</b>	
																	5	50	<b>C1</b>	
	<b>A</b>		<b>C</b>								<b>G</b>						4	40	<b>C1</b>	
Украина (n = 11)	<b>A</b>		<b>C</b>							<b>G</b>							5	45,4	<b>C1</b>	
	<b>A</b>		<b>C</b>							<b>G</b>	<b>G</b>						4	27,3	<b>C2</b>	
									<b>C</b>		<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>				1	9,1	<b>C6</b>	
																	1	9,1	<b>C7</b>	
Болгария (n = 5)	<b>A</b>		<b>C</b>							<b>G</b>							3	60	<b>C2</b>	
																	2	40	<b>C1</b>	
Армения (n = 55)	<b>A</b>		<b>C</b>							<b>G</b>							36	65,5	<b>C1</b>	
	<b>T</b>	<b>A</b>								<b>G</b>					<b>A</b>		6	10,9	<b>C2</b>	
									<b>C</b>		<b>B</b>						4	7,3	<b>C8</b>	
																	3	5,5	<b>C7</b>	
	<b>T</b>	<b>A</b>								<b>G</b>				<b>C</b>	<b>A</b>		1	1,8	<b>C9</b>	
	<b>T</b>	<b>A</b>								<b>G</b>		<b>A</b>		<b>A</b>			1	1,8	<b>C10</b>	
	<b>T</b>									<b>G</b>						<b>C</b>	1	1,8	<b>C11</b>	
	?	?	?	?	?	?						<b>G</b>				<b>C</b>	1	1,8	<b>C12</b>	
																	1	1,8	<b>C13</b>	
																	1	1,8	<b>C15</b>	
Азербайджан (n = 8)	<b>A</b>		<b>C</b>							<b>G</b>							5	62,5	<b>C2</b>	
Турция (n = 5)																	3	37,5	<b>C1</b>	
Грузия (n = 2)																	4	80	<b>C1</b>	
	<b>A</b>		<b>C</b>							<b>G</b>							1	20	<b>C2</b>	
Туркменистан (n = 2)																	2	100	<b>C1</b>	
Туркменистан (n = 1)																	1	100	<b>C1</b>	
Китай (n = 1)																	1	100	<b>C1</b>	
Австралия* (n = ?)																	7		<b>C1</b>	
	<b>A</b>		<b>C</b>							<b>G</b>					?	?	?	2		
США* (n = ?)			<b>C</b>							<b>G</b>							?	?		
										<b>G</b>							?	?	<b>C16</b>	
Уругвай* (n = 3)			<b>C</b>							<b>G</b>							2	66,7	<b>C16</b>	
			<b>C</b>	<b>T</b>						<b>G</b>							1	33,3	<b>C17</b>	

\* – литературные данные

При объединении участков *ND1* и *COI* в одну последовательность у *F. hepatica* было выделено 28 комбинаций митотипов, а в выборке *F. gigantica* – 9. Наиболее часто встречаемые у *F. hepatica* по каждому из двух локусов митотипы – N1 и C1, а также N2 и C2 – комбинировали друг с другом, и сочетания N1-C1 и N2-C2 являлись наиболее представленными во всех выборках (где n ≥ 4), а их доля в суммарной выборке составила 34,6 и 27,5 % соответственно. Комбинация N2-C2 отсутствует только в турецкой выборке. В

Болгарии число особей с N1-C1 и N2-C2 одинаково, в России, Беларуси и Азербайджане преобладает N2-C2, в украинской и армянской выборках N1-C1. В Армении наиболее часты N1-C1 (30,2 %), N10-C1 (17,0 %), N11-C1 (13,2 %) и N2-C2 (11,3 %). Остальные комбинации митотипов встречаются в отдельных выборках только у 1–4 особей и в большинстве случаев специфичны для выборки (исключение составляет комбинация N1-C7, найденная в выборках из Армении и Украины).

Для второго вида сосальщика *F. gigantica* число установленных комбинаций достигает 9, и наиболее частыми комбинациями митотипов в исследованной выборке являются FgN1-FgC2 и FgN2-FgC1 (28,6 и 21,1 % от суммарной выборки). Остальные комбинации митотипов уникальны и специфичны для выборок из Туркмении или Таджикистана.

## 2. Филогеография.

Для обработки полученных данных рассматривали всё разнообразие митотипов, между которыми рассчитывали индексы сходства, различий или выявляли генеалогическое родство. Обоснованность и возможности такого подхода подробно изложены в монографии John C. Avise "Phylogeography. The history and formation of species" (2000).

Для каждого из видов *F. hepatica* и *F. gigantica* по каждому из двух генов *ND1* и *COI*, а также суммарной последовательности двух генов были построены дендрограммы, отражающие сходство митотипов.

Митотипы *ND1 F. hepatica* формируют два не очень надёжных кластера, один из которых включает последовательности, наиболее близкие к N1, а второй – близкие к N2. В первой группе достоверно выделяются четыре митотипа, обнаруженных в Армении (N10, 11, 15, 16) и митотип N17 из Турции. Во второй группе с высокой надёжностью можно объединить N2 и близкие к нему митотипы из России, Беларуси и США. Несколько иная дифференциация наблюдается при сравнении митотипов *COI*. В две надёжные обособленные группы объединены три митотипа армянских фасциол (C8, 9, 10) и все остальные 11 митотипов. Среди последних высокое сходство обнаруживают C1 и три митотипа (C7, 12, 13),

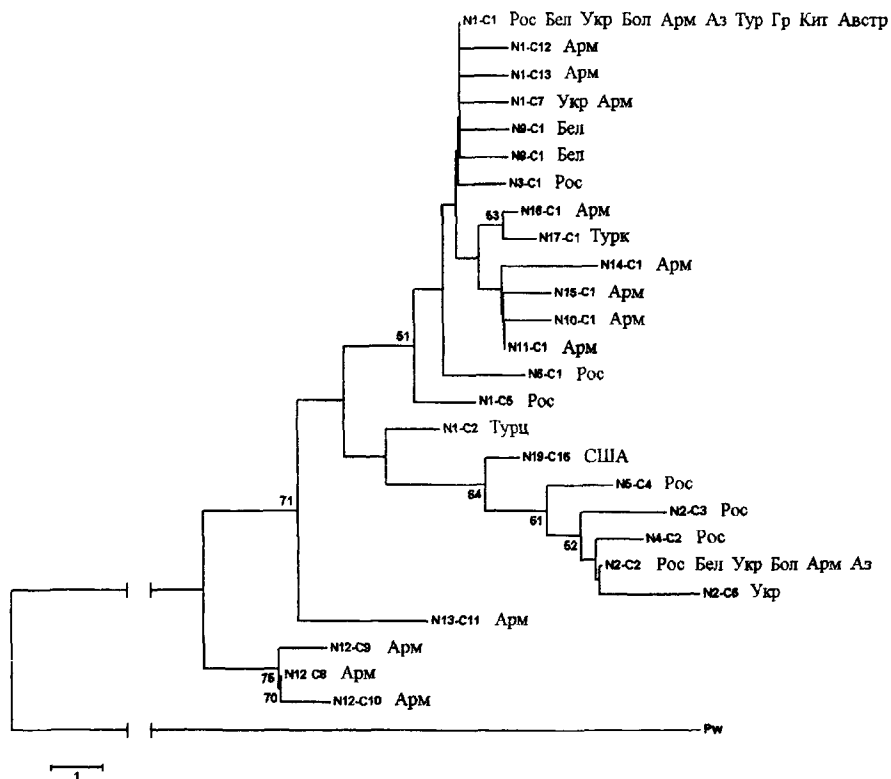
отличающиеся от него единичными заменами и распространенные практически только в Армении, а также два митотипа, обнаруженные в США и Уругвае. Не столь надежно сходство второго доминирующего митотипа С2 с двумя другими, отличающимися от него по двум сайтам, митотипами (С3, С6), распространенными в России и на Украине.

Дифференциация всех митотипов *F. hepatica* на три резко отличающиеся группы можно проследить при анализе полиморфизма объединенных митотипов по двум генам *VD1* и *COI* (в качестве внешней группы использованы последовательности *P. westermani* и *F. gigantica* из Туркмении (Рис. 4). В пределах большего кластера одну большую группу составляют митотипы-производные комбинации N1-C1, а в другую, несколько меньшую по размеру группу объединены производные комбинации N2-C2. Интересно, что небольшая часть характерных только для Армении комбинаций митотипов с высоким индексом нацеленности (100%) составила и третью группу.

Полученная дендрограмма позволяет проследить зависимость сходства митотипов от их географического распространения. В кластеры N1-C1 попадают большая часть митотипов специфичных для Армении, а также последовательность единственной особи из Туркменистана. Митотипы *F. hepatica* из России, Беларуси и Украины входят как в первый кластер (N1-C1), так и во второй (N2-C2). Известные по литературным данным последовательности сосальщиков из США и Уругвая находятся в составе второго кластера, тогда как митотип фасциолы из Австралии встречается практически везде и лежит в основе группы N1-C1. Четыре последовательности, обнаруженные у гельминтов из Армении (N12-C8, C9, C10 и N13-C11), составляют уникальную группу, связанную отдаленным родством с одной из двух вышеуказанных основных групп.

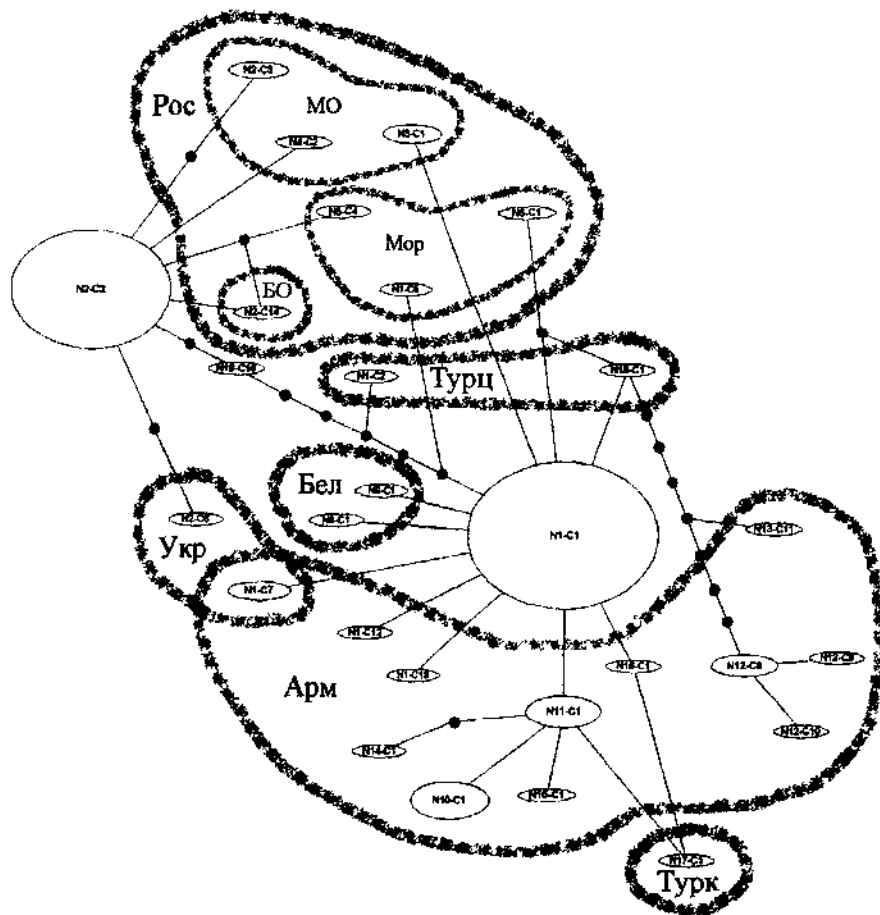
Все эти взаимосвязи наглядно изображены с помощью сети митотипов (Рис. 5), на которой представлены возможные генеалогические связи и территориальное распределение гаплотипов *F. hepatica*.

Рис. 4. Дендрограмма сходства комбинаций митотипов *ND1* и *COI*.



Дифференциация митотипов другого вида печёночного сосальщика *F. gigantica* выглядит иным образом. Гаплотипы из трёх популяций этого вида, расположенные на территории трёх соседствующих среднеазиатских республик (Туркменистана, Узбекистана и Таджикистана), образуют единую сходную группу, отдельно от которой отстоят только два митотипа (FgN7 и FgC4) или одна комбинация (FgN7-FgC4), обнаруженные на территории Туркменистана.

Рис. 5. Статистическая парсимониальная сеть (SPN) для всех установленных комбинаций митотипов *ND1* и *CO1* *F. hepatica*, демонстрирующая число нуклеотидных различий между митотипами, обнаруженными на территории России (Мордовии (Мор), Московской области (МО), Брянской области (БО)), Армении, Украины, Беларуси, Турции, Туркмени и США.



Таким образом, всё многообразие гаплотипов современной *F. hepatica* на исследованном ареале составляют потомки двух значительно дивергировавших линий. Все изученные

популяции различаются соотношением этих линий, причем одна из этих линий (N1-C1) распространена преимущественно в современной популяции из Армении. Кроме Армении, эта линия преобладает в Турции, Грузии, Украине, а также обнаружена у единственных особей из Туркменистана и Китая. Идентичность отдельных участков этой последовательности с соответствующими участками митохондриальной ДНК представителей азиатских популяций (Япония) предполагает азиатское происхождение митотипа N1-C1 и его производных. В меньшей степени эта последовательность характерна для популяций Восточной Европы (Россия, Беларуси, Болгарии), где доминирует вторая линия N2-C2 (Россия) или представленность обеих линий одинакова.

На основании полиморфизма двух митохондриальных генов можно рассчитать время молекулярной дивергенции между двумя линиями. При средней скорости возникновения замен, составляющей 1 – 2 % за 1 млн лет, она могла произойти примерно 0,8 – 1,3 млн лет назад, и примерно в этот же период произошло расхождение между N1-C1 и группой уникальных митотипов, обнаруженных в Армении. Что же касается расхождения между двумя видами *F. hepatica* и *F. gigantica*, то оно может быть датировано 3,5–7 млн лет назад.

## ВЫВОДЫ

1 С помощью RAPD-анализа впервые продемонстрирована высокая индивидуальная генетическая изменчивость печёночного сосальщика *Fasciola hepatica*, паразитирующего в одном животном-хозяине, что обуславливает высокий уровень внутривидовой изменчивости гельминтов из разных частей ареала.

2 RAPD-маркированием генома *F. hepatica* из Украины, Беларуси, Московской области, Мордовии и Армении выявлено пять высокополиморфных и слабо дифференцированных популяций, две из которых из западной части ареала оказались более сходны между собой, чем три популяции из восточной части ареала.

3 Анализ последовательностей ITS2 рДНК подтвердил принадлежность исследуемых популяций к виду *F. hepatica* или *F. gigantica* и выявил на этом участке в популяции *F. hepatica* из Армении одну новую уникальную замену (трансверсия С-С), а в популяциях *F. gigantica* из Туркмении и Таджикистана – две новых уникальных замены (транзиции С-Т и Т-С).

4 Впервые для трематод у *F. hepatica* обнаружены две линии митотипов, включающие группы последовательностей, распределение которых по ареалу позволяет дифференцировать популяции разного происхождения.

5. Время молекулярной дивергенции между двумя видами *F. hepatica* и *F. gigantica* составляет 3,5–7 млн лет назад, а расхождение между двумя линиями *F. hepatica* произошло значительно позднее (0,5–1 млн лет назад).

#### ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1 Морозова Е. В., Рысков А. П., Семёнова С. К. RAPD-изменчивость двух видов трематод (*Fasciola hepatica* и *Dicrocoelium dendriticum*) из популяции крупного рогатого скота // Генетика. 2002. Т. 38. С. 1156–1162.

2 Semyonova S. K., Morozova E. V., Chirsanova G. G., Asatryan A. M., Movsessian S. O., Ryskov A. P. RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke *Fasciola hepatica* // Acta Parasitologica 2003. V 48 № 2. P 125–130

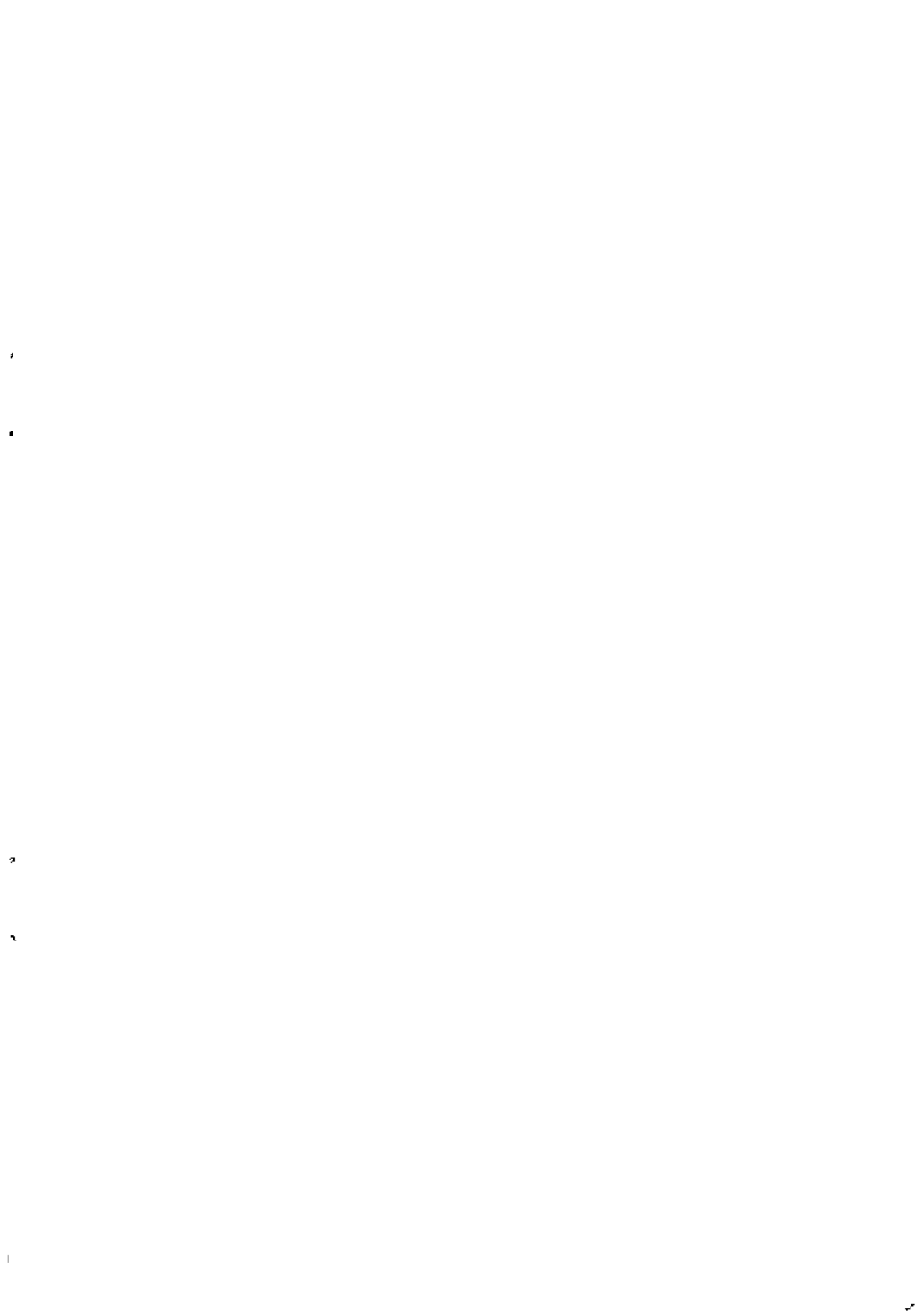
3. Морозова Е. В., Хрисанфова Г. Г., Архипов И. А., Семёнова С. К. Полиморфизм митохондриальных генов *ND1* и *CO1* в популяциях печёночного сосальщика *Fasciola hepatica* // Генетика. 2004 Т. 40. № 7. С. 1155–1162.

*Морозова*



ДЛЯ ЗАМЕТОК

Отпечатано в копицентре « Учебная полиграфия »  
Москва, Ленинские горы, МГУ, 1 Гуманитарный корпус.  
[www.stprint.ru](http://www.stprint.ru) e-mail: [zakaz@stprint.ru](mailto:zakaz@stprint.ru) тел. 939-3338  
Заказ № 75 тираж 100 экз. Подписано в печать 26.11.2004 г.



РНБ Русский фонд

2007-4

1091

19 ЯНВ 2004