

УДК 576.895.122

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ
ТРЕМАТОД *LEUCOCHLORIDIUM PARADOXUM*
НА ТЕРРИТОРИИ ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ
ПО ФРАГМЕНТУ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА *COX1***

© 2021 г. Р. Р. Усманова^{а,*}, А. С. Токмакова^а,
О. Д. Лопатина^а, Е. Е. Прохорова^а

^аРоссийский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
кафедра зоологии, лаборатория экспериментальной зоологии,
наб. р. Мойки, д. 48, Санкт-Петербург, 191186 Россия

*rregina.usmanova@gmail.com

Поступила в редакцию 16.08.2021 г.

После доработки 09.09.2021 г.

Принята к публикации 11.09.2021 г.

Исследован генетический полиморфизм по фрагменту митохондриального гена I субъединицы цитохром-с оксидазы (*cox1*) спорцист трематод *Leucochloridium paradoxum* Cagus, 1835 на территории Ленинградской области (пос. Вырица, пос. Кузьмолово, г. Бокситогорск, г. Любань). Выявлено 10 гаплотипов, средняя генетическая дистанция между которыми составила 0.00237 ± 0.00117 . Среднее генетическое расстояние между изученными выборками составило 0.00219 ± 0.00030 .

Ключевые слова: трематоды, *Leucochloridium*, *cox1*, генотипирование, гаплотипический анализ

DOI: 10.31857/S003118472105001X

Трематоды рода *Leucochloridium* (Trematoda: Leucochloridiidae) используют в качестве промежуточных хозяев моллюсков *Succinea putris* L., 1758 (Gastropoda: Succineidae) (янтарки). Тело спорцист трематод этого рода представляет собой разветвленный стolon, в центральной части которого формируются эмбрионы метацеркарий. Развивающиеся метацеркарии накапливаются в отростках спорцисты, которые по мере своего созревания приобретают характерную окраску. Они способны проникать в глазные щупальца моллюсков и сокращаться (пульсировать), что делает их похожими на личинок насекомых. Паразиты привлекают птиц, которые заражаются при питании (Pojmanska, Machaj, 1991).

Окраска зрелых отростков спористов рода *Leucochloridium* видоспецифична (Ги-нецинская, 1953). Это было доказано с использованием в качестве маркера фрагмента ITS1–5.8S–ITS2 рДНК (Casey et al., 2003; Zhukova et al., 2014; Ataev et al., 2016). Было также показано отсутствие внутривидовых различий между данными нуклеотидными последовательностями. При этом моллюски *S. putris* отличаются внутривидовой консервативностью рДНК и незначительной вариабельностью митохондриальных локусов (Prokhorova et al., 2020a).

Работ, посвященных популяционной структуре видов рода *Leucochloridium*, крайне мало, несмотря на трансконтинентальное распространение этих видов. Ранее была изучена внутривидовая изменчивость трематод рода *Leucochloridium* на территории Японии с использованием в качестве маркера митохондриального гена I субъединицы цитохром-с оксидазы (*cox1*) (Nakao et al., 2019). Наше исследование проведено с целью анализа изменчивости по гену *cox1* трематод *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 Ленинградской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Моллюски *S. putris* (семейство Succineidae), зараженные трематодами *L. paradoxum* ($n = 18$), были собраны на территории Ленинградской области в районе следующих населенных пунктов: пос. Вырица (59°24'42.3"N, 30°19'08.1"E), пос. Кузьмолово (60°08'11.6"N, 30°28'52.8"E), г. Бокситогорск (59°28'36.6"N, 33°48'21.0"E) и г. Любань (59°20'49.8"N, 31°13'53.2"E) в 2013–2021 гг.

Спористы, извлеченных из моллюсков, хранили при температуре –80°C. ДНК выделяли при помощи коммерческого набора ДНК-сорб-С-М (АмплиСенс, Россия) согласно инструкции производителя. Для амплификации участка гена *cox1* была использована пара специфических праймеров: JB3 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') (Bowles et al., 1993) и CoxL (5'-TCCTCCCCAGACCAGTCATAG-3'). Праймер CoxL был сконструирован при помощи программы Primer 3 v. 4.1.0 (Untergasser et al., 2012) с использованием нуклеотидной последовательности гена *cox1 L. paradoxum* из GenBank (LC466790.1). ПЦР проводили с использованием DreamTaq ДНК-полимеразы (Thermo Scientific, Литва) по описанному ранее протоколу с температурой отжига праймеров 55°C (Prokhorova et al., 2020b). Выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля и их очистку производили при помощи коммерческого набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США) согласно инструкции производителя. Секвенирование по Сэнгеру осуществляли в научно-производственной компании «СИНТОЛ».

Анализ секвенограмм, сборку и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) и MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Анализ последовательностей, подсчет нуклеотидного, гаплотипического разнообразия и генетических дистанций осуществляли с использованием программ DNAsp v.6 (Rozas et al., 2017) и MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Для подсчета генетических расстояний, помимо полученных в данном исследовании нуклеотидных последовательностей *L. paradoxum*, использовали данные из GenBank (LC466790.1–LC466795.1). Сети гаплотипов строили при помощи программы PopArt v. 4.8.4 (Leigh, Bryant, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования получено и аннотировано в GenBank 18 последовательностей фрагмента гена *cox1* спористов трематод *L. paradoxum* длиной от 761 до 810 п. н. (табл. 1). В дальнейшей работе использовали выравнивание длиной 761 п. н.

АТ-состав полученных нуклеотидных последовательностей участка гена *cox1* равен 59.1%. Анализ полиморфизмов позволил выявить 10 гаплотипов. Было выявлено 9 синонимичных замен (1.2% от общей длины анализируемого локуса). Во всех случаях изменен последний нуклеотид в триплете. Для гаплотипа Hap_7 характерна замена, приводящая к замене цистеина на триптофан. Вероятно, данная замена не затрагивает функциональный сайт белка.

Таблица 1. Гаплотипическое разнообразие трематод *Leucochloridium paradoxum* на территории Ленинградской области по фрагменту митохондриального гена *cox1*

Table 1. Genetic diversity of *Leucochloridium paradoxum* trematodes from the Leningrad Region based on the *cox1* gene fragment

Место сбора образцов (обозначение популяции)	N	Sh	Hd	Pi	№ последовательностей в GenBank
Вырица (Vyr)	10	5 (Hap_1, Hap_3, Hap_4, Hap_6, Hap_7)	0.84	0.00274	MZ676722-31
Любань (Lub)	3	3 (Hap_3, Hap_8, Hap_9)	1.00	0.00175	MZ676733-34
Бокситогорск (Boks)	3	3 (Hap_2, Hap_3, Hap_5)	1.00	0.00263	MZ676715-17
Кузьмолowo (Kuz)	2	2 (Hap_3, Hap_10)	1.00	0.00131	MZ676735-36
Общее	18	10	0.850	0.00242	

Примечания. Hd – гаплотипическое разнообразие, N – количество образцов, Pi – нуклеотидное разнообразие (на сайт), Sh – количество гаплотипов.

Hd – haplotype diversity, N – number of specimens (sequences), Pi – nucleotide diversity (per site), Sh – number of haplotypes.

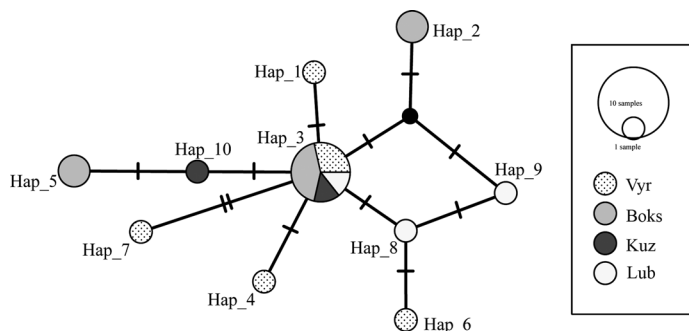


Рисунок 1. Медианная сеть гаплотипов, построенная на основании выравнивания нуклеотидной последовательности фрагмента гена *cox1* трематод *Leucochloridium paradoxum*. Длина выравнивания 761 п. н. Размер кругов соответствует количеству последовательностей, относящихся к гаплотипу. Обозначения места сбора образцов – как в табл. 1. Штрихи – количество нуклеотидных замен. Черный круг – гипотетический гаплотип.

Figure 1. Median-joining haplotype network based on the nucleotide sequences of *cox1* *Leucochloridium paradoxum* trematodes alignment. The length of alignment is 761 b.p. The size of circles in the network is proportional to the frequency of the haplotype. Codes of collection localities as in Table 1. Every mutation is shown as one hatch mark. The solid circle indicates an unobserved hypothetical haplotype.

Гаплотипы на медианной сети формируют звездообразную структуру (рис. 1). При этом основной гаплотип Нар_3 включает наибольшее число последовательностей (7) из всех географических точек. Остальные представлены 1–2 последовательностями и отличаются от основного гаплотипа 1–2 заменами. Большое количество последовательностей, характеризующихся сходными полиморфизмами (Нар_3), может свидетельствовать о том, что данный гаплотип является предковым для всех остальных (Ferreiri et al., 2011).

Звездообразная структура гаплосети и доминирование одного гаплотипа ранее были показаны для трематод *Opisthorchis felineus* Rivolta, 1884 (Brusentsov et al., 2013). Отдельные гаплотипы не приурочены к географическим точкам и у трематод *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Enabulele et al., 2018). Авторы этих работ рассматривают такую картину распределения гаплотипов как результат резкого роста популяции при малом количестве ее основателей (эффект бутылочного горлышка).

Число гаплотипов, выявленное в каждой географической точке, соответствует, как минимум, количеству исследованных образцов. Наиболее представленной по числу гаплотипов (5) является Вырицкая популяция. Однако следует отметить, что для этой точки сбора было изучено наибольшее количество спороцист.

Анализ генетических расстояний показал, что наиболее близки друг к другу популяции из поселков Вырица и Кузьмолово (табл. 2). Самое большое расстояние наблюдалось между популяциями из Вырицы и Бокситогорска, а также из Вырицы и Любани. Среднее генетическое расстояние между изученными выборками составляет 0.00219 ± 0.00030 . Среднее генетическое расстояние между выявленными на территории Ленинградской области гаплотипами составляет 0.00237 ± 0.00117 .

Таблица 2. Генетические дистанции (p-distance) между популяциями трематод *Leucochloridium paradoxum*, рассчитанные на основании нуклеотидной последовательности участка гена *cox1*

Table 2. Genetic distances (p-distance) between *Leucochloridium paradoxum* populations, calculated on the basis of *cox1* gene fragment

Географическая точка	Boks	Vyr	Lub	Kuz
Vyr	0.00250			
Lub	0.00234	0.00250		
Kuz	0.00197	0.00184	0.00197	
Japan	0.03132	0.03132	0.31320	0.03066

Примечания. В анализе использованы 24 последовательности, объединенные в 5 групп в соответствии с точками сбора. Обозначения образцов представлены в табл. 1. В качестве внешней группы были использованы нуклеотидные последовательности *L. paradoxum* из Японии (Japan).

Codes reflect the population groupings (see table 1). Nucleotide sequences of *L. paradoxum* from Japan were used as outgroup.

Полученные данные о генетических дистанциях между выборками *L. paradoxum* на территории Ленинградской области сопоставимы с результатами, описанными для этого вида в Японии. Средняя внутривидовая генетическая дистанция, подсчитанная на основе нуклеотидной последовательности гена *cox1* спорцист *L. paradoxum* на территории острова Хоккайдо, составляет 0.00300 при нуклеотидном разнообразии 0.00150 (Nakao et al., 2019). Соответствующие показатели для изученных в данном исследовании трематод равны 0.00237 и 0.00240. При этом по охваченной исследованием площади и расстоянию между точками сбора выборки сопоставимы. Для Чехии генетические дистанции между исследованными образцами *L. paradoxum* составили 0.00500 ± 0.00300 (Heneberg et al., 2016). Генетические расстояния по исследуемому маркеру между трематодами из Японии и Европы составляют от 0.01600 (с образцами с территории Чехии) (Heneberg et al., 2016; Nakao et al., 2019) до 0.03120 (с территории Ленинградской области России), что свидетельствует о значительной изоляции японских трематод.

В целом, значения генетических дистанций между популяциями *L. paradoxum* сопоставимы с таковыми трематод семейства Leucochloridiidae других видов. У *L. perturbatum* они составляют 0.0050–0.0240, у *L. vogtianum* – 0.0040 ± 0.0030 , у *Urotocus rossitensis* – 0.0360 (Heneberg et al., 2016; Nakao et al., 2019).

Рибосомная ДНК *L. paradoxum* является более консервативной по сравнению с митохондриальной. Ранее было установлено, что все спорцисты этого вида полностью идентичны по протяженным последовательностям (около 5000 п. н.) рДНК, включая самые переменные ее части – внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) (Zhukova et al., 2014). Незначительны различия по участку рДНК и между близкими видами в пределах рода. Между *L. paradoxum* и *L. perturbatum* они составили 1.56% (Ataev et al., 2016). В то же время для других представителей семейства Leucochloridiidae – видов рода *Urogonimus* – показаны намного большие межвидовые различия. По участкам ITS2 и 5.8 S рДНК виды *U. certhiae* и *U. macrostomus* различаются на 6.50 и 6.10%, соответственно (Prokhorova et al., 2020b).

Таким образом, анализ фрагмента митохондриального гена *cox1* позволил выявить генетический полиморфизм спорцист трематод *L. paradoxum* на территории Ленинградской области. С использованием данного маркера было показано, что спорцисты в этой части ареала обособлены от спорцист на территории Японии, однако выявленные различия укладываются в рамки внутривидовой изменчивости.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-34-90012). Секвенирование выполнено за счет средств гранта Президента РФ для государственной поддержки научных исследований молодых российских ученых – кандидатов и докторов наук (№ МК-1015.2021.1.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гинецинская Т.А. 1953. Значение окраски спороцист трематод рода *Leucochloridium* для диагностики вида. Доклады АН СССР 88 (1): 177–179. [Ginetsinskaya T.A. 1953. Znachenie okraski sporocist trematod roda *Leucochloridium* dlya diagnostiki vida. Doklady USSR Academy of Sciences (In Russian)]
- Ataev G.L., Zhukova A.A., Tokmakova A.S., Prokhorova E.E. 2016. Multiple infection of amber snails *Succinea putris* with sporocysts of *Leucochloridium* spp. (Trematoda). Parasitology Research 115 (8): 3203–3208. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5082-6>
- Bowles J., McManus D.P. 1993. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. Molecular and Biochemical Parasitology 57: 231–240. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90199-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90199-8)
- Brusentsov I.I., Katokhin A.V., Brusentsova I.V., Shekhovtsov S.V., Borovikov S.N., et al. 2013. Low genetic diversity in wide-spread eurasian liver fluke *Opisthorchis felineus* suggests special demographic history of this trematode species. PLOS ONE 8 (4): e62453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062453>
- Casey S.P., Bakke T.A., Harris P.D., Cable J. 2003. Use of ITS rDNA for discrimination of European green-and brown-banded sporocysts within the genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloridiidae). Systematic Parasitology 56 (3): 163–168. <https://doi.org/10.1023/b:sypa.0000003809.15982.ca>
- Enabulele E.E., Awharitoma A.O., Lawton S.P., Kirk R.S. 2018. First molecular identification of an agent of diplostomiasis, *Diplostomum pseudospathaceum* (Niewiadomska, 1984) in the United Kingdom and its genetic relationship with populations in Europe. Acta Parasitologica 63 (3): 444–453. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0054>
- Ferreri M., Qu W., Han B. 2011. Phylogenetic networks: A tool to display character conflict and demographic history. African Journal of Biotechnology 10: 12799–12803. <https://doi.org/10.5897/AJB11.010>
- Hall T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.
- Heneberg P., Sitko J., Bizos J. 2016. Molecular and comparative morphological analysis of central European parasitic flatworms of the superfamily Brachylaimoidea Allison, 1943 (Trematoda: Plagiorchiida). Parasitology 143 (4): 455–474. <https://doi.org/10.1017/S003118201500181X>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33 (7): 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Leigh J.W., Bryant D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution 6 (9): 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Nakao M., Sasaki M., Waki T., Iwaki T., Mori Y., Yanagida K., et al. 2019. Distribution records of three species of *Leucochloridium* (Trematoda: Leucochloridiidae) in Japan, with comments on their microtaxonomy and ecology. Parasitology International 72: 101936. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101936>
- Pojmanska T., Machaj K. 1991. Differentiation of the ultrastructure of the body wall of the sporocyst of *Leucochloridium paradoxum*. International Journal for Parasitology 21 (6): 651–659. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90076-J](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90076-J)
- Prokhorova E.E., Usmanova R.R., Ataev G.L. 2020a. An analysis of morphological and molecular genetic characters for species identification of amber snails *Succinea putris* (Succineidae). Invertebrate Zoology 17 (1): 1–17. <https://doi.org/10.15298/invertzool.17.1.01>
- Prokhorova E.E., Vinogradova A.A., Tokmakova A.S., Ataev G.L. 2020b. The first record of the trematode *Urogenimus certhiae* (Trematoda: Leucochloridiidae) in the Eurasian nuthatch *Sitta europaea*. Zoosystematica Rossica 29 (2): 238–246. <https://doi.org/10.31610/zsr/2020.29.2.238>
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence polymorphism analysis of large datasets. Molecular Biology and Evolution 34: 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. 2012. Primer3 – new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40 (15): e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Zhukova A.A., Prokhorova E.E., Tokmakova A.S., Tsybalenko N.V., Ataev G.L. 2014. Identification of species *Leucochloridium paradoxum* and *L. perturbatum* (Trematoda) based on rDNA sequences. Parazitologiya 48 (3): 185–192.

GENETIC VARIABILITY OF *LEUCOCHLORIDIUM PARADOXUM* TREMATODES
FROM THE LENINGRAD REGION WITH THE USE OF THE MITOCHONDRIAL
CYTOCHROME OXIDASE SUBUNIT I (*COX1*) GENE FRAGMENT

R. R. Usmanova, A. S. Tokmakova, O. D. Lopatina, E. E. Prokhorova

Keywords: trematodes, *Leucochloridium*, *cox1*, genotyping, haplotype analyses

SUMMARY

Genetic variability of *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 trematodes from the north-eastern Europe (Russia, Leningrad Region: Vyritsa, Kuzmolovo, Boksitogorsk, Lyuban) based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*cox1*) gene fragment was analyzed. Ten *cox1* haplotypes were revealed. The average genetic distance between samples was 0.00237 ± 0.00117 . The average genetic distance between sampling sites was 0.00219 ± 0.00030 .