



УДК 575.86:595.143.2

Молекулярная идентификация байкальских рыбьих пиявок

И. А. Кайгородова¹, Е. Ю. Петряева²

¹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

² Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: irina@lin.irk.ru

Аннотация. Сравнение нуклеотидных последовательностей маркерных фрагментов гена первой субъединицы митохондриальной цитохром С оксидазы байкальских эндемичных рыбьих пиявок и филогенетически близких им палеарктических видов показал, что байкальские виды имеют уникальные последовательности ДНК, накопившие в ходе эволюции достаточное количество нуклеотидных замен для идентификации видового статуса этих пиявок. Кроме того, вид, обитающий в р. Ангаре, имеет значительное генетическое расстояние от байкальского собрата, что ставит под сомнение его видовую принадлежность.

Ключевые слова: молекулярный анализ, ДНК-штрихкодирование, Piscicolidae, Байкал.

Введение

В последнее десятилетие широкое распространение получили методы молекулярной систематики, зачастую являющиеся единственно возможным способом, позволяющим разобраться в родственных связях таксонов и дать объективную оценку видового разнообразия в экологических исследованиях. Основная идея ДНК-штрихкодирования [3; 6] заключается в том, что некий достаточно короткий стандартный участок ДНК может играть роль уникального маркера, позволяющего однозначно (или почти однозначно, так как существует внутривидовая изменчивость) определить видовую принадлежность организма. Таким образом, создаётся цифровой формат базы данных ДНК-штрихкодов, который допускает полную автоматизацию процесса определения видов.

В этой работе мы попытались применить методы молекулярной систематики для исследования байкальских эндемичных рыбьих пиявок, поскольку морфологи, изучавшие группу, зашли в тупик.

Baicalobdella Dogiel, 1957 – род пресноводных пиявок, эндемичных для озера Байкал, изначально включавший два вида – *B. torquata* Grube, 1871 и *B. cottidarum* Dogiel, 1957, паразитирующих на амфиподах и рогатковых рыбах соответственно. Позднее Е. И. Лукин [2], усомнившись в таксономической значимости *B. cottidarum*, лишил его видового статуса, рас-

ширив диагноз вида *B. torquata* таким образом, что *B. cottidarum* стал его синонимом. Не все специалисты согласились с превращением *B. torquata* по сути в политипический вид, поэтому видовой состав этого рода остаётся до сих пор дискуссионным [4].

Материалы и методы

Сбор и морфологический анализ материала. Сбор проб проводился во время экспедиций на оз. Байкал в 2011–2013 гг. в том числе в зал. Лиственничный, бух. Варначка, Слюдянской губе, Чивыркуйском и Баргузинском заливах, а также в верхнем течении р. Ангары в диапазоне глубин 0–285 м. Материал фиксировался 80%-ным этанолом. Видовая принадлежность определена согласно существующим систематическим ключам [2], а также по отдельным описаниям видов [1; 4].

Молекулярный анализ. Экстракция ДНК сделана фенол-хлороформным методом [9]. Фрагмент гена mtCOI длиной 710 п.н. амплифицирован с использованием праймеров, универсальных для большинства беспозвоночных [8]. Расшифровка первичной структуры ДНК проведена с помощью реакции секвенирования двухцепочечных продуктов амплификации (ЦКП «Геномика», ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

Филогенетический анализ. Выравнивание набора нуклеотидных последовательностей проведено с помощью программы CLUSTAL W [7]. Внутри- и межгрупповые генетические расстояния вычислены в программе MEGA 5.2 [13]. Для выявления областей локального сходства между нуклеотидными последовательностями и вычисления статистической значимости совпадений использовалась программа BLAST [5]. Филогенетические реконструкции выполнены с использованием программ SplitsTree v.4 [10] и PhyML 3.0 [14].

Результаты и обсуждение

Определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена mtCOI длиной 680 п. н. для 14 байкальских рыбьих пиявок, принадлежащих к двум экологическим группам, одна из которых паразитирует на амфиподах (5 экз.), а другая – на бычках-подкаменщиках (9 экз.). Одна из особей, паразитирующих на амфиподах, была отловлена в р. Ангаре. В качестве внешней группы приняты 5 гомологичных последовательностей рыбьих пиявок из международного банка генетических данных: *B. torquata* (AY336018), *C. respirans* (AY336021), *J. arctica* (AY336012), *P. geometra* (AF003280 и AY336014).

Для оптимизации филогенетического анализа подобрана модель молекулярной эволюции, наиболее подходящая для анализа исследуемой выборки нуклеотидных последовательностей. Учитывая наименьший показатель BIC (Bayesian Information Criterion), а также принимая во внимание AIC (Akaike Information Criterion), значение Maximum Likelihood (*lnL*) и другие параметры (включая длину ветвей), была выбрана модель TN92+G (Tamura 3-parameter + Gamma distribution).

Топология простирающегося древа наиболее наглядно демонстрирует эволюционные связи внутри исследуемой группы. Как видно на рисунке, нуклеотидные последовательности байкалобделл разделились на три филогруппы. Группа I включает 10 особей, паразитирующих на байкальских бычках-подкаменщиках и соответствующих исходному описанию *B. cottidarum* [1]. Группа II состоит из особей, собранных с байкальских амфипод и соответствующих морфологическому описанию *B. torquata* sensu Grube, 1871. Байкалобделла из р. Ангары формирует отдельную кладу (III). Такое группирование опровергает моноспецифичность рода *Baicalobdella* и поддерживает идею восстановления вида *B. cottidarum* [4; 11; 12], тем более, что генетическое расстояние *B. torquata* vs. *B. cottidarum* $p = 0,090$. COI-последовательности пиявок, обитающих в р. Ангаре, отличаются на 6,2% от *B. torquata* из Байкала и однозначно далеки от *B. cottidarum* ($p = 0,086$). Таксономическое положение ангарских пиявок требует дополнительного исследования.

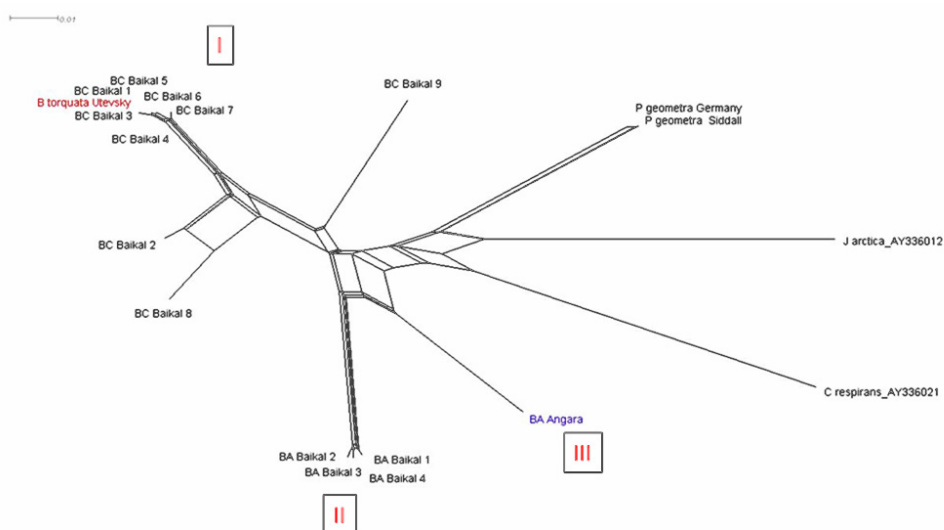


Рис. Простирающееся филогенетическое древо, выведенное на основе сравнения 19 нуклеотидных последовательностей mtCOI байкальских и палеарктических рыбьих пиявок. Группа I – *Baicalobdella*, паразитирующие на коттоидных рыбах (BC); группы II и III – *Baicalobdella*, паразитирующие на амфиподах (BA)

Авторы признательны И. В. Ханаеву, И. В. Клименкову, М. А. Агееву, Н. В. Сороковиковой и А. В. Натягановой за ценный вклад в коллекцию образцов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-0034) и Сибирского отделения РАН (проект СО РАН № 9-Э).

Список литературы

1. Догель В. А. Паразитофауна рыб Байкала / В. А. Догель, И. И. Боголепова // Тр. Байкал. лимнол. станции. – 1957. – № 15. – С. 446–452.

2. Лукин Е. И. Пиявки пресных и соленоватых водоемов / Е. И. Лукин // Фауна СССР. Пиявки / АН СССР. Зоол. ин-т. – 1976. – Т. 1. – С. 1–484.
3. Шнеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журн. общ. биологии. – 2009. – Т. 70, № 4. – С. 296–315.
4. Эпштейн В. М. Annelida / В. М. Эпштейн // Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР / под ред. О. Н. Байер. – 1987. – Т. 3, ч. 2. – С. 340–372.
5. Basic local alignment search tool / S. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. – 1990. – Vol. 215. – P. 403–410.
6. Biological identifications through DNA barcodes / P. Hebert [et al.] // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2003. – Vol. 270, N 1512. – P. 313–321.
7. Clustal W and Clustal X version 2.0 / M. Larkin [et al.] // Bioinformatics. – 2007. – Vol. 23. – P. 2947–2948.
8. DNA primer for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // Mol. Mar. Biol. Biotech. – 1994. – Vol. 3. – P. 294–299.
9. Doyle J. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis / J. Doyle, E. Dickson // Taxon. – 1987. – Vol. 36. – P. 715–722.
10. Huson D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies / D. Huson, D. Bryant // Mol. Biol. Evol. – 2006. – Vol. 23, N 2. – P. 254–267.
11. Kaygorodova I. A. A revised checklist of the Lake Baikal leech fauna // *Lauterbornia*. – 2012. – Vol. 75. – P. 49–62.
12. Kaygorodova I. A. An illustrated checklist of leech species from Lake Baikal (East Siberia, Russia) / I. A. Kaygorodova // *Dataset Papers in Zoology*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–4.
13. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method / K. Tamura [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.
14. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 / S. Guindon [et al.] // *Systematic Biology*. – 2010. – Vol. 59, N 3. – P. 307–321.

Molecular Identification of Baikal Piscine Leeches

I. A. Kaygorodova¹, E. Yu. Petryaeva²

¹ *Limnological Institute SB RAS, Irkutsk*

² *Irkutsk State University, Irkutsk*

Abstract. Comparison of the first subunit of mitochondrial cytochrome C oxidase partial gene sequences belonging to Baikal endemic piscine leeches and phylogenetically close Palaearctic species revealed that two Baikal species have unique DNA sequences, which during their evolution have accumulated sufficient number of nucleotide substitutions to be a molecular species marker. In addition, the species inhabited Angara River has a significant genetic distance from the Baikal population, calling into question its species affiliation.

Keywords: molecular analysis, DNA-barcoding, Piscicolidae, Lake Baikal.

Кайгородова Ирина Александровна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел.: (3952) 42–29–23
e-mail: irina@lin.irk.ru

Kaygorodova Irina Aleksandrovna
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–29–23
e-mail: irina@lin.irk.ru

Петряева Екатерина Юрьевна
студент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24–18–55
e-mail: irina@lin.irk.ru

Petryaeva Ekaterina Yurievna
Student
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24–18–55
e-mail: irina@lin.irk.ru