



УДК 595.421

## **Анализ нуклеотидных последовательностей и определение филогенетического положения клещей *Dermacentor silvarum***

Т. А. Болотова<sup>1</sup>, Н. В. Кулакова<sup>2</sup>, М. А. Хаснатинов<sup>3</sup>,  
Ю. А. Вержуцкая<sup>4</sup>, Е. И. Андаев<sup>4</sup>, С. И. Беликов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Иркутский государственный университет, Иркутск

<sup>2</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

<sup>3</sup>Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН,  
Иркутск

<sup>4</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт

Роспотребнадзора, Иркутск

E-mail: [bolotova\\_t.a@hotmail.com](mailto:bolotova_t.a@hotmail.com)

**Аннотация.** Представлены результаты анализа митохондриального гена 16S rRNA и внутреннего нетранслируемого спейсера – ITS2 клещей *Dermacentor silvarum*, обитающих на территории Иркутской области. Нами установлено высокое генетическое сходство всех исследованных последовательностей *D. silvarum*. В результате филогенетического анализа было показано, что *D. silvarum* и *D. nuttalli* являются близкородственными видами, которые не различаются на основе исследуемых молекулярных маркеров. Установлено, что *D. silvarum* относится к филогенетической ветви, объединяющей евроазиатские виды *Dermacentor* с наиболее близкими видами *D. nuttalli* и *D. marginatus*.

**Ключевые слова:** филогения рода *Dermacentor*, *Dermacentor silvarum*, mt 16S rRNA, ITS2.

### **Введение**

В Восточной Сибири клещи рода *Dermacentor* являются переносчиками ряда опасных для человека заболеваний, таких как клещевой риккетсиоз, Лайм-боррелиоз и клещевой энцефалит [2]. Установлено, что заражённость дермацентровых клещей риккетсиями достигает 70–80 %. На территориях степной и лесостепной зон Иркутской области отмечены два вида клещей: *Dermacentor nuttalli* (Olenev, 1929) и *Dermacentor silvarum* (Olenev, 1931) [11]. В ряде случаев представители этих видов обладают вариabельными фенотипическими признаками, что может затруднять их морфологическое определение [1]. С целью оценки возможности применения молекулярных маркеров для видовой идентификации и определения филогенетического положения *D. silvarum* нами проанализированы два молекулярных маркера: фрагмент митохондриального (mt) гена 16S рРНК и нетранслируемый межгенный спейсер ITS2.

### **Материалы и методы**

Сбор материала проведён в пос. Монды (Республика Бурятия) в 2012 г. Видовую идентификацию проводили по морфологическим признакам с помощью определителей [4; 5]. Пять самок и пять самцов были идентифицированы как *D. silvarum*, остальные восемь клещей взяты в анализ без морфологического определения. Выделение ДНК выполняли с помощью набора Рибо-Сорб (Амплиценс, Москва). Полученные образцы амплифицировали в ПЦР с двумя парами праймеров: 16Sf (5'-TTGCTGTGGTATTTTGACTA-3'), 16Sr (5'-CCGGTCTGAACTCAGATC-3') и 5.8Sf (5'-GGGTTCGATGAAGAACGCAGCCAGC-3'), 28Sr (5'-TTCAGGGGGTTGTCTCGCCTGATG-3') [7; 8]. ПЦР-продукты длиной 440 н. о. (фрагмент гена 16S рРНК) и 1200 н. о. (ITS2) выявляли с помощью электрофореза и очищали из геля 0,8%-ной агарозы. Определение первичных последовательностей ДНК проводили с помощью генетического анализатора ABI 3500xL (Applied Biosystems). Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Редактировали и выравнивали нуклеотидные последовательности в программе BioEdit (v. 7.0.9.0) [9]. Филогенетический анализ проводили методом максимального правдоподобия (maximum likelihood (ML)) на основе двухпараметрической модели Tamura (T92) в 1 000 повторов с помощью программы Mega 5.0 [10].

### **Результаты**

В ходе работы были получены восемнадцать нуклеотидных последовательностей для каждого из анализируемых участков: мт 16S рРНК и ITS2. Вариабельность исследуемых последовательностей была незначительной и не превышала 1,1 % и 0,5 % для 16S и ITS2, соответственно. Гетерогенность фрагмента гена мт 16S рРНК была связана с наличием инсерций и делеций в районах, содержащих Т-А- и Т-повторы. Гетерогенность ITS2 была связана с наличием транзиций в гетерозиготных сайтах. После выравнивания исследуемых нуклеотидных последовательностей идентичные последовательности были удалены из дальнейшего анализа. В результате по три последовательности для каждого из регионов были использованы для построения филогенетических реконструкций. Филогенетические деревья, полученные на основе мт 16S рРНК и ITS2, имели схожую топологию (рис.).

На представленных филогенетических деревьях последовательности *D. silvarum* кластеризовались в одну кладу близкородственных последовательностей вместе с *D. nuttalli* и располагались на филогенетической ветви «евразийских видов», куда также вошли *D. marginatus* и *D. reticulatus*. Близкое филогенетическое родство *D. silvarum* и *D. marginatus* согласуется с выводами, полученными на основе анализа морфологических признаков [6]. Несмотря на то, что все взятые для анализа виды рода *Dermacentor* хорошо различаются на основе исследованных молекулярных маркеров и образуют отдельные клады на филогенетических деревьях, виды *D. silvarum* и *D. nuttalli* представлены единой группой высокогомологичных последовательно-

стей и не могут быть дифференцированы с помощью гена мт 16S рРНК и ITS2.

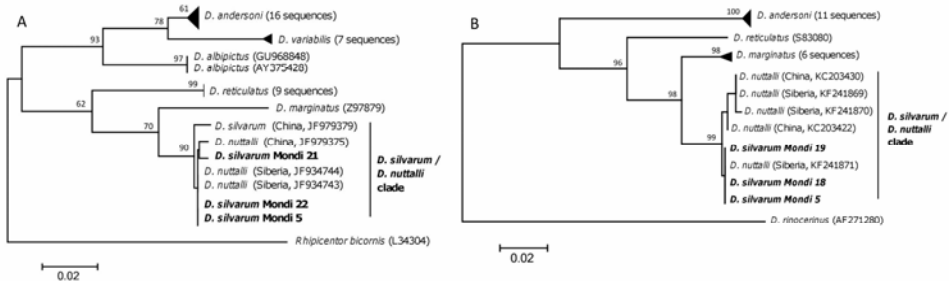


Рис. Реконструкция филогенетических отношений клещей рода *Dermacentor*. Филогенетические деревья построены на основе фрагмента гена 16S рРНК митохондрий длиной 390 н. о. (А) и ITS2 длиной 1066 н. о. (Б). В узлах указаны значения бутстреп-поддержки. Шкала соответствует количеству нуклеотидных замен. В скобках приведены количество последовательностей, место изоляции, номер доступа в базе данных GenBank. Исследованные в работе последовательности выделены жирным шрифтом

### Заключение

На основе проведённого филогенетического анализа было установлено, что род *Dermacentor* представлен двумя филогенетическими линиями, которые совпадают с географическим распространением входящих в них видов. Одна из них объединяет американские виды *D. andersoni*, *D. variabilis*, *D. albipictus*, а другая включает евроазиатские виды *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *D. silvarum* и *D. nuttalli*. Филогенетические реконструкции указывают на близкое родство видов *D. silvarum* и *D. nuttalli*. Анализ внутривидовой варибельности видов рода *Dermacentor* из обеих филогенетических линий указывает на незначительную внутривидовую гетерогенность, в среднем составляющую 2 %, как следует из анализа мт 16S рРНК и ITS2. В то же время нуклеотидные различия, установленные как внутри видов, так и между видами *D. silvarum* и *D. nuttalli*, оказались значительно меньшими (0,5–1 %), что требует дальнейшего изучения. Применение исследуемых молекулярных маркеров не позволило дифференцировать близкие виды *D. silvarum* и *D. nuttalli*. Таким образом, на основе анализа молекулярных маркеров мт 16S рРНК и ITS2 выявлена низкая генетическая гетерогенность исследуемых последовательностей *D. silvarum* и установлено близкое филогенетическое родство с *D. nuttalli*.

### Список литературы

1. Абрамсон Н. И. Молекулярные маркеры, филогеография и поиск критерия разграничения видов / Н. И. Абрамсон // Тр. Зоол. Ин-та РАН, 2009. – Прил. 1. – С. 185–198.
2. Аммосов А. Д. Клещевой энцефалит / А. Д. Аммосов. – Кольцово : Вектор-Бест, 2006. – 115 с.

3. Колонин Г. В. Распространение иксодовых клещей: роды: *Dermacentor*, *Ahocentor*, *Cosmiomma*, *Dermacentronomma*, *Nosomma*, *Rhipicentor*, *Rhipicephalus*, *Boophilus*, *Margaropus*, *Anomalohimalaya* / Г. В. Колонин ; отв. ред. Г. П. Сомов. – М. : Наука, 1984. – 96 с.
4. Сердюкова Г. В. Иксодовые клещи фауны СССР / Г. В. Сердюкова. – Л. : Наука, 1956. – 122 с.
5. Филиппова Н. А. Иксодовые клещи подсемейства Amblyomminae / Н. А. Филиппова // Фауна России. – СПб. : Наука, 1997. – 436 с.
6. Филиппова Н. А. Некоторые аспекты внутривидовой изменчивости близкородственных видов группы *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae) как показатель микроэволюционного процесса / Н. А. Филиппова, М. А. Плаксина // Паразитология. – 2005. – Т. 39, вып. 5. – С. 337–364.
7. Black W.C. 4<sup>th</sup> Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences / W. C. Black, J. Piesman // Proc Natl Acad Sci USA. – 1994. – Vol. 91, N 21. – P. 10034–10038.
8. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences / M. Fukunaqa [et al.] // J. Parasitol. – 2000. – Vol. 86, N 1. – P. 38–43.
9. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // Nucl. Acids. Symp. Ser. – 1999. – N 41. – P. 95–98.
10. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – N 28. – P. 2731–2739.
11. Kolonin G. V. Fauna of Ixodid ticks of the world (Acari, Ixodidae) [Electronic resource] / G. V. Kolonin. – M., 2009. – URL.: <http://www.kolonin.org>.

## Analysis of Nucleotide Sequences and Determination of Phylogenetic Relationships of Ticks *Dermacentor silvarum*

T. A. Bolotova<sup>1</sup>, N. V. Kulakova<sup>2</sup>, M. A. Khasnatinov<sup>3</sup>,  
Yu. A. Verzhutskaya<sup>4</sup>, E. I. Andaev<sup>4</sup>, S. I. Belikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Irkutsk State University, Irkutsk

<sup>2</sup>Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

<sup>3</sup>Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

<sup>4</sup>Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk

**Abstract.** In this work we have presented the results of analysis of mitochondrial 16S rRNA gene and internal transcribed spacer ITS2 of ticks *Dermacentor silvarum* from Irkutsk region. The high genetic homogeneity was found among analyzed sequences of *D. silvarum*. It was shown from phylogenetic analysis that *D. silvarum* and *D. nuttalli* are close related species which could not be differentiated on the basis these molecular markers. We found that *D. silvarum* belonged to phylogenetic lineage that combined Euroasian species of *Dermacentor* where *D. nuttalli* and *D. marginatus* are most close related species.

**Keywords:** phylogeny of *Dermacentor*, *Dermacentor silvarum*, mitochondrial 16S rRNA gene, ITS2 region.

*Болотова Татьяна Андреевна*  
студент  
Иркутский государственный университет  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–18–70  
e-mail: bolotova\_t.a@mail.com

*Кулакова Нина Викторовна*  
кандидат биологических наук  
старший научный сотрудник  
Лимнологический институт СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3  
тел.: (3952) 51–18–74  
e-mail: kulakova@lin.irk.ru

*Хаснатинов Максим Анатольевич*  
кандидат биологических наук  
старший научный сотрудник  
Научный центр проблем здоровья семьи  
и репродукции человека СО РАМН  
664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
тел./факс (3952) 33–39–71  
e-mail: khasnatinov@yandex.ru

*Вержуцкая Юлия Алексеевна*  
кандидат биологических наук  
младший научный сотрудник  
Иркутский противочумный институт  
Роспотребнадзора  
664047, г. Иркутск, ул. Трилисера, 78  
тел.: (3952) 22–01–40  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

*Андаев Евгений Иванович*  
доктор медицинских наук  
заведующий лабораторией  
Иркутский противочумный институт  
Роспотребнадзора  
664047, г. Иркутск, ул. Трилисера, 78  
тел.: (3952) 22–01–40  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

*Беликов Сергей Иванович*  
доктор биологических наук, профессор  
заведующий лабораторией  
Лимнологический институт СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3  
тел. (3952) 42–84–22,  
факс (3952) 42–54–05  
e-mail: sergeibelikov47@gmail.com

*Bolotova Tatyana Andreevna*  
Student  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003  
tel.: (3952) 24–18–70  
e-mail: bolotova\_t.a@mail.com

*Kulakova Nina Viktorovna*  
Candidate of Sciences (Biology)  
Senior Research Scientist  
Limnological Institute SB RAS  
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033  
tel.: (3952) 51–18–74  
e-mail: kulakova@lin.irk.ru

*Khasnatinov Maksim Anatolyevitch*  
Candidate of Sciences (Biology)  
Senior Research Scientist  
Scientific Centre of the Problems of Family  
Health and Human Reproduction SB RAMS  
3, K. Marx st., Irkutsk, 664025  
tel./fax: (3952) 33–39–71  
e-mail: khasnatinov@yandex.ru

*Verzhutskaya Yuliya Alekseevna*  
Candidate of Sciences (Biology)  
Junior Research Scientist  
Irkutsk Antiplague Research Institute of  
Siberia and Far East of Rosпотребнадзор  
78, Trilisser st., Irkutsk, 664047  
tel.: (3952) 22–01–40  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

*Andaev Evgeniy Ivanovich*  
Doctor of Sciences (Medicine)  
Head of Laboratory  
Irkutsk Antiplague Research Institute of  
Siberia and Far East of Rosпотребнадзор  
78, Trilisser st., Irkutsk, 664047  
tel.: (3952) 22–01–40  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

*Belikov Sergey Ivanovich*  
Doctor of Sciences (Biology)  
Professor, Head of Laboratory  
Limnological Institute SB RAS  
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033  
tel.: (3952) 42–84–22  
fax: (3952) 42–54–05  
e-mail: sergeibelikov47@gmail.com