

Н.В. Кулакова ¹, Т.А. Болотова ¹, М.А. Хаснатинов ², С.И. Беликов ¹**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ
КЛЕЩЕЙ РОДА *DERMACENTOR* В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ**¹ Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)² Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

В работе представлены результаты анализа фрагмента гена митохондриальной 16S рДНК клещей *D. silvarum* и *D. nuttalli*, обитающих в Иркутской области. Установлено высокое генетическое сходство исследованных клещей с 99–100 % идентичностью генов *mt16S rRNA*. По результатам филогенетического анализа все исследуемые клещи также являются близкородственными и принадлежат одной кладе, вместе с образцами *D. nuttalli* и *D. silvarum*, обитающими на территории Китая.

Ключевые слова: *Dermacentor nuttalli*, *Dermacentor silvarum*, ген митохондриальной 16S rRNA, филогенетический анализ

**GENETIC IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS
OF *DERMACENTOR* SP. TICKS IN IRKUTSK REGION**N.V. Kulakova ¹, T.A. Bolotova ¹, M.A. Khasnatinov ², S.I. Belikov ¹¹ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk² Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

Here we present the results of the analysis of *mt16S* ribosomal RNA gene of two species of ticks from Irkutsk region – *Dermacentor nuttalli* and *D. silvarum*. The ticks from are closely related to each other with 99–100 % identity of nucleotide sequence of *mt16S rRNA* gene. The phylogenetic analysis has shown that both species are closely related and formed the separate clade together with specimens of *D. nuttalli* and *D. silvarum* from China.

Key words: *Dermacentor nuttalli*, *Dermacentor silvarum*, mitochondrial 16S rRNA, phylogenetic analysis

Иксодовые клещи являются переносчиками ряда заболеваний, среди которых наиболее опасны для человека Лайм-боррелиоз, клещевой энцефалит и клещевой риккетсиоз. Клещи рода *Dermacentor* преимущественно переносят бактерий и риккетсий, зараженность которыми составляет до 70–80 %. В настоящее время на территории Восточной Сибири отмечены два вида клещей, *Dermacentor silvarum* и *Dermacentor nuttalli*, которые обладают схожими фенотипическими признаками, что затрудняет их морфологическое определение. Для генетической идентификации и определения филогенетического положения клещей рода *Dermacentor* нами проанализирован фрагмент гена 16S митохондриальной (mt) ДНК клещей, собранных в Ольхонском и Братском районах Иркутской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клещи *Dermacentor sp.* были собраны с помощью флага в окрестностях д. Булук (Братский район) и Ольхонском районе в 2006–2010 гг. Морфологическую идентификацию клещей проводили с помощью определителей Сердюковой и Филипповой [1–3]. ДНК выделяли из индивидуальных клещей с помощью набора Рибо-Сорб (Амписенс, Москва) и амплифицировали в ПЦР с праймерами 16Sf (5'-TTG CTG TGG TAT TTT GAC TA-3') и 16Sr (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC-3') [4]. ПЦР-ампликоны длиной 440 н.п. очищали из 0,8 % геля агарозы, после электрофоретического

анализа. Первичные последовательности ДНК были получены на приборе CEQ8800 (Beckman Coulter, США). Нуклеотидные последовательности выравнивали и редактировали в программе BioEdit [5]. Филогенетический анализ проводили методом Maximum Likelihood (ML), на основе 1000 повторов, с помощью программы Mega 5.0 [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе выявления морфологических признаков, исследуемые клещи были определены как *D. nuttalli* и *D. silvarum*. Получено 11 нуклеотидных последовательностей клещей, собранных в Ольхонском районе, и 26 последовательностей клещей из Братского района. В результате анализа митохондриального фрагмента 16S рДНК длиной 380 н.о. обнаружены два переменных участка ТА и Т-повторов, где отмечены вставки и делеции длиной 1–2 н.о., а также две последовательности несли единичные замены по типу трансверсий.

За исключением вставок и делеций в переменных регионах, сходство полученных последовательностей было достаточно высоким, 98,9–100 %. В то же время, сходство с последовательностями *D. silvarum* и *D. nuttalli* из Китая составило 98,9–99,7 %. Несмотря на то, что существенные различия (гетерогенность 4–12 %) наблюдались при сравнении *mt 16S рДНК* других видов рода *Dermacentor* (*D. marginatus*, *D. occidentalis*, *D. hunteri*, *D. reticulatus*, *D. albipictus*, *D. variabilis*, *D. andersoni*, *D. nitens*), все исследуемые последова-

тельности а также последовательности *D. silvarum* и *D. nuttalli* из Китая были высоко гомологичными (гетерогенность 0–1 %), что указывает на их возможную принадлежность к одному виду.

Филогенетическое дерево получено с помощью метода максимального правдоподобия (ML) на основе фрагмента длиной 388 н.о.. В результате филогенетического анализа установлено, что род *Dermacentor* представлен двумя филогенетическими линиями, одна из которых объединяет виды, распространенные в Америке (*D. andersoni*, *D. hunteri*, *D. variabilis*, *D. albipictus*, *D. nitens*, *D. occidentalis*), а другая представлена видами, сформированными в Евразии (*D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. nuttalli*, *D. silvarum*). В результате построения филогенетических деревьев, показано, что все проанализированные последовательности наиболее близко кластеризовались с *D. nuttalli* и *D. silvarum* из Китая и формировали отдельную кладу. В ближайшую близкородственную кладу вошли последовательности вида *D. marginatus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате анализа фрагмента митохондриальной 16S рДНК степных клещей *D. nuttalli* и *D. silvarum* в двух районах Иркутской области, установлено высокое генетическое сходство исследованных видов клещей с 99–100 % идентичностью генов mt16S rRNA. По результатам филогенетического анализа все исследуемые клещи также являются близкородственными и

принадлежат одной кладе, вместе с образцами *D. nuttalli* и *D. silvarum*, обитающими на территории Китая. Полученные результаты не согласуются с данными морфологической идентификации указанных видов и способствуют дальнейшему рассмотрению вопроса таксономического положения видов *D. nuttalli* и *D. silvarum* с привлечением дополнительных молекулярно-генетических маркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сердюкова Г.В. Иксодовые клещи фауны СССР. — М., Л.: Изд-во АН СССР, 1956. — 122 с.
2. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи. Подсемейства Ixodinae // Фауна СССР. Паукообразные. — Л.: Наука, 1977. — 396 с.
3. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. *Amblyomminae* // Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные. — СПб.: Наука, 1997. — Т. 4. Вып. 5. — 436 с.
4. Black, WC 4th, Piesman J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1994. — Oct 11, Vol. 91 (21). — P. 10034–10038.
5. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
6. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar, S., 2011 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution.

Сведения об авторах

Кулакова Нина Викторовна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории Аналитической биоорганической химии ФГБУ науки Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; тел. (3952)511-874)

Болотова Т.А. – студентка биолого-почвенного факультета Иркутского Государственного Университета (664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5; тел. (3952)241-870).

Хаснатинов Максим Анатольевич – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. (3952)333-971)

Беликов Сергей Иванович – д.б.н., проф., зав. лаб. аналитической биоорганической химии ФГБУ науки Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; тел. (3952)511-874)