

Н.В. Кулакова¹, Т.А. Болотова¹, М.А. Хаснатинов², С.И. Беликов¹

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

Н.В. Кулакова¹, Т.А. Болотова¹, М.А. Хаснатинов², С.И. Беликов¹

¹ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

² 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 (Амплисенс, 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 вариабельных 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 вариабельных 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 биологического-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)