

## Анализ ITS1 и ITS2 рибосомной ДНК в популяциях моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda) в Ленинградской и Калининградской областях России

Е. Е. ПРОХОРОВА, Е. А. ЖЕМЧУЖНИКОВА, Г. Л. АТАЕВ

Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена  
191186, Санкт-Петербург, Набережная р. Мойки, 48  
E-mail: elenne@mail.ru, soulmatebm@mail.ru, ataev@herzen.spb.ru

Статья поступила 30.01.2015

Принята к печати 24.02.2015

### АННОТАЦИЯ

Получены и проанализированы нуклеотидные последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК (ITS1 и ITS2) моллюсков *Planorbarius corneus* из природных популяций на территории Ленинградской и Калининградской областей. Высокий процент сходства ITS1 и ITS2 моллюсков из разных точек сбора подтверждает, что роговая катушка – полиморфный, но единый вид.

**Ключевые слова:** гастроподы, *Planorbarius corneus*, генотипирование, рДНК, внутренние транскрибируемые спейсеры.

Моллюски *Planorbarius corneus* (L. 1758) – широко распространенный вид на территории Европы и Западной Сибири [Старобогатов, 1970]. Они являются одним из важнейших объектом гидробиологических и паразитологических исследований (как промежуточные хозяева многих видов трематод). Кроме того, исторически роговые катушки служат универсальной моделью для зоологических и эколого-физиологических работ.

В качестве классических морфологических критериев для видового определения планорбид приняты размеры раковины, характер закрученности, а также анатомические особенности репродуктивной системы и радулы моллюска [Жадин, 1952; Gloer, 2002]. Высокая степень изменчивости данных признаков у роговых катушек затрудняет установление

видовой принадлежности на основе исключительно морфологических критериев. Этим объясняется дискуссионность систематического статуса моллюсков *P. corneus*, сохраняющаяся на протяжении десятилетий. В традиционной классификации роговые катушки рассматриваются как единый полиморфный вид – *P. corneus* [Жадин, 1952; Gloer, 2002]. Согласно другому мнению, эти моллюски составляют надвидовой комплекс *Planorbarius* [Максимова, 1995; Стадниченко, 1990; Старобогатов и др., 2004]. В классификации Я. И. Старобогатова (основанной на морфологических критериях), на которую ссылается большинство современных определителей, число видов в составе этого комплекса достигает до восьми [Старобогатов и др., 2004; Цалолихин, 2004; Кантор, Сысоев, 2005].

Сложившаяся ситуация с видовой идентификацией обусловила необходимость проведения молекулярно-генетических исследований роговых катушек. Один из стандартных методов выявления генотипических различий между близкими группами – сравнение нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) рДНК. Анализ ITS позволяет прояснить филогенетическое положение организмов с противоречивым систематическим положением [Stothard et al., 1996; Remigio, Blair, 1997; Bargues et al., 2001], а также выявить даже незначительные внутривидовые и межвидовые дивергенции у гастропод [Vidigal et al., 2004]. В данной работе получены и проанализированы нуклеотидные последовательности рДНК роговых катушек.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Моллюски *P. corneus* собраны в 2009–2013 гг. в двух точках на территории Ленинградской обл.: в р. Оредеж в районе пос. Вырица ( $n = 12$ ) и в оз. Сюевярви в дер. Хиттолово Всеволожского района ( $n = 10$ ); в Калининградской обл. – в пруду пос. Рыбачий Куршской косы ( $n = 10$ ). Видовую принадлежность моллюсков определяли на основе морфологических критериев по определителю П. Глоера [Gloer, 2002].

С целью предотвращения внесения ДНК паразита использовались только незараженные моллюски. В течение двух недель проводился контроль зараженности улиток по эмиссии церкарий. Кроме того, в процессе сбора материала ткани моллюсков тщательно просматривались на наличие трематод.

Хромосомную ДНК выделяли из тканей ноги моллюсков путем экстракции фенолом-хлороформом из ядер, очищенных при центрифугировании через сахарозную подушку по стандартной методике [Maniatis et al., 1989]. Полученный осадок высушивали, а затем разбавляли в 20 мкл ТЕ-буфера. Для оценки нативности и чистоты образцы ДНК визуализировали в 0,8%-ном агарозном геле.

Праймеры на участки ITS1 и ITS2 подбирали с помощью компьютерных программ Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) и GeneRunner

(<http://www.generunner.net>) с использованием нуклеотидных последовательностей участков рДНК *P. corneus* (FR797811.1; AY465059.1) и *Biomphalaria glabrata* (AY030377.1), представленных в базе данных GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Для амплификации участка ITS1 использовали праймеры Forward (F) (5' TCGGAT TGGTCTCGGTCTG3') и Reverse (R) (5' GCGT TCAAGATGTCGATGTTTC3'), захватывающие участки 18S (FR797811.1) и 5,8S (AY030377.1) рДНК соответственно. Регион ITS2 амплифицировали с праймерами F (5' TTGCAGAA CACATTTGAACATCG3') и R (5' GGAGTTTACCACCCGCTTTG3'), комплементарными участкам 5,8S (AY030377.1) и 28S (AY465059.1) рДНК соответственно.

Для ПЦР использовали по 1 нг ДНК на 20 мкл в реакционной смеси, содержащей 0,2 мкл Taq-полимеразы, 0,2 мкл dNTPs, 5 × ПЦР-буфера – 4 мкл ("ИнтерЛабСервис", Москва) и по 0,5 мкл каждого праймера ("Syntol", Москва). Температурный профиль ПЦР включал в себя: 1 цикл (94 °С, в течение 5 мин), 35 циклов (94 °С, 1 мин, 66 °С (для ITS1) и 64 °С (для ITS2), 1 мин, 72 °С 1 мин 10 с), а также 1 цикл (72 °С, в течение 7 мин). Электрофоретический анализ ПЦР-фрагментов рДНК осуществляли в 1,4%-ном агарозном геле по стандартной методике [Maniatis et al., 1989].

Полученные ПЦР-продукты очищались на колонках WizardSVGel (Promega Corporation, USA) согласно протоколу производителя и секвенировались с помощью секвенатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, USA). Секвенирование каждого ПЦР-продукта осуществлялось в двух направлениях. Полученные секвенограммы выравнивали и сравнивали между собой и с нуклеотидными последовательностями, имеющимися в базе данных GeneBank с помощью программы MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net>). Дендрограммы для каждого ITS построены в той же программе по алгоритму и Maximum likelihood со значениями бутстрепа для 1000 повторов, по модели Hasegawa – Kishino – Yano с гамма-коррекцией. В качестве внешнего контроля использованы нуклеотидные последовательности моллюсков *B. glabrata*, относящихся к линиям, выведенным из моллюсков разных

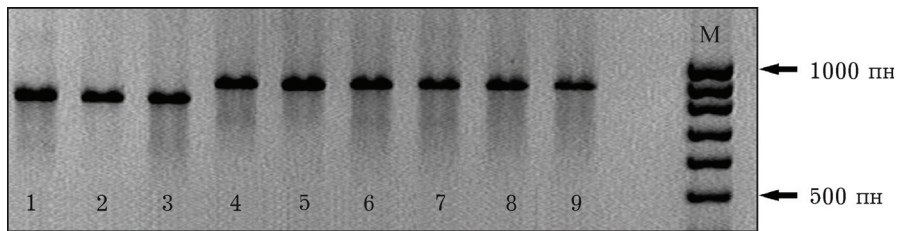


Рис. 1. ПЦР-продукты, получаемые на ДНК *Planorbarius corneus* со специфическими праймерами к ITS1 (1–3) и ITS2 (4–9). Электрофорез в 1,4%-ном агарозном геле, окрашивание бромистым этидием. М – маркер молекулярных весов (100–1000 пн)

географических популяций: биомфаларии из популяции Aragua (Венесуэла) (AY030377.1); моллюски из популяции Salvador, Bahia (Бразилия) (AY030376.1); улитки из популяции Rio Grande Town (Пуэрто Рико) (AY030375.1); биомфаларии из популяции Jarabacoa (Доминиканская Республика) (AY030374.1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По морфологическим критериям все собранные моллюски отнесены к одному виду *P. corneus*. Никаких различий по морфологическим признакам между особями из разных популяций нами не обнаружено.

<i>P. corneus</i> 2	1- -----C G A G A A G A G C T C G A A C T C G A T C G C T T G G A G A A A G T A A A A G T C G T A A C A
<i>P. corneus</i> 1, 3	1- G G C C C G T T G G C C G A G A A G A G C T C G A A C T C G A T C G C T T G G A G A A A G T A A A A G T C G T A A C A
<i>P. corneus</i> 2	65- A G G T T T C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A C G A A T A A T T O G A T C O G A A C G A T O G
<i>P. corneus</i> 1, 3	65- A G G T T T C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A C G A A T A A T T O G A T C O G A A C G A T O G
<i>P. corneus</i> 2	125- A A T G T C C G T C A C A A T G T G C A C G A A T G T A C G T - A A A A A C C G G C C T G G G G G T C A A A C C G C A
<i>P. corneus</i> 1, 3	125- A A T G T C C G T C A C A A T G T G C A C G A A T G T A C G T A A A A A C C G G C C T G G G G G T C A A A C C G C A
<i>P. corneus</i> 2	185- T G A A G O G C C G C C T G G T C G G A T G A C C G C T C C T T T G T C G G G G T A C C T A T T T T G T C C T A A A T G
<i>P. corneus</i> 1, 3	185- T G A A G O G C C G T C T G G T C G G A T G A C C G C T C C A T T T G T C G G G G T A C C T A T T T T G T C C T A A A T G
<i>P. corneus</i> 2	245- C G A T C C A C G G T G A C G G C T T A G A G T C T A C G G A C T C G C C G G G T C G C G A G G T T C A A A G A G T G G
<i>P. corneus</i> 1, 3	245- C G A T C C A C G G T G A C G G C T T A G A G T C T A C G G A C T C G C C G G G T C G C G A G G T T C A A A G A G T G G
<i>P. corneus</i> 2	305- C C T A G T C O G C T A T G C G C G C A G A C A G C T C G T T G T A G O G C A G A A G A G T T G T G C G A C C G C
<i>P. corneus</i> 1, 3	305- C C T G G T C O G C T A T G C G C G A C A G A C A G C T C G T T G T A G O G C A G A A G A G T T G T G C G A C C G C
<i>P. corneus</i> 2	365- C C C A C C A C T A T T T T A T T T T T G C T C T G A A A T A A A A G T A G T T T G G T T T G T C C G A G A A A G A
<i>P. corneus</i> 1, 3	365- C C C A C C A C T A T T T T A T T T T T G C T C T G A A A T A A A A G T A G T T T G G T T T G T C C G A G A A A G A
<i>P. corneus</i> 2	425- A G T C A C T C A C A G G T A C C T A T G T C C C C G T O G C A C T G A A A G C T C T G T A A G T G C G A T G T C G
<i>P. corneus</i> 1, 3	425- T G - - - - T C A C A G G T A C C T A T G T C C C C G T O G C A C T G A A A G C T C T G T A A G T G C G A T G T C G
<i>P. corneus</i> 2	485- G C G G A T G G A A G C T C C A C G C T C G T T T T G T G G G C C G C G A G G T T C A A A G A G C O G A T G A G G C C
<i>P. corneus</i> 1, 3	485- G C G G A T G G A A G C T C C A C G C T C G T T T T G T G G G C C G C G A G G T T C A A A G A G C O G A T G A G G C C
<i>P. corneus</i> 2	545- G G G - A G G G G G T G A T C T C T C A C C T C C T C T C C T G G C T G A T G A C O G G C C G C C T G G T C T T C T
<i>P. corneus</i> 1, 3	545- G G G - A G G G G G T G A T C T C T C A C C T C C T C T C C T G G C T G A T G A C O G G C C G C C T G G T C T T C T
<i>P. corneus</i> 2	605- T G C T A T T T C A T T T T G T A C C A A A A C G C A T T A T G C T C A A T T T A T T A A A A A C T T G G T G A C A A
<i>P. corneus</i> 1, 3	605- T G C T A T T T C A T T T T G T A C C A A A A C G C A T T A T G C T C A A T T T A T T A A A A A C T T G G T G A C A A
<i>P. corneus</i> 2	665- G G A A C A A A A A G T T A A C A A C T T T G A G C G G T G G A T C A C T C G C T C G T C G T C G A T G A A G A G
<i>P. corneus</i> 1, 3	665- G G A A C A A A A A G T T A A C A A C T T T G A G C G G T G G A T C A C T C G C T C G T C G T C G A T G A A G A G
<i>P. corneus</i> 2	725- C G C A G C C A G C T G C G T G A A T T A A T G T G A A T T G C A G A A C A C A T T G A A C A T C G A - - - - -
<i>P. corneus</i> 1, 3	725- C G C A G C C A G C T G C G T G A A T T A A T G T G A A T T G C A G A A C - - - - -

Рис. 2. Сравнение нуклеотидных последовательностей ITS1 рДНК моллюсков *Planorbarius corneus* из разных популяций

*P. corneus* 1 – моллюски, собранные в р. Оредеж в Гатчинском р-не Ленинградской обл.; *P. corneus* 2 – моллюски из оз. Сюевярви; *P. corneus* 3 – моллюски, собранные в пос. Рыбачий Калининградской обл. Жирным шрифтом обозначена нуклеотидная последовательность. Выделены различия в последовательностях между популяциями. Числа – позиции нуклеотидов в секвеннограммах



<i>P. corneus</i> 3	1- ---- TTGC-AGCACACGCGGCCCTCGGCTCAA TC CCGGGGCCACGTC CGTCTGAGGGTC
<i>P. corneus</i> 2	1- GAACTTTGCAAGCACATGCGGCCCTCGGGA CAA TC CCGGGGCCACGTC CGTCTGA-GGTC
<i>P. corneus</i> 1	1- -----C GGCCTCGGCTCAG TC CCGGGGCCACGTC CGTCTGAGGGTC
<i>P. corneus</i> 3	65- GGT TGGCTTAAAGCAATCGGTA CGAATTTGGTTGTA GGGCA CGTCT OCTCT OGC TC TC
<i>P. corneus</i> 2	65- GGT TGGCTTAAAGCAATCGGTA CGAATTTGGTTGTA GGGCA CGTCT OCTCT OGC TC TC
<i>P. corneus</i> 1	65- GGT TGGCTTAAAGCAATCGGTA CGAATTTGGTTGTA GGGCA CGTCT OCTCT OGC TC TC
<i>P. corneus</i> 3	125- TATGAGACGGGACTGGCTGTCATGTA GCGCA TTTGGGCCGTC GCGGATAGCGCTTGC CG
<i>P. corneus</i> 2	125- TATGAGACGGGACTGGCTGTCATGTA GCGCA TTTGGGCCGTC GCGGATAGCGCTTGC CG
<i>P. corneus</i> 1	125- TATGAAACGGGACTGGCTGTCATGTA GCGCA TTTGGGCCGTC GCGGATAGCGCTTGC CG
<i>P. corneus</i> 3	185- ACC TC CTT TC CCGACGATGA OGA TC GAG TG GGT GC TTG CT CTG GCG CC OCT CT TTT GT TG
<i>P. corneus</i> 2	185- GCC TC CTT TC CCGACGATGA OGA TC GAG TG GGT GC TTG CT CTG GCG CC OCT CT TTT GT TG
<i>P. corneus</i> 1	185- ACC TC CTT TC CCGACGATGA OGA TC GAG TG GGT GC TTG CT CTG GCG CC OCT CT TTT GT TG
<i>P. corneus</i> 3	245- TTGTTGGA TC GTTGGCTGCTTC GCATGTC OCCGTGGCCTTAA GTA CAGGATGCGCGTC
<i>P. corneus</i> 2	245- TTGTTGGA TC GTTGGCTGCTTC GCATGTC OCCGTGGCCTTAA GTA CAGGATGCGCGTC
<i>P. corneus</i> 1	245- TTGTTGGA TC GTTGGCTGCTTC GCATGTC OCCGTGGCCTTAA GTA CAGGATGCGCGTC
<i>P. corneus</i> 3	305- ATCCTCCTGTCCA TTTCTATGCTA CTA AAGCC TGGTC TGTGATCTCTTAC OGCAGGGCAGGA
<i>P. corneus</i> 2	305- GTCCTCCTGTCCA TTTCTATGCTA CTA AAGCC TGGTC TGTGATCTCTTAC OGCAGGGCAGGA
<i>P. corneus</i> 1	305- ATCCTCCTGTCCA TTTCTATGCTA CTA AAGCC TGGTC TGTGATCTCTTAC OGCAGGGCAGGA
<i>P. corneus</i> 3	365- CCGGCTC GTTTG TG TAA CAACAATGGGCCAAGCGGACTAGCCTTGC TCTCTCAAAA GG
<i>P. corneus</i> 2	365- CCGGCTC GTTTG TG TAA CAACAATGGGCCAAGCGGACTAGCCTTGC TCTCTCAAAA GG
<i>P. corneus</i> 1	365- CCGGCTC GTTTG TG TAA CAACAATGGGCCAAGCGGACTAGCCTTGC TCTCTCAAAA GG
<i>P. corneus</i> 3	425- TGA GG GATGGGCCGCATAGCAGCGTTGATACGGCAA TTAGCGCCGCCCTACAGCCT
<i>P. corneus</i> 2	425- TGA GG GATGGGCCGCATAGCAGCGTTGATACGGCAA TTAGCGCCGCCCTACAGCCT
<i>P. corneus</i> 1	425- TGA GG GATGGGCCGCATAGCAGCGTTGATACGGCAA TTAGCGCCGCCCTACAGCCT
<i>P. corneus</i> 3	485- TCTTCATTGAAGGTGGCGTATAT TATAGAAAATATT TTTCTATCTATATCCGACCTCA
<i>P. corneus</i> 2	485- TCTTCATTGAAGG-A TGGTG TATAGGATAGAAAATATT TTTCTATCTATATCCGACCTCA
<i>P. corneus</i> 1	485- TCTTCATTGAAGGTGGCGTATAT TATAGAAAATATT TTTCTATCTATATCCGACCTCA
<i>P. corneus</i> 3	545- GATCGGCCGAGATTA CCGCC TGAATTTAAGCATATAA TTAAGCGGAGGAAAAGAAACTAA
<i>P. corneus</i> 2	545- GATCGGCCGAGATTA CCGCC TGAATTTAAGCATATAA TTAAGCGGAGGAAAAGAAACTAA
<i>P. corneus</i> 1	545- GATCGGCCGAGATTA CCGCC TGAATTTAAGCATATAA TTAAGCGGAGGAAAAGAAACTAA
<i>P. corneus</i> 3	605- CAA GGATTTC GTTAGTAA CGGCGAGTGAAG CCGAAATA GC OCA GCA CC GAA TC CCC CAGT
<i>P. corneus</i> 2	605- CAA GGATTTC GTTAGTAA CGGCGAGTGAAG CCGAAATA GC OCA GCA CC GAA TC CCC CAGT
<i>P. corneus</i> 1	605- CAA GGATTTC GTTAGTAA CGGCGAGTGAAG CCGAAATA GC OCA GCA CC GAA TC CCC CAGT
<i>P. corneus</i> 3	665- GTAACGCTGGC-GGG AAC TG TGG TG TAT GGGACGC CAC CA -GT TGCAT GCG CG GGG CATC
<i>P. corneus</i> 2	665- GTAACGCTGGC GGG AAC TG TGG TG TAT GGGACGC CAC CA TGT TGCAT GCG CG GGG CATC
<i>P. corneus</i> 1	665- GTAACGCTGGC-GGG AAC TG TGG TG TAT GGGACGC CAC CA -GT TGCAT GCG CG GGG CATC
<i>P. corneus</i> 3	725- GAA GT CCT CC TGA TC GGG GC CAT CA CCC AG AGT GGG TG TAAGG CCT TT GCA GG TGT CC TG
<i>P. corneus</i> 2	725- GAA GT CGT CC TGA TC GGG GC CAT CA CCC AG AGT GGG TG TAAGG CCT T -A CA TGT TC GG
<i>P. corneus</i> 1	725- GAA GT CCT CC TGA TC GGG GC CAT CA CCC AG AGT GGG TG TAAGG CCT TT GCA GG TGT CC TG
<i>P. corneus</i> 3	785- CCG TG CCG CC GCG AG CTT -- CAG GA GCG GG
<i>P. corneus</i> 2	785- CCG TG GGG CC GCG AG CCT CT CAG GA GCG GG
<i>P. corneus</i> 1	785- CCG TG CCG CC GCG AG CTT

Рис. 3. Сравнение нуклеотидных последовательностей ITS2 рДНК моллюсков *Planorbarius corneus* из разных популяций.

Усл. обозн. см. на рис. 2

На всех препаратах ДНК *P. corneus* с использованием специфических праймеров получен ПЦР-продукт в диапазоне его расчетной длины: для ITS1 – около 750 пн (пар нуклеотидов), для ITS2 – 800 пн (рис. 1).

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал, что размер участка ITS1 рДНК у моллюсков *P. corneus* исследованных популяций составляет 585–589 пн, ITS2 – 536–538 пн (рис. 2, 3). На сегодняш-

ний день это единственные полные последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров *P. corneus*.

При сравнении полученных нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 с участками последовательностей *P. corneus*, представленных в GeneBank (AY350508.1 и FR797830.1 соответственно) выявлены небольшие расхождения. Вероятно, различия обусловлены неоднозначными прочтениями нук-

Т а б л и ц а 1

Различия в нуклеотидных последовательностях внутренних транскрибируемых спейсеров 1 и 2 моллюсков *Planorbarius corneus* из разных популяций

Участок рДНК	Популяция	Делеции/инсерции	Замены	Однонуклеотидные полиморфизмы
ITS1	<i>P. corneus</i> 1	0	0	0
	<i>P. corneus</i> 2	1/4	6	6
	<i>P. corneus</i> 3	0	0	0
ITS2	<i>P. corneus</i> 1	0	6	6
	<i>P. corneus</i> 2	1	10	8
	<i>P. corneus</i> 3	1	0	0

П р и м е ч а н и е. Усл. обозн. см. на рис. 2.

Т а б л и ц а 2

Генетические дистанции, полученные на основе анализа нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 рДНК моллюсков *Planorbarius corneus* из разных популяций

Сравниваемые образцы		ITS1		ITS2	
		<i>Dist</i>	<i>Std. Err</i>	<i>Dist</i>	<i>Std. Err</i>
<i>P. corneus</i> 3	<i>P. corneus</i> 1	0,00	0,00	0,01	0,00
<i>P. corneus</i> 3	<i>P. corneus</i> 2	0,01	0,00	0,02	0,01
<i>P. corneus</i> 1	<i>P. corneus</i> 2	0,01	0,00	0,03	0,01
<i>P. corneus</i> 3	<i>B. glabrata</i>	1,52	66,69	2,01	38,21
<i>P. corneus</i> 1	<i>B. glabrata</i>	1,52	66,69	1,97	38,21
<i>P. corneus</i> 2	<i>B. glabrata</i>	1,50	66,69	2,04	37,81

П р и м е ч а н и е. В качестве внешнего контроля использованы моллюски *Biomphalaria glabrata*. *Dist* – генетическая дистанция; *Std. Err* – стандартное отклонение.

леотидов в последовательностях из базы данных.

Никаких внутривидовых различий в нуклеотидных последовательностях ITS *P. corneus* из одних точек сбора не выявлено. При сравнении нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 рДНК моллюсков разных популяций обнаружены различия, представленные в табл. 1. В основном это однонуклеотидные полиморфизмы. Однако участок ITS1 рДНК всех моллюсков из оз. Сюевярви включает инсерцию в четыре нуклеотида в позиции 337–340 пн, отсутствующую у исследованных моллюсков из двух других популяций (см. рис. 3).

Межпопуляционные генетические дистанции, посчитанные на основе попарных генетических расстояний для внутренних транскрибируемых спейсеров 1 и 2 варьируют от 0,00 до 0,01 % и от 0,01 до 0,03 % соответственно. Наибольшее значение генетической дистанции (0,03 %) выявлено между улитка-

ми из р. Оредеж и оз. Сюевярви. При сравнении данных популяций с внешним контролем получены следующие значения генетических дистанций: 1,50–1,52 % для ITS1 и 1,97–2,04 % для ITS2 (табл. 2).

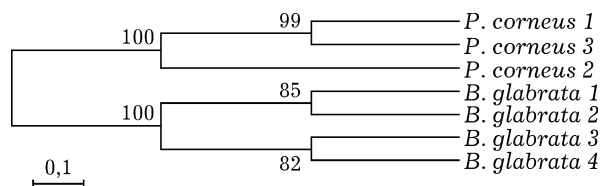


Рис. 4. Дендрограммы филогенетических отношений между моллюсками *Planorbarius corneus* из разных популяций, построенные на основе нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 методом максимального правдоподобия (ML) и модели Hasegawa – Kishino – Yano с гамма-коррекцией. В качестве внешней контрольной группы использованы линии моллюсков *Biomphalaria glabrata*

*B. glabrata* 1 – моллюски из популяции Aragua (Венецуэла), *B. glabrata* 2 – из Salvador, Bahia (Бразилия), *B. glabrata* 3 – из Rio Grande Town (Пуэрто Рико); *B. glabrata* 4 – из Jarabacoa (Доминиканская Республика)

Филогенетические деревья, построенные на основании данных о нуклеотидных последовательностях ITS1 и ITS2, свидетельствуют о незначительных генетических различиях между исследуемыми популяциями моллюсков. При этом популяция моллюсков из оз. Сюевярви немного обособлена (рис. 4). Внешние контрольные группы на дендрограммах четко обособлены на отдельных ветвях (см. рис. 4).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Не выявлено никаких значительных различий в нуклеотидных последовательностях моллюсков *P. corneus*, собранных в трех различных точках. Инсерция в четыре нуклеотида у улиток из оз. Сюевярви обособливает эту популяцию от двух других, исследованных нами. Однако выявленные изменения в нуклеотидных последовательностях ITS1 и ITS2 принято считать незначительными, укладывающимися в границы внутривидовой изменчивости [DeJong et al., 2001; Casey et al., 2003; Yao et al., 2010]. Полученные результаты согласуются с данными RAPD-анализа *P. corneus* [Прохорова и др., 2014]. Средний коэффициент подобия между образцами ядерной ДНК моллюсков из этих же точек сбора составил от 0,75 до 0,81. Выявленные различия сравнимы с различиями лабораторных линий моллюска *Biomphalaria glabrata*, отличающимися по степени восприимчивости к трематодной инвазии [Abdel-Hamid et al., 2006; Oliveira et al., 2010].

Белковый анализ и исследование аллельного разнообразия популяций роговых катушек из других популяций также не выявляют различий на уровне видов. В частности, работы по изменчивости фермента неспецифических эстераз, кодируемого соответствующим локусом (*Es-1*), показали отсутствие различий в аллельных пулах и соответствие аллельных частот полиморфных локусов в пределах каждой из выборок [Межжерин и др., 2005, 2006]. Предварительный анализ кариотипов также не дает оснований для выделения обособленных групп внутри вида *P. corneus* [Прохорова, 2009; Васильева, 2010].

Выявленные в данном исследовании нуклеотидные последовательности ITS1 и ITS2

являются первыми полными последовательностями внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК моллюсков *P. corneus*. В ближайшее время они будут представлены в открытые базы данных и могут быть использованы при построении филогенетических отношений разных групп моллюсков.

Работа выполнена в Лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. А. И. Герцена при поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых № МК-2935.2013.4, Гранта Министерства образования 6.1278.2014/К.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Васильева Е. А. Кариотипирование моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) из водоемов Ленинградской области // Пуцдино. Биология – наука XXI века. 14 Междунар. Пуцдинская шк.-конф. молодых ученых: сб. тез. 2010. Т. 1. С. 110–111.
- Жадин В. И. Моллюски пресных и солоноватых вод СССР. Л.: АН СССР, 1952. 376 с.
- Кантор Ю. И., Сысоев А. В. Каталог моллюсков России и сопредельных стран. М.: РАН, Ин-т проблем экол. и эвол. им. А. Н. Северцова, 2005. 627 с.
- Максимова Т. И. Морфологический и генетический анализ моллюсков семейства Bulinidae (Gastropoda Pulmonata) фауны России и сопредельных территорий: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: Изд-во Зоол. ин-та РАН, 1995. 28 с.
- Межжерин Д. А., Гарбар А. В., Гарбар Д. А. Систематическая структура комплекса *Planorbarius corneus* s. l. (Gastropoda, Pulmonata): анализ аллозимных маркеров и морфометрических признаков // Вестн. зоологии. 2005. Т. 39, № 6. С. 11–17.
- Межжерин Д. А., Гарбар Д. А., Гарбар А. В. Ресистематика моллюсков рода *Planorbarius* (Gastropoda, Pulmonata) фауны Украины: опыт решения проблемы на основе геногеографического подхода // Reports of the National Acad. of Sci. of Ukraine. 2006. № 9. С. 170–175.
- Прохорова Е. Е. Защитные реакции пульмонат (Gastropoda): автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: Изд-во Санкт-Петерб. гос. ун-та, 2009. 18 с.
- Прохорова Е. Е., Жемчужникова Е. А., Атаев Г. Л. Использование RAPD-анализа для изучения генетической популяционной изменчивости моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) // Изв. РГПУ им. А. И. Герцена. 2014. Вып. 168. С. 153–162.
- Стадниченко А. П. Прудовикообразные (пузырчиковые, витушковые, катушковые). Фауна Украины. Киев: Наук. думка, 1990. Т. 29, вып. 4. 292 с.
- Старобогатов Я. И. Фауна моллюсков и зоогеографическое районирование континентальных водоемов земного шара. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1970. 372 с.
- Старобогатов Я. И., Прозорова Л. А., Богатов В. В., Саянко Е. М. Моллюски // Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. СПб.: Наука, 2004. Т. 6. С. 9–491.
- Цалолихин С. Я. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. СПб.:

- Наука, 2004. Т. 6: Моллюски, полихеты, немертины. 528 с.
- Abdel-Hamid A. H., Rawi S. M., Arafa A. F. Identification of a genetic marker associated with the resistance to *Schistosoma mansoni* infection using RAPD analysis // Mem. Inst. Osw. Cruz. 2006. Vol. 101, N 8. P. 863–868.
- Bargues M. D., Vigo M., Horak P., Dvorak J., Patzner R. A. et al. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences // Infec. Gen. Evol. 2001. Vol. 1. P. 85–107.
- Casey S. P., Bakke T. A., Harris P. D., Cable J. Use of ITS rDNA for discrimination of European green- and brown-banded sporocysts within the genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloriidae) // Systematic Parasitol. 2003. Vol. 56. P. 163–168.
- DeJong R. J., Jess A.T., Morgan W., Pointier J.-P., Amarista M. et al. Evolutionary Relationships and Biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with Implications Regarding Its Role as Host of the Human Bloodfluke, *Schistosoma mansoni* // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18, N 12. P. 2225–2239.
- Gloer P. Die Subwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas. Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. Conch Books, 2002. 327 p.
- Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. Molecular cloning: a laboratory manual. 2-nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Vol. 1–3. 1659 p.
- Oliveira A. L. D., Da Silva D., Manzano B. C., Abdel-Hamid A. Z., Marcelino M. Y. et al. Genetic differences between strains of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) that are susceptible and unsusceptible to schistosomiasis // Gen. Mol. Res. 2010. Vol. 9, N 3. P. 1450–1459.
- Remigio E. A. Blair D. Relationships among problematic North American stagnicoline snails (Pulmonata: Lymnaeidae) reinvestigated using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences // Can. Journ. Zool. 1997. Vol. 75. P. 1540–1545.
- Stothard J. R., Hughes S., Rollinson D. Variation within the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae) // Acta Trop. 1996. Vol. 61. P. 19–29.
- Vidigal T. H. D. A., Spatz L., Kissinger J. C. Analysis of the first and second Internal Transcribed Spacer sequences of ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* complex (Mollusca: Planorbidae) // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2004. Vol. 99, N 2. P. 153–158.
- Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J., et al. 2010. Use of ITS2 region as the Universal DNA barcode for plants and animals // PLoS One. Vol. 5, N 10. P. e13102.

## **Analysis of ITS1 and ITS2 of Ribosomal DNA in Populations of *Planorbarius corneus* Snails (Gastropoda) from Leningradskaya Oblast and Kaliningradskaya Oblast (Russia)**

E. E. PROKHOROVA, E. A. ZHEMCHUZHNIKOVA, G. L. ATAIEV

*Herzen State Pedagogical University  
191186, Saint-Petersburg, the Moyka quay, 48*

*E-mails: elenne@mail.ru, soulmatebm@mail.ru, ataev@herzen.spb.ru*

Nucleotide sequences of internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of rDNA were obtained and analyzed in populations of *Planorbarius corneus* snails from Leningradskaya Oblast and Kaliningradskaya Oblast. Close similarity between ITS1 and ITS2 of the snails from different areas proved the fact that *Planorbarius corneus* was a polymorphic but a uniform species.

**Key words:** gastropoda, *Planorbarius corneus*, genotyping, rDNA, internal transcribed spacers.