

УДК 576.895.132

<https://doi.org/10.31016/978-5-6046256-9-9.2022.23.286-290>

**ИССЛЕДОВАНИЕ 5,8S-ITS2 УЧАСТКОВ РИБОСОМНОЙ
ДНК ТРЕХ ВИДОВ РОДА *METASTRONGYLUS*
(NEMATODA: METASTRONGYLIDAE)**

Кучбоев А. Э.¹,

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией молекулярной зоологии,
kuchboev@rambler.ru

Амиров О. О.¹,

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории молекулярной зоологии

Каримова Р. Р.¹,

младший научный сотрудник лаборатории молекулярной зоологии

Солиева Г. Д.²,

младший научный сотрудник

Собиров Х. Ф.¹,

младший научный сотрудник лаборатории молекулярной зоологии

Аннотация

Нематоды рода *Metastrongylus* (Nematoda: Metastrongylidae) адаптировались к паразитированию в бронхах и бронхиолах диких и домашних свиней. Метастронгилы широко распространены в популяциях диких свиней во всем мире и в условиях естественного заражения встречаются в смешанной форме. Цикл развития всех трех видов возбудителей протекает одинаково с участием промежуточных хозяев — различных видов дождевых червей. Идентифицировать виды этих нематод только по морфологическим признакам сложно. В работе использовали нематоды *Metastrongylus elongatus*, *M. pudendotectus* и *M. salmi*, выделенные из легких диких свиней Ташкентской области Узбекистана. При этом была выделена ДНК при помощи наборов «Insect DNA Purification kit» (Индия). Сравнительный анализ попарной нуклеотидной последовательности показал, что эти три вида различаются друг от друга, а обнаруженные взаимоотношения аналогичны тем, которые ранее описывались на основе морфологии. Построены филогенетические деревья методами мак-

¹ Институт Зоологии Академии наук Республики Узбекистан (100053, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Багишамол, д. 2326)

² Джизакский государственный педагогический институт имени Абдуллы Кадыри (130100, Узбекистан, г. Джизак, ул. Ш. Рашидова, д. 4)

симального правдоподобия и доказано то, что все изучаемые виды оказались с высокой bootstrap-поддержкой и нашли отдельное место в кладограмме. Анализ результатов исследований, с использованием рДНК и особенностей морфологических признаков, позволил определить взаимосвязи рассматриваемых таксонов.

Ключевые слова: нематоды, дикий кабан, *Metastrongylus*, ДНК

STUDY OF THE 5,8S-ITS2 RIBOSOMAL DNA REGIONS IN THREE SPECIES OF THE GENUS *METASTRONGYLUS* (NEMATODA: METASTRONGYLIDAE)

Kuchboev A. E. ¹,

Doctor of Biological Sciences, Professor,
Head of the Laboratory of Molecular Zoology,
kuchboev@rambler.ru

Amirov O. O. ¹,

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Zoology

Karimova R. R. ¹,

Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Zoology

Solieva G. D. ²,

Junior Researcher

Sobirov Kh. F. ¹,

Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Zoology

Abstract

Nematodes of the genus *Metastrongylus* (Nematoda: Metastrongylidae) have adapted to parasitizing the bronchi and bronchioles of the wild and domestic pig. Metastrongyles are widely spread in wild pig populations throughout the world and occur in a mixed form under natural infection conditions. The development cycle of all three types of the pathogens proceeds in the same way involving intermediate hosts, various types of earthworms. It is difficult to identify the species of these nematodes only by morphological characters. The study used nematodes *Metastrongylus elongatus*, *M. pudendotectus*, and *M. salmi* isolated from the lungs of wild pigs in the Tashkent Region of Uzbekistan. DNA was isolated using the Insect DNA Purification

¹ Institute of Zoology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan (232b, Bagishamol st., Tashkent, 100053, Uzbekistan)

² Jizzakh State Pedagogical Institute named after Abdullah Kadiri (4, Sh. Rashidova st., Jizzakh, 130100, Uzbekistan)

kit (India). Comparative analysis of the pairwise nucleotide sequence showed that these three species differed from each other, and the found relationships were similar to those previously described based on the morphology. Phylogenetic trees were built using maximum likelihood methods and it was proved that all the studied species turned out to have high bootstrap support and had found a separate place in the cladogram. The analysis of the study results using rDNA and morphological characters allowed us to determine the relationships of the considered taxa.

Keywords: nematodes, wild boar, *Metastrongylus*, DNA

Введение. Нематоды рода *Metastrongylus* (Nematoda: Metastrongylidae) адаптировались к паразитированию в бронхах и бронхиолах диких и домашних свиней. Метастронгилы широко распространены в популяциях диких свиней во всем мире и в условиях естественного заражения встречаются в смешанной форме [1, 2]. Цикл развития всех трех видов возбудителей протекает одинаково с участием промежуточных хозяев – различных видов дождевых червей.

К настоящему времени описано семь видов рода *Metastrongylus*, из них *M. tschiauricus* Kojawa, 1956 от диких свиней Грузии близок к *M. pudendotectus* и, возможно, идентичен с ним. D. Gassó и др. [3] разработали морфологический идентификационный ключ для пяти наиболее распространенных видов *Metastrongylus*, чтобы избежать дальнейших ошибочных классификаций видов метастронгил. Однако идентифицировать виды только по морфологическим признакам сложно.

В связи с этим цель наших исследований – сравнительное изучение частичных фрагментов 5,8S-ITS2 рибосомной ДНК трех видов рода *Metastrongylus* от кабанов Узбекистана.

Материалы и методы. В работе использовали нематоды *Metastrongylus elongatus*, *M. pudendotectus* и *M. salmi*, выделенные из легких диких свиней Ташкентской области Узбекистана. При этом была выделена ДНК при помощи наборов «Insect DNA Purification kit» (Индия). При получении последовательности участков 5,8S-ITS2 рДНК с помощью ПЦП использованы праймеры 5 pmol, TW81 forward (5'- GTTTCCGTAGGTGAA CCTGC-3') и AB28 reverse (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCG GGT-3'), 0.2 U Phusion DNA Polymerase, 4 nmol dNTP mix и 2 µl матрицы в 20 µl реакции в следующем температурном режиме: 98 °C в течение 30 секунд, 40 x (98 °C – в течение 10 секунд, 55 °C – 30 секунд, 72 °C – в течение 30 секунд), 72 °C – в течение 10 минут. ПЦП продукты были очищены с «DNA Clean & Concentrator™ – 5», секвенирование проведено с «Euro fins Sequencing». Филогенетические деревья были построены с использо-

ванием метода максимального правдоподобия. Эволюционный анализ проводился в MEGA7 (2016) [4].

Результаты исследований. Частичные последовательности 5,8S+ITS2 рДНК были получены от 3 видов *Metastrongylus elongatus*, *M. pudendotectus*, *M. salmi*. Для попарного сравнения также использовали последовательности *Metastrongylus apri* [KP890022] из Генбанка (NCBI). Из исследованных образцов сопоставлены фрагменты 5,8S+ITS2 длиной по 418 пар оснований (табл.).

Таблица

Попарные нуклеотидные различия 5,8S+ITS2 участков рДНК видов рода *Metastrongylus*

№	<i>M. elongatus</i>	<i>M. pudendotectus</i>	<i>M. salmi</i>	<i>M. apri</i>
1	-	3,6	5,8	0
2	15	-	8,5	3,4
3	24	35	-	5,8
4	0	14	24	-

При сравнении нуклеотидных последовательностей сиквенсов 5,8S+ITS2 рДНК между *M. elongatus*, *M. salmi* и *M. pudendotectus* отмечалось различие. Так, между *M. elongatus* и *M. salmi* установлены различия в общей сложности по 15 нуклеотидам, что составляет 3,6%. При сравнении степени различия между *M. elongatus* и *M. pudendotectus*, она оказалась чуть выше, и различия составили – 5,5% (табл.). Надо отметить, что *Metastrongylus apri* Gmelin, 1790 является синонимом вида *M. elongatus* Dujardin, 1846 [1].

Сравнение полученного дерева методом максимального правдоподобия показало, что выбор внешней группы сравнения упомянутого вида не оказывает влияния на форму кладограммы (рис.).

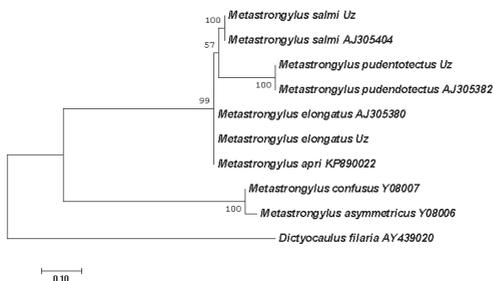


Рис. Филогенетическое дерево, построенное по методам максимального правдоподобия с использованием модели Tamura-Nei (1000 bootstrap-повторов)

Все эти четыре вида объединяются, в нашей кладограмме, с достаточно высоким уровнем bootstrap-поддержки (99%), а каждый из этих видов *M. salmi*, *M. pudendotectus* и *M. elongatus*, по отдельности, обычно имеют максимальное значение bootstrap-поддержки (100%). Виды, полученные из Генбанка *Metastrongylus asymmetricus* и *M. confusus*, между собой, также показывают высокой уровень bootstrap-поддержки (100%).

Заключение. Таким образом, в филогенетическом дереве сравниваемые последовательности образовали четыре клада с высоким уровнем поддержки всех изучаемых видов метастронгил. Однако последовательность 5,8S+ITS2 рДНК *M. confusus* и *M. asymmetricus* из Генбанка были идентичными. В отношении этих спорных таксонов необходимо провести дополнительное исследование различных участков рибосомной и митохондриальной ДНК.

Список источников

1. Рузиев Б. Х., Кучбоев А. Э., Каримова Р. Р. Экология нематод рода *Metastrongylus* Molin, 1861 – паразитов дикого кабана Узбекистана // Вестник Каршинского Государственного университета. 2020; 4(46): 58-61.
2. da Silva D., Müller G. Parasites of the respiratory tract of *Sus scrofa scrofa* (wild boar) from commercial breeder in southern Brazil and its relationship with *Ascaris suum* // Parasitol Research. 2013; 112: 1353-1356.
3. Gassó D., Rossi L., Mentaberre G., Casas E., Velarde R., Nosal P., Serrano E., Segales J., Fernandez-Llario P., Feliu C. An identification key for the five most common species of *Metastrongylus* // Parasitol Research. 2014; 113(9): 3495-3500.
4. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Molecular Biology and Evolution. 2016; 33: 1870-1874.

References

1. Ruziev B. Kh., Kuchboev A. E., Karimova R. R. Ecology of nematodes of the genus *Metastrongylus* Molin, 1861, parasites of the wild boar from Uzbekistan. *Bulletin Karshi State University*. 2020; 4 (46): 58-61. (In Russ.)
2. da Silva D., Müller G. Parasites of the respiratory tract of *Sus scrofa scrofa* (wild boar) from commercial breeder in southern Brazil and its relationship with *Ascaris suum*. *Parasitol Research*. 2013; 112: 1353-1356.
3. Gassó D., Rossi L., Mentaberre G., Casas E., Velarde R., Nosal P., Serrano E., Segales J., Fernandez-Llario P., Feliu C. An identification key for the five most common species of *Metastrongylus*. *Parasitol Research*. 2014; 113(9): 3495-3500.
4. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016; 33: 1870-1874.