

На правах рукописи

ЖУКОВА
Алина Александровна

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ТРЕМАТОД РОДА *LEUCOCHLORIDIUM*

03.02.11 – паразитология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена

Научный руководитель:

Цымбаленко Надежда Васильевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, профессор.

Официальные оппоненты:

Слюсарев Георгий Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет, профессор.

Семёнова Серафима Константиновна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, старший научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук.

Защита состоится «__» _____ 2017 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.223.01 на базе Зоологического института РАН по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1.

Факс: (812)328-29-41

E-mail: Olga.Ovtshinnikova@zin.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Зоологического института РАН www.zin.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 201__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Овчинникова Ольга Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Класс Трематоды объединяет несколько тысяч видов, составляющих более 2500 родов (Gibson et al., 2002). Дигенетические сосальщики характеризуются наличием сложного жизненного цикла, связанного со сменой хозяев и чередованием гермафродитного и партеногенетических поколений. Наличие среди трематод опасных паразитов человека и экономически важных животных привлекает большой интерес к изучению различных аспектов биологии, систематики и физиологии этих гельминтов.

В связи с этим актуальным становится изучение признаков видовой идентификации трематод. Исторически для этого класса сложились две, почти независимые системы. При этом обе основаны на морфологических характеристиках представителей гермафродитной генерации. Первая из них – таксономическая – основана на морфологии марит. Начиная с Цедера (Zeder, 1800), Рудольфи (Rudolphi, 1819;) и др. классификация постоянно усложнялась и многократно менялась, особенно заметно в последние десятилетия – на основании молекулярно-генетических данных. Вторая система построена на основе строения, а в ряде случаев поведения их личинок – церкарий и призвана обобщить знания об их многообразии (см.: Lühe, 1909). Однако далеко не все жизненные циклы трематод расшифрованы, поэтому соответствие церкарий видам марит известно в очень небольшом числе случаев. В результате для многих видов до настоящего времени используется двойное название – по церкариям и по маритам.

Одним из решений данной проблемы стало применение молекулярно-генетических методов, с помощью которых можно провести идентификацию вида трематод по различным фазам жизненного цикла. Несмотря на очевидное достоинство молекулярно-генетических подходов, исследований с их применением для дигеней относительно немного. Только в 2009 г. были расшифрованы полные последовательности ядерных геномов двух представителей данного класса – возбудителей шистосоматоза человека *Schistosoma mansoni* и *S. japonicum* (Berriman et al., 2009; Liu et al., 2011).

В настоящее время широкое использование ядерных и митохондриальных маркеров в популяционно-генетических и филогенетических исследованиях трематод позволяет разрабатывать на их основе системы для видовой идентификации различных представителей данного класса. Среди молекулярно-диагностических систем наиболее эффективными и чувствительными являются системы, основанные на ПЦР с локус-специфичными праймерами (Zarlenga & Higgins, 2001).

Важно отметить, что в ряде случаев в распоряжении исследователей имеется материал, представленный партенитами трематод – редиями и спороцистами. Поэтому для некоторых видов название дано на основании морфологических признаков именно партенит. Ярким примером являются спороцисты рода *Leucochloridium*. Последние получили широкую известность благодаря уникальной мимикрии, выражающейся в способности формировать отростки, которые формой, окраской и движением имитируют личинок насекомых. Именно строение этих отростков и легло в основу видовой идентификации представителей рода *Leucochloridium* по партенитам. Основными объектами в данной работе стали трематоды *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*. Однако даже для этих видов до нашего исследования были предприняты лишь предварительные попытки проверить молекулярно-генетическими методами валидность морфологических признаков. Соответственно, доказательство видовых отличий в

формировании морфологического разнообразия спороцист рода *Leucochloridium*, чрезвычайно актуально для анализа столь уникального биологического явления как жизненный цикл исследуемых в работе трематод.

Степень разработанности. В настоящее время в литературе имеются немногочисленные работы, которые содержат результаты генотипирования рДНК трематод рода *Leucochloridium* (Tkach, 2001; Casey et al., 2003; Olson et al., 2003; Rząd et al., 2014). Представленные в публикациях нуклеотидные последовательности кластера рибосомных генов *Leucochloridium paradoxum* и *L. perturbatum*, зарегистрированы в GenBank, но не являются полноразмерными. Сведения о последовательностях рДНК *L. vogtianum* – отсутствуют.

Цель работы – изучение внутриродового генетического полиморфизма спороцист трематод рода *Leucochloridium*.

Основные задачи исследования:

1. Изучить морфологические особенности партенит трематод рода *Leucochloridium*.
2. Осуществить видовую идентификацию трематод рода *Leucochloridium* с помощью молекулярно-генетических методов.
3. Получить нуклеотидную последовательность протяженного участка кластера генов рРНК трематод рода *Leucochloridium*.
4. Провести анализ филогенетических связей *Leucochloridium paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* с другими видами трематод.

Научная новизна. Все представленные в работе результаты являются новыми. Впервые получен участок рДНК трематод рода *Leucochloridium*, кодирующий 18S–ITS1–5.8S–ITS2–28S, продолжительностью 4444 п. н. для *Leucochloridium perturbatum*, 4430 п. н. для *L. paradoxum*, а также 2163 п. н. для *L. vogtianum*. Полученные нуклеотидные последовательности аннотированы в GenBank и доступны для сравнения с новыми результатами секвенирования ДНК трематод рода *Leucochloridium*. На основании сравнительного анализа определенных в работе нуклеотидных последовательностей рДНК трех видов трематод рода *Leucochloridium* с аналогичными участками рДНК трематод, принадлежащим другим таксономическим группам этого класса, выявлены отношения видов трематод *Leucochloridium* внутри рода, а также установлено систематическое положение семейства Leucochloridiidae.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование структурной организации генома трематод имеет практическое приложение в медицине и сельском хозяйстве при разработке экспресс-методов генотипирования возбудителей заболеваний человека и животных, а также для создания нового поколения лекарств и усовершенствования вакцин. Созданный банк ядерной ДНК трематод рода *Leucochloridium*, коллекция оригинальных специфических праймеров для кластера генов рРНК, а также уникальные электрофоретические профили амплификатов ДНК трех видов трематод рода *Leucochloridium*, полученные с помощью RAPD-анализа могут служить для проведения экспресс тестирования особей, принадлежащих к исследуемым в работе видам и представителей других групп дигеней.

Методология и методы исследования. Методология исследования основывалась на получении и молекулярно-генетическом анализе нуклеотидных последовательностей кластера рибосомных генов трематод *Leucochloridium* sp. для выявления внутри- и межвидового полиморфизма, а также филогенетического положения этих организмов. Работа выполнена с привлечением морфологических, молекулярно-биологических,

молекулярно-генетических методов: извлечение и описание спороцист, выделение и анализ хромосомной ДНК, RAPD-анализ, ПЦР-амплификация со специфическими праймерами участков рДНК, их очистка и секвенирование. С помощью специальных компьютерных программ проводили анализ полученных нуклеотидных последовательностей: выравнивание и поиск полиморфизмов, построение топологических схем вторичных структур транскриптов рДНК, филогенетические реконструкции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Основными морфологическими признаками для видовой идентификации трематод рода *Leucochloridium* являются особенности формы и окраски покровов отростков спороцист партенит. При этом для вида *L. paradoxum* характерно наличие зеленого пигмента в тегументе спороциты, для *L. perturbatum* – коричневого пигмента с участками светлых и темных чередующихся полос, а отростки спороцист *L. vogtianum* содержат пигмент желтого цвета и несут папилломообразные выросты.

2. Анализ нуклеотидных последовательностей рДНК трематод *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* подтверждает адекватность традиционно используемых для видовой идентификации морфологических признаков.

3. Исследуемые виды имеют достоверные межвидовые различия в нуклеотидных последовательностях ITS1 и ITS2, а также особенностях вторичной структуры транскрипта ITS2. Внутривидовой полиморфизм в нуклеотидных последовательностях генов рибосомного кластера видов рода *Leucochloridium* отсутствует.

4. Молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей рДНК, а также анализ полиморфизмов, выявляемых с помощью случайных праймеров, позволяет достоверно идентифицировать и различать между собой представителей рода *Leucochloridium*. Данные алгоритмы могут быть использованы для верификации случаев множественного заражения моллюсков.

5. По результатам филогенетического анализа на основе участка ITS1-5.8S-ITS2 кластера генов рДНК подтверждена принадлежность рода *Leucochloridium* к семейству Leucochloridiidae, входящему в состав надсемейства Brachylaimoidea.

Степень достоверности и апробация результатов. Работа выполнена на 42 образцах ДНК, полученных из индивидуальных спороцист: 28 – *L. paradoxum*, 13 – *L. perturbatum* и 1 – *L. vogtianum*. Достоверность обеспечена многочисленными повторами секвенирования маркерных участков, воспроизводимостью полученных результатов, а также использованием различных молекулярных и статистических методов для проверки полученных данных. Результаты кластерного анализа оценены с помощью бутстрэп-метода (1000 повторностей при узловом значении не менее 70). Обработка материала проведена с использованием современного оборудования для молекулярно-генетических исследований, а также соответствующего программного обеспечения.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи (3 из которых входят в журналы из перечня ВАК), 14 тезисов (устных докладов, постерных сессий и при заочном участии в материалах конференций). Основные положения диссертационного исследования представлены и обсуждены на 5 Съезде Паразитологического общества России, (Новосибирск, 2013); Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014); Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2013); Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология наука XXI

века» (2013); Международном симпозиуме «Современные достижения в популяционной, эволюционной и экологической генетике» (Владивосток, 2015).

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 173 страницах, из которых основная часть представлена на 131 странице, приложение – на 42 страницах. Список литературы насчитывает 173 источника, из них 142 на иностранном языке. Диссертация иллюстрирована 38 рисунками и содержит 11 таблиц.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность Н. В. Цымбаленко, Г. Л. Атаеву и Е. Е. Прохоровой за обучение, всестороннюю поддержку и помощь в подготовке диссертации. Особые слова благодарности автор приносит за практические консультации, ценные советы и помощь в освоении молекулярно-генетических методов Г. А. Захарову, Г. Г. Хрисанфовой, Н. И. Абрамсон. Автор крайне признателен А. С. Токмаковой, Н. И. Юрловой, С. В. Шеховцову, К. В. Рожковану за поддержку и неоценимую помощь в подготовке работы.

Работа выполнена при поддержке: гранта Министерства образования «Развитие научного потенциала высшей школы», 2009–2011 гг.; гранта РФФИ «Экспрессия генов факторов защитных реакций легочных моллюсков», 2010–2012 гг.; гранта Министерства образования и науки РФ «Разработка методики экспресс-анализа зараженности легочных моллюсков», 2012 г.; гранта Министерства образования и науки РФ «Применение метода цитофлуориметрической экспресс-диагностики пресноводных моллюсков при выявлении инвазии трематодами, патогенными для человека и животных», 2013 г.; гранта Президента РФ для молодых ученых № МК-2935.2013.4 «Генетический полиморфизм моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata)», 2013–2014 гг.; проектной части Государственного задания Министерства образования и науки РФ «Изучение функциональной активности брюхоногих моллюсков» (Проект № 1278), 2014–2016 гг.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе приводятся сведения о жизненном цикле, распространении и особенностях организации трематод рода *Leucochloridium*. Рассмотрены различные подходы к изучению генома трематод. Представлены филогенетические схемы дигеней, основанные на классических морфологических критериях. При этом особое внимание уделено реконструкциям, построенным при использовании молекулярных маркеров.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Спороцисты трематод *Leucochloridium paradoxum*, *Leucochloridium perturbatum* и *Leucochloridium vogtianum* были отпрепарированы из моллюсков *Succinea putris*, собранных на территории Ленинградской области в районе г. Любань (59° 21' 00" N, 31° 15' 00" E) и пос. Вырица (59° 23' 48" N, 30° 19' 45" E) в период с 2008 по 2014. **Вскрытие моллюсков** *Succinea putris* проводили под стереомикроскопом Leica M165C. Предварительное заключение о видовой принадлежности, обнаруженных при вскрытии паразитов, делали на основе окраски и формы отростков спороцисты. Перед вскрытием измеряли размер раковины моллюсков, а также размер и массу отпрепарированных спороцист. Для последующего проведения молекулярно-генетического анализа спороцисты помещали в эппендорфы и хранили при –70°С. *Для*

изучения на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) отобранный материал фиксировали и обезвоживали в восходящем градиенте концентраций этилового спирта, начиная с 20% раствора. Фиксированный материал помещали в специальные камеры. Все последующие операции по высушиванию объектов проводили в Leica EM CPD300. После напыления препараты изучали на микроскопе Zeiss EVO 40. **Выделение хромосомной ДНК** из спорист трематод рода *Leucochloridium* проводили методом экстракции фенолом и хлороформом с последующей очисткой. **Характеристика препаратов хромосомной ДНК.** Концентрацию ДНК в препаратах измеряли спектрофотометрически при длинах волн УФ-спектра 260 и 280 нм согласно стандартной методике (Sambrook et al., 1991). О степени очистки ДНК от белков судили по соотношению значений оптических плотностей D260/D280. **Электрофоретический анализ препаратов хромосомной ДНК.** Электрофорез ДНК проводили в 0.8% агарозном геле. Визуализацию зон ДНК проводили при УФ-освещении на горизонтальном поле трансиллюминатора. Документировали гели при помощи специальной видеосистемы. **Полимеразная цепная реакция со специфическими и случайными праймерами (RAPD-анализ).** Амплификацию ДНК осуществляли согласно методу, описанному Симпсоном (Simpson et al., 1993). Последовательности нуклеотидов в случайных праймерах были взяты из литературы (Spada et al., 2002). Дизайн специфических праймеров осуществляли самостоятельно. **Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов.** Анализ ПЦР-продуктов, полученных с помощью случайных и специфических праймеров, проводили в 1,4% агарозном геле и 8% полиакриламидном геле. **Очистка ПЦР-амплификатов рДНК.** Очистку ПЦР-продуктов проводили при помощи набора QIAquick PCR Purification Kit по прилагающейся к набору инструкции фирмы изготовителя. Итоговую концентрация ДНК в растворе определяли спектрофотометрически. **Секвенирование исследуемых фрагментов рДНК.** Секвенирование ПЦР-амплификатов осуществляли в фирме «Синтол» (Москва) или проводили самостоятельно при помощи набора фирменных реагентов BigDye® Terminator Kit v3.1 по прилагающемуся протоколу фирмы производителя. **Методы работы с нуклеотидными последовательностями.** Полученные данные обработаны с помощью специальных компьютерных программ. Источником информации об известных нуклеотидных последовательностях трематод служила открытая база данных «GenBank» (Benson et al., 2008) на сервере NCBI (National Center for Biotechnology Information – Национальный центр биотехнологической информации США). Для поиска нуклеотидных последовательностей и анализа их гомологии использовали программу «BLAST» (Mc Ginnis, Madden, 2004). **Дизайн праймеров и подбор условий амплификации** осуществляли в программах «Gene Runner 3.0» и «Primer 3». **Сборку и выравнивание электрофореграмм** осуществляли при помощи программного обеспечения BioEdit (Hall, 1999). **Построение вторичных структур ДНК** проводили с помощью онлайн сервиса на сервере mfold. **Выбор оптимальной математической модели** для расчета генетических дистанций осуществляли с помощью программы Modeltest v. 3.06 (Posada, Crandall, 1998). **Расчет генетических дистанций осуществляли с помощью** пакета программ Mega v. 3.0 (Kumar et al., 2004). **Филогенетические реконструкции** выполняли методами ближайшего соседа NJ (Neighbor-joining), максимальной экономии МР (Maximum parsimony) и максимального правдоподобия ML (Maximum likelihood). Для оценки достоверности каждого ветвления в филогенетических реконструкциях использовали **бутстрэп-анализ** (bootstrap analysis) (Felsenstein, 1985) при количестве репликаций 1000.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3. 1. Общее описание спороцист *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835, *L. perturbatum* Pojmanska, 1969 и *L. vogtianum* Baudon, 1881

На основании морфологических признаков (форма и окраска отростков) все спороцисты были отнесены к трем видам. Из 312 зараженных сукциней 267 (85.6%) особей были заражены *L. paradoxum*; 35 (11.2%) особей *L. perturbatum*; 1 (0.3%) особь *L. vogtianum*. При этом последний вид был обнаружен только один раз – в составе тройной инвазии (см. раздел 3. 1. 3). Кроме этого было описано 9 (2.9%) двойных инвазий, представленных трематодами *L. paradoxum* и *L. perturbatum*. Всего на молекулярно-генетические исследования было отобрано 42 спороцисты.

Визуальные исследования показали, что спороцисты всех изученных видов *Leucochloridium* организованы сходно и соответствуют описаниям в литературе. Тело спороцисты состоит из центральной части столона, которая локализуется в гепатопанкреасе моллюска-хозяина; трубчатых участков, отходящих от центральной части к мешковидным отростками спороцисты, приобретающими в процессе созревания видоспецифичную форму и окраску. В зрелых отростках насчитывается от 50 до 300 метацеркарий, формирующихся в центральной части столона и проникающих сюда по трубчатым участкам (см.: Pojmanska, Mahaj, 1991; Атаев и др., 2013; Атаев, Токмакова, 2015).

3. 1. 1. Трематоды *Leucochloridium paradoxum*

Спороцисты *L. paradoxum*, окрашенные зелёным, составили подавляющее большинство случаев трематодных заражений сукциней. Спорцисты этого вида формируют 2–3 зрелых отростка, размеры которых составляли $10.4 \pm 2.6 \times 2.3 \pm 0.5$ мм (минимум – 4.0×1.2 мм, максимум – 18.0×2.6 мм). При этом средний вес отростков составил 0.03 ± 0.01 г (от 0.005 г до 0.07 г). На основании распределения пигментов в покровах спороцист *L. paradoxum* было выделено семь вариантов их окраски, однако все они могут быть сведены к одному обобщенному типу.

Важно отметить способность отростков спороцист *L. paradoxum* к пульсации, усиливающейся на свету. Благодаря интенсивным сокращениям они могут проникать в щупальца моллюска. При этом они становятся хорошо заметны. В случае раздражения отростков они быстро уходят вглубь тела улитки за счет сокращения мышц трубчатых участков столона спороцисты.

3. 1. 2. Трематоды *Leucochloridium perturbatum*

Моллюски, зараженные трематодами *L. perturbatum*, на обеих обследованных территориях Ленинградской области встречали в сборах реже, чем *L. paradoxum*. Спорцисты *L. perturbatum* имели по 2 – 3 зрелых отростка. Размеры последних составили $8.8 \pm 2.2 \times 2.2 \pm 0.5$ мм (минимум – 5.6×1.5 мм, максимум – 13.5×3.0 мм). При этом средний вес отростков составил 0.05 ± 0.01 г (от 0.02 г, до 0.16 г). Насыщенность коричневого цвета зрелых отростков прямо пропорциональна степени их зрелости. При рассмотрении окраски спороцист *L. perturbatum* можно выделить некоторые закономерности. Визуально отросток можно разделить на две части: верхнюю, более пигментированную, и нижнюю, которая окрашена слабее.

По характеру двигательной активности отростки спороцист *L. perturbatum* очень напоминают ранее описанные отростки *L. paradoxum*.

3. 1. 3. Трематоды *Leucochloridium vogtianum*

Спороцисты *Leucochloridium vogtianum* обладают оригинальным строением отростков. Их покровы равномерно окрашены в оттенки желтого и только на вершине расположены коричневые пятна. При этом большая часть отростка покрыта хорошо заметными папиллообразными выростами. Так как малоподвижные отростки спороцист этого вида не проникают в щупальца улиток, как это происходит с другими представителями рода *Leucochloridium*, обнаружить партенит *L. vogtianum* обычно удается только при вскрытии моллюска. В наших сборах был зафиксирован единственный случай заражения моллюска *L. vogtianum*. Данная спороциста была обнаружена в составе множественной инвазии моллюска тремя видами трематод *L. perturbatum*, *L. vogtianum* и *L. paradoxum*.

Множественное заражение моллюсков трематодами – широко распространенное явление в природе (Combes, 1995), но слабо изученное экспериментально. Тем не менее, известно, что двойные инвазии могут быть представлены зрелыми инфрапопуляциями партенит обоих видов (с эмиссией церкарий). При этом равновесие в подобных паразитарных системах может сохраняться относительно продолжительное время.

Гораздо реже в природе встречается тройное заражение моллюсков. И совсем редко тройная инвазия представлена зрелыми инфрапопуляциями партенит. Обычно происходит либо подавление одного из видов трематод, либо погибает моллюск-хозяин (Атаев, Добровольский, 1992; Combes, 1995). Поэтому очень неожиданной стала находка моллюска *Succinea putris*, зараженного зрелыми спороцистами трематод трех видов *Leucochloridium*.

Возможность этого явления заключается в особом типе внутримоллюскового развития спороцист *Leucochloridium*. В отличие от трематод, формирующих в моллюсках инфрапопуляции из сотен редий или спороцист, здесь одна спороциста может обеспечить реализацию жизненного цикла. Соответственно регулирование ее роста и интенсивности размножения происходит не на популяционном, а организменном уровне.

Заражение моллюсков трематодами *Leucochloridium* происходит пассивно – в процессе поедания яиц этих червей. При этом в сукцинее может развиваться множественная инвазия спороцистами одного, двух или нескольких видов *Leucochloridium*. Одна спороциста *L. paradoxum* может иметь не более 4–5 зрелых отростков (Wesenberg-Lund, 1931; Rojmanska, 1962; Гинецинская, 1964, 1968; Атаев, Токмакова, 2015). Соответственно, 19 зеленых отростков, обнаруженных нами в одной улитке, могут принадлежать 4 или 5 спороцистам этого вида.

В тройном заражении улитки спороцисты *L. paradoxum* и *L. perturbatum* и *L. vogtianum* суммарно имели семь зрелых отростков (включая один вышедший из моллюска). Это не намного больше, чем может иметь одна спороциста *L. paradoxum*. Поэтому при тройной инвазии нагрузка на организм моллюска-хозяина оставалась примерно на уровне одиночной инвазии.

Кроме того, зрелые отростки для реализации жизненного цикла не обязательно должны быть склеваны птицами, как это утверждается в большинстве работ. Они могут самостоятельно покидать хозяина через разрывы в его покровах (Woodhead, 1935; Rietschell, 1972; Атаев, Токмакова, 2015). При этом отростки продолжают пульсировать до часа во внешней среде, имитируя личинок насекомых (нам приходилось наблюдать склеывание таких отростков птицами). Следовательно, имеется механизм, препятствующий перезаражению хозяина, заключающийся в удалении из моллюска избыточного количества зрелых отростков.

3. 2. Создание банка ядерной ДНК трематод р. *Leucochloridium*

Из отростков спороцист трематод рода *Leucochloridium* выделяли хромосомную ДНК методом экстракции фенолом-хлороформом из ядер, очищенных при

центрифугировании через сахарозную «подушку», что исключает вероятность присутствия в исследуемых препаратах митохондриальной ДНК. Из полученных образцов создан каталогизированный банк ядерной ДНК исследуемых трематод.

3. 2. 1. Характеристика исследуемых образцов ДНК

Всего было выделено 42 образца ядерной ДНК трематод рода *Leucochloridium*: 13 – из особей с коричневой окраской отростка, 28 – из спороцист с зеленой окраской и из 1 спороцисты с пузырчатými покровами. По данным электрофоретического анализа все препараты ДНК были высокополимерные и не деградированы.

3. 3. Анализ ДНК трематод р. *Leucochloridium* с помощью случайных праймеров (RAPD-анализ)

Для генотипирования малоизученных видов, к которым относятся трематоды рода *Leucochloridium*, широко применяют неспецифические методы, не требующие исходной информации о последовательностях ДНК. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – наиболее простой из этих методов, хотя его недостатком для картирования является чувствительность к экспериментальным условиям и требование стандартизации реактивов и экспериментальных протокольных компонентов (Grosberg et al., 1996).

Всего в работе на исследуемых ДНК были опробованы 10 праймеров с разными вариантами чередования нуклеотидов в цепочке (количество нуклеотидов - 10) (Abdel-Namid et al., 1999; Spada et al., 2002). Однако, воспроизводимые результаты, демонстрирующие четкое различие между электрофоретическими профилями RAPD-амплификатов ДНК зеленых, коричневых спороцист и спороцисты с пузырчатými покровами, были получены только с праймером G8 (рис. 1).

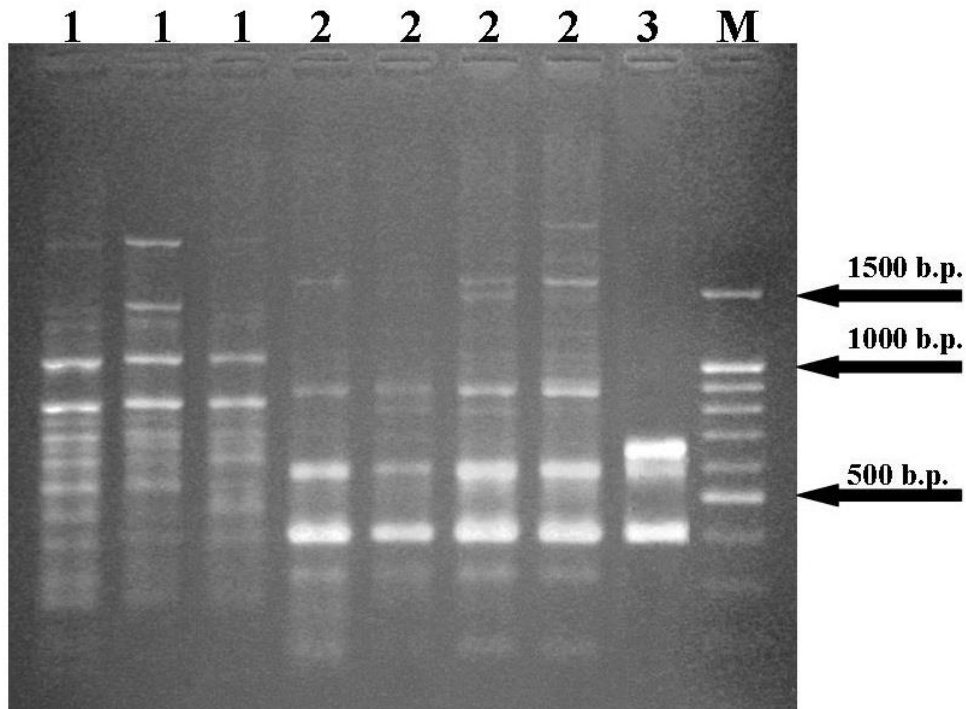


Рисунок 1. Сравнение электрофоретических профилей ПЦР-продуктов ДНК трематод рода *Leucochloridium*, полученных с помощью праймера G8. Примечания: 1.4% агароза. 1 – профиль ПЦР-продуктов, полученных на ДНК коричневых спороцист; 2 – профиль ПЦР-продуктов, полученных на ДНК зеленых спороцист; 3 – профиль ПЦР-продуктов, полученных на ДНК спороцисты с пузырчатými покровами; М – маркер молекулярного веса с шагом 100 п.н.

Для всех исследуемых образцов ДНК были определены приблизительные размеры полученных с помощью праймера G8 ПЦР-продуктов (относительно размеров фрагментов ДНК-маркера), а также был рассчитан коэффициент подобия по Дайсу. Результаты генотипирования ДНК трематод рода *Leucochloridium*, полученные с помощью RAPD-анализа, т.е. экспресс методом выявления генетического полиморфизма, являются основанием для исследования конкретных участков ДНК с целью подтвердить не только идентичность видовой принадлежности особей представителей рода *Leucochloridium* из различных популяций, но и выявить конкретные индивидуальные молекулярно-генетические полиморфизмы каждого из изучаемых видов.

3. 4. Анализ ДНК трематод р. *Leucochloridium* с помощью специфических праймеров

Использование специфических праймеров позволяет выявить и проанализировать индивидуальные полиморфные признаки организмов на уровне нуклеотидных последовательностей маркерных участков ДНК. Такие глубокие молекулярно-генетические исследования дают основание для выводов о филогенетическом положении тех или иных видов трематод. Одним из наиболее часто используемых молекулярных маркеров эукариот являются нуклеотидные последовательности рибосомного кластера ДНК (рДНК).

3. 4. 1. Дизайн специфических праймеров

Дизайн специфических праймеров на участок рДНК осуществляли с помощью ресурсов базы данных GenBank, а в последующем – и собственных данных, получаемых в ходе секвенирования исследуемого участка ДНК трематод. В результате были подобраны специфические праймеры на протяженный участок, кодирующий рРНК: 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S (рис. 2).

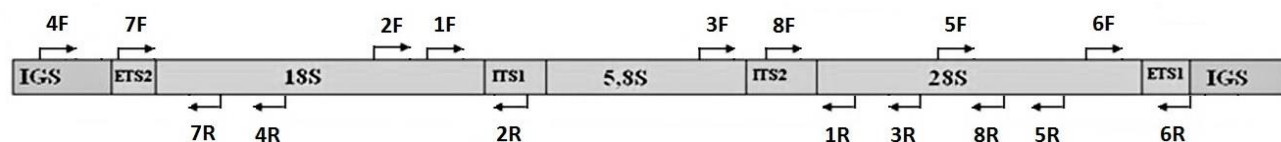


Рисунок 2. Схема расположения используемых в работе пар праймеров на участке кластера генов рРНК.

Примечания: праймеры пары №1 подобраны по последовательности фрагмента рДНК *Leucochloridium* sp. (AY258145.1) (Casey et al., 2003); дизайн праймеров № 2–5, 7 и 8 осуществляли по самостоятельно секвенированным в ходе работы участкам рДНК; праймеры № 4 и № 6 подбирали по последовательностям *Caenorhabditis elegans* (X03680) и *Schistosoma japonicum* (EU835706) соответственно.

На всех ДНК, выделенных из отростков спорозист *Leucochloridium* sp., в реакциях амплификации с использованием специфических праймеров, были получены ПЦР-продукты ДНК (рис. 3–4).

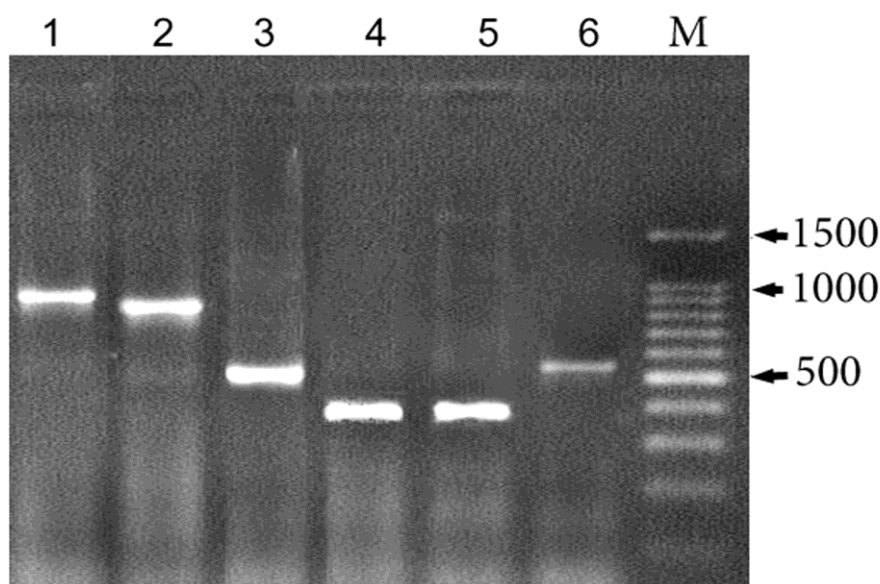


Рисунок 3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных на рДНК из отростков спороцист *L. paradoxum* и *L. perturbatum*.

Примечания: 1.4% агароза. На дорожках 1 – 6 ПЦР-продукты, полученные в реакциях с парами праймеров (F–R) соответствующих номерам дорожек. М – маркер молекулярного веса с шагом 100 п.н

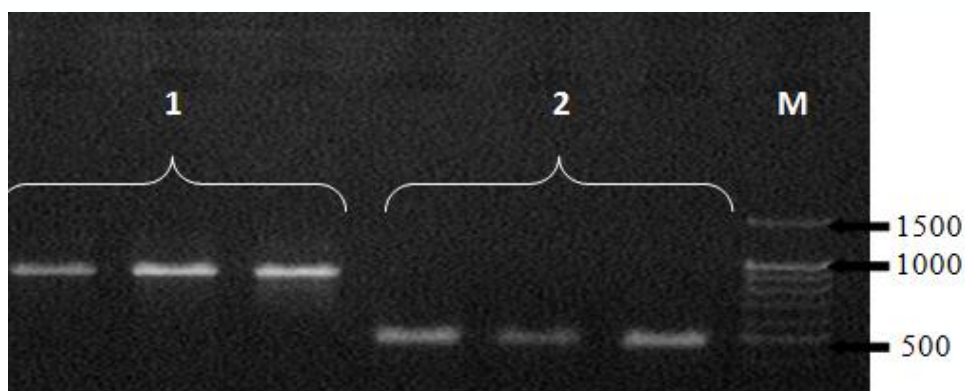


Рисунок 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных на рДНК из разных участков отростков спороцисты *Leucochloridium vogtianum*.

Примечания: 1.4% агароза. 1 – праймеры F1–R1; 2 – праймеры F8–R8. М – маркер молекулярного веса с шагом 100 п.н.

Созданная в работе коллекция специфических праймеров для рДНК трематод *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* может быть использована в дальнейшем для получения полной последовательности рДНК этих видов, а также представителей других видов рода *Leucochloridium* и трематод других групп. Ее использование позволило не только секвенировать большую часть рибосомного кластера трех видов трематод рода *Leucochloridium*, но и проанализировать большое количество образцов ДНК, в том числе полученных из спороцист, обнаруженных в моллюсках в разных географических точках. И наоборот, разработанная методика позволила индивидуально генотипировать образцы спороцист, извлеченные из одного моллюска.

3. 4. 2. Анализ нуклеотидных последовательностей рДНК трематод *Leucochloridium* sp.

С помощью подобранных специфических для рДНК праймеров последовательно проводили секвенирование исследуемого участка ДНК каждого образца. Анализ секвенограмм позволил получить нуклеотидную последовательность рДНК *L. paradoxum* общей длиной 4430 п.н. Нуклеотидные последовательности рДНК всех исследуемых образцов спороцист *L. paradoxum* гомологичны на 100%. Определенная в процессе секвенирования нуклеотидная последовательность рДНК спороцист *L. perturbatum*, кодирующая кластер генов рибосомной РНК, имеет длину 4444 п.н. Внутривидовая гомология также оценивается 100% совпадения по всем исследуемым образцам. Сравнение последовательностей нуклеотидов исследуемого участка рДНК *L. paradoxum* и *L. perturbatum*, выявило различия в районе внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2), составившие 9.1% и 7.3% соответственно. Секвенированная последовательность *L. vogtianum* имеет длину 2163 п.н.

Сравнение нуклеотидных последовательностей исследуемого участка рДНК *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*, выявило различия не только в районе внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2). Между консервативными последовательностями 18S, 5.8S и 28S трематоды с пупырчатыми покровами и последовательностями, кодирующими эти же участки двух других видов трематод выявлены полиморфизмы.

Последовательности, представляющие участки рДНК *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* аннотированы в GenBank под номерами JN639012, JN639011, KU351661 и KP938186, KP938187, соответственно (Zhukova et al., 2014; Ataev et al., 2016).

3. 4. 3. Вторичные структуры последовательностей рРНК трематод рода *Leucochloridium*

Нуклеотидные последовательности, представляющие транскрибируемые, но не кодирующие модули кластера генов рРНК (ITS1 и ITS2), содержат участки, способные к формированию вторичных структур, что позволяет использовать их особенности при решении ряда практических задач сравнительной и эволюционной генетики, а также филогенетики (Schultz et al., 2005; Wolf et al., 2005; Coleman, 2007; Selig et al., 2008). Особый интерес представляет модуль ITS2. Несмотря на первоначальные впечатления, что нуклеотидные последовательности, составляющие ITS2, сильно различаются, анализ топологии вторичных структур их транскриптов выявил общую основную структуру из двух спиралей с узнаваемыми характеристиками. Выявленные при анализе секвенограмм рДНК спороцист *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* межвидовые различия визуализированы на топологических схемах вторичных структур последовательностей нуклеотидов второго транскрибируемого спейсера. Преобразование первичной последовательности рРНК в предполагаемую вторичную структуру проводили при помощи сервера Mfold версии 2.3, так как в этой версии программы существует возможность варьирования температуры фолдинга. Температуру фолдинга фиксировали на 20°C, так как этот показатель наиболее приближен к реальной температуре окружающей среды, а значит и температуре тела моллюска, в котором развивается спороциста *Leucochloridium* sp. При этом вторичные структуры имели самый высокий отрицательный показатель свободной энергии (dG), что говорит об их стабильности.

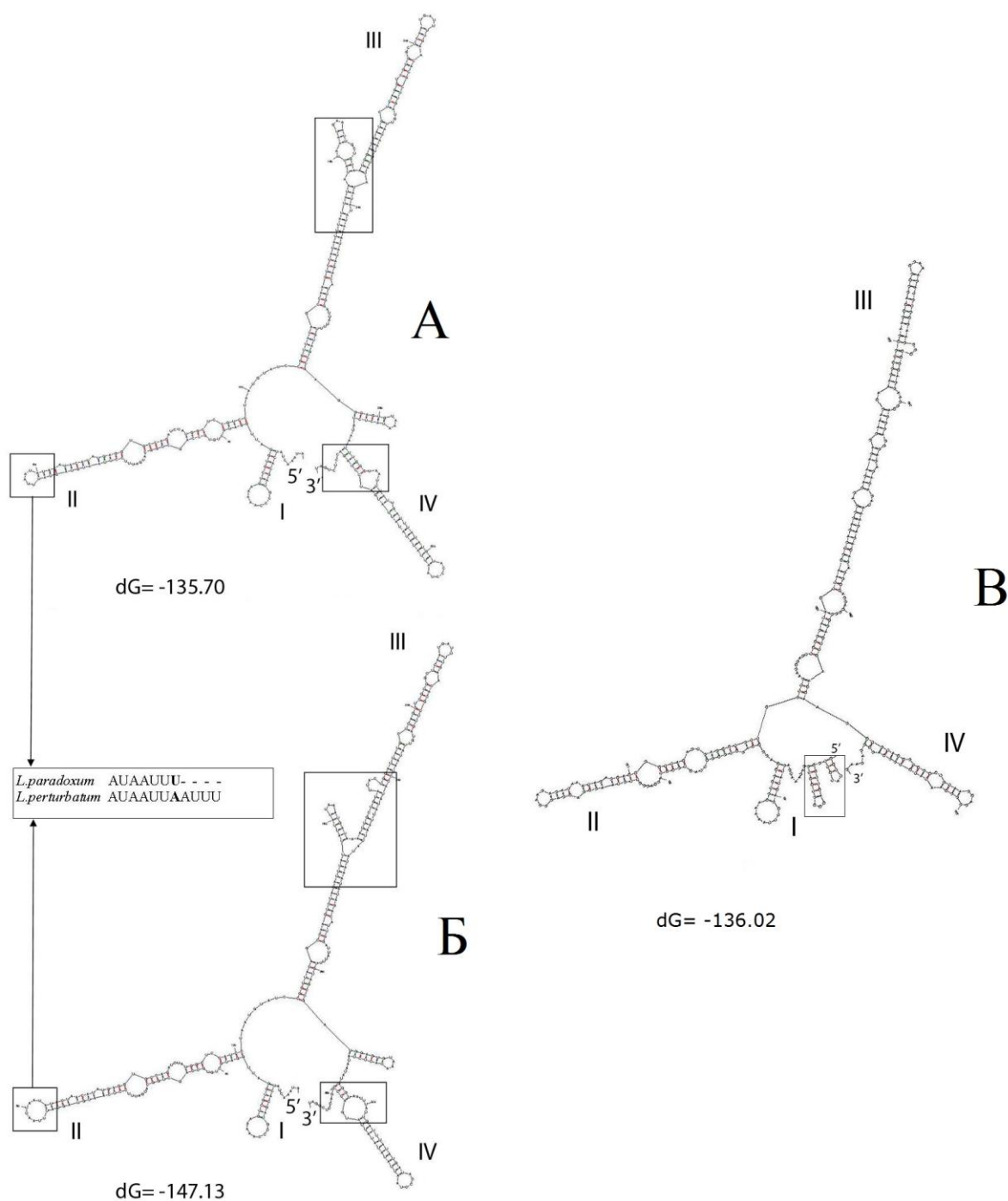


Рисунок 5. Топологические схемы вторичных структур транскриптов ITS2 трематод рода *Leucochloridium*.

Условные обозначения:

А. *L. paradoxum* (327 п.н.);

Б. *L. perturbatum* (339 п.н.);

В. *L. vogtianum* (343 п.н.).

Рамками выделены наиболее существенные отличия. dG – свободная энергия.

Видно, что графические изображения вторичных структур второго спейсера отличаются у исследуемых видов. Вместе с тем, полученные предположительные вторичные структуры участков рРНК *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*, несмотря на наличие межвидового полиморфизма в последовательности нуклеотидов, сохраняют характерную топологическую модель. Они имеют хорошо определяемые для

участка ITS2 рРНК черты, которые являются видовыми вариациями консервативных общих характеристик подобных структур эукариот (Schultz et al., 2005). На фигурах, обозначенных на рисунке, определяются четыре спиральные шпильки (I, II, III и IV), самая длинная из них – III (рис. 5). Такие же особенности структуры отмечены и у трематод других таксонов (Echinostomiformes, Plagiorchiformes, Strigeiformes, and Paramphistomiformes) (Morgan, Blair, 1998). Анализ особенностей вторичных структур ITS2 рибосомного кластера ДНК различных видов шистосом также выявил общие черты, что позволило авторам предположить, что, этот домен первичного транскрипта рДНК играет важную роль в процессе биогенеза рибосом (Michot et al., 1993). Основные различия вторичных структур транскриптов ITS2 видов лейкохлоридиумов были локализованы на стеблях шпилек III и IV, а также концевом участке шпильки II. Нуклеотидные последовательности участка ITS1 *L. vogtianum* и *L. paradoxum*, гомологичны между собой на 44%, а участка ITS2 – на 73%. При сравнении последовательностей *L. vogtianum* и *L. perturbatum* ITS1 оказались гомологичны на 43%, а ITS2 – на 70%. Последовательность ITS2 *L. vogtianum* имеет большее количество полиморфных сайтов, чем аналогичные последовательности *L. paradoxum* и *L. perturbatum* по отношению к друг другу. Следовательно, предположительная вторичная структура транскрипта ITS2 этого вида трематод, отличается в наибольшей степени от таковых *L. paradoxum* и *L. perturbatum*. На рисунке хорошо заметно увеличение длины шпилек за счет появления дополнительных петель, а также образование коротких шпилек на 5'-конце (рис. 5B).

3. 4. 4. Характеристика полиморфизмов нуклеотидных последовательностей, входящих в кластер генов рРНК трематод рода *Leucochloridium*

Сравнение полученных в результате секвенирования нуклеотидных последовательностей участка рДНК трематод исследуемых видов – *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* – позволило продемонстрировать внутривидовую гомологию элементов рибосомного кластера ДНК этих организмов и выявить межвидовой полиморфизм внутри транскрибируемых некодирующих спейсеров у всех трех видов. Также были обнаружены некоторые изменения в консервативных, т.е. кодирующих структуру рРНК, участках рДНК этих представителей рода *Leucochloridium*. В качестве маркера для видовой идентификации трематод рода *Leucochloridium* рассматривали транскрибируемые последовательности ITS1 и ITS2. Между этими участками рДНК трематод *L. paradoxum* и *L. perturbatum* выявлены различия, в основном представленные точечными полиморфизмами (табл. 1). Последовательности, кодирующие 5.8S рРНК, которые расположены между обоими участками ITS1 и ITS2, как и последовательности гена 18S и 28S рРНК, фланкирующие участок ITS1-5.8S-ITS2, гомологичны на 100%. Полученные генотипические различия подтверждают правомерность выделения на основе морфологического признака окраски отростков спороцист двух видов рода *Leucochloridium*: *L. paradoxum* с зелеными отростками и *L. perturbatum* с отростками коричневого цвета.

Таблица 1. Характеристика нуклеотидного состава последовательностей ITS1 и ITS2 трематод *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium perturbatum*

Вид	N	AT/GC (%)		Кол-во замен		Кол-во вставок/ делеций	
		ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
<i>L. paradoxum</i>	18	60.2/39.8	67.9/32.1	17	6	15	19
<i>L. perturbatum</i>	10	61.1/38.9	68.6/31.4				

Примечание: N – число последовательностей; AT/GC – соотношение AT- и GC- пар оснований.

При выравнивании нуклеотидных последовательностей рДНК трематод *L. paradoxum* и *L. perturbatum* с аналогичными последовательностями *L. vogtianum* точечные генетические полиморфизмы были выявлены не только в транскрибируемых некодирующих рРНК участках (ITS1 и ITS2), но и на участке генов 5.8S и 28S рРНК из *L. vogtianum* (табл. 2–4). Гомология нуклеотидных последовательностей рДНК *L. vogtianum* с таковыми *L. paradoxum* составила 94.7%, в то время как с *L. perturbatum* – 95.4%.

Таблица 2. Характеристика нуклеотидного состава последовательностей, кодирующих участки 18S, 5.8S и 28S рРНК трематод *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium vogtianum*

Вид	N	Кол-во замен			Кол-во вставок/ делеций		
		18S	5,8S	28S	18S	5,8S	28S
<i>L. paradoxum</i>	18	4	1	7	2	0	0
<i>L. vogtianum</i>	1						

Примечание: N – число последовательностей.

Таблица 3. Характеристика нуклеотидного состава последовательностей ITS1 и ITS2 рДНК трематод *Leucochloridium paradoxum* и *Leucochloridium vogtianum*

Вид	N	AT/GC (%)		Кол-во замен		Кол-во вставок/ делеций	
		ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
<i>L. paradoxum</i>	18	60.2/39.8	67.9/32.1	20	31	4	27
<i>L. vogtianum</i>	1	61.9/38.1	63.9/36.1				

Примечание: N – число последовательностей; AT/GC – соотношение AT- и GC-оснований.

Таблица 4. Характеристика нуклеотидного состава последовательностей ITS1 и ITS2 рДНК трематод *Leucochloridium perturbatum* и *Leucochloridium vogtianum*

Вид	N	AT/GC (%)		Кол-во замен		Кол-во вставок/ делеций	
		ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
<i>L. perturbatum</i>	18	60.2/39.8	67.9/32.1	7	12	28	50
<i>L. vogtianum</i>	1	61.9/38.1	63.9/36.1				

Примечание: N – число последовательностей; AT/GC – соотношение AT- и GC-оснований.

Факт выявления полиморфизмов на консервативных участках рДНК между видами одного рода трематод представляет интерес, так как эти участки являются маркерными при сравнении более высоких таксономических рангов, таких, как отряд, семейство и т. п. Данные о наличии подобных различий в последовательностях нуклеотидов консервативных доменов рибосомного кластера у представителей одного рода и даже вида хотя и представлены в литературе, но являются, скорее, исключением, чем правилом. Их можно объяснить внутривидовой изменчивостью.

Таким образом, анализ нуклеотидных последовательностей, входящих в состав кластера генов рРНК трех видов трематод рода *Leucochloridium* выявил полиморфизмы как в традиционно признанных полиморфными участках: ITS1 и ITS2, так и внутри консервативных последовательностей, кодирующих структуру 18S, 5.8S и 28S рибосомных РНК. Показано, что полиморфизмы во внутренних транскрибируемых последовательностях являются результатом замен, делеций и вставок нуклеотидов (табл. 2–4). В случае последовательностей, кодирующих консервативные домены кластера: 18S, 5.8S и 28S, сравнение секвенограмм *L. paradoxum* и *L. vogtianum* позволило обнаружить только 2 изменения типа делеция/вставка в гене 18S, остальные полиморфизмы были результатами замен нуклеотидов в генах 18S, 5.8S и 28S РНК в количестве 4, 1 и 7 замен соответственно (табл. 2).

3. 5. Филогенетический анализ трематод рода *Leucochloridium*

На настоящий момент определенные в нашей работе нуклеотидные последовательности кластера генов рибосомных ДНК длиной 4444 п.н. (*L. perturbatum*), 4430 п.н. (*L. paradoxum*) и 2163 п.н. (*L. vogtianum*) являются наиболее протяженными секвенированными участками хромосомной ДНК трематод рода *Leucochloridium* из аннотированных в базах GenBank. Они включают кодирующие (18S, 5.8S и 28S) и некодирующие (ITS1 и ITS2) участки исследуемого кластера генов, являющегося единицей транскрипции рРНК. Для определения таксономического статуса трематод внутри рода использовали нуклеотидные последовательности участка ITS1, ITS2, а также участок ITS1-5.8S-ITS2. Более широкую реконструкцию филогенетических отношений между видами трематод рода *Leucochloridium* и представителями других родов трематод («внешние группы») осуществляли на основании результатов секвенирования участков рДНК, которые кодируют 18S и 28S рРНК. Нуклеотидные последовательности для внешних групп брали из базы GenBank. Ключевым критерием выбора была полнота участка рДНК.

С использованием нескольких алгоритмов были получены филогенетические деревья схожей топологии. Во всех случаях в филогенетической реконструкции на основе участка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК исследуемые виды – *L. perturbatum*, *L. paradoxum* и *L. vogtianum* – кластеризуются в общую ветвь единого рода. При этом наиболее близкими друг к другу видами оказались *L. perturbatum* и *L. paradoxum*, линия с *L. vogtianum* на всех реконструкциях ответвляется раньше. Построения с использованием консервативных фрагментов, кодирующих 18S и 28S рДНК, подтверждают принадлежность рода *Leucochloridium* к семейству Leucochloridiidae, входящему в состав надсемейства Brachylaimoidea.

Правомочность помещения исследуемых видов в род *Leucochloridium* подтверждена с использованием маркеров рДНК и митохондриальных генов. При этом изучался материал, собранный в Польше и Чехии (Heneberg et al., 2016). Однако в этой работе более близкими на реконструкции оказываются виды *L. paradoxum* и *L. vogtianum*,

тогда как *L. perturbatum* ответвляется от общей ветви немного раньше. Кроме того, результаты построений на основе различных фрагментов генома различаются. Вероятно, эти отличия объясняются тем, что во всех случаях для филогенетических построений были использованы менее протяженные фрагменты генома – неполный фрагмент ITS2 и небольшой участок гена 18S отдельно друг от друга.

Построенная нами с использованием ядерных маркеров рДНК схема определяет расположение рода *Leucochloridium* среди других трематод (рис. 6).

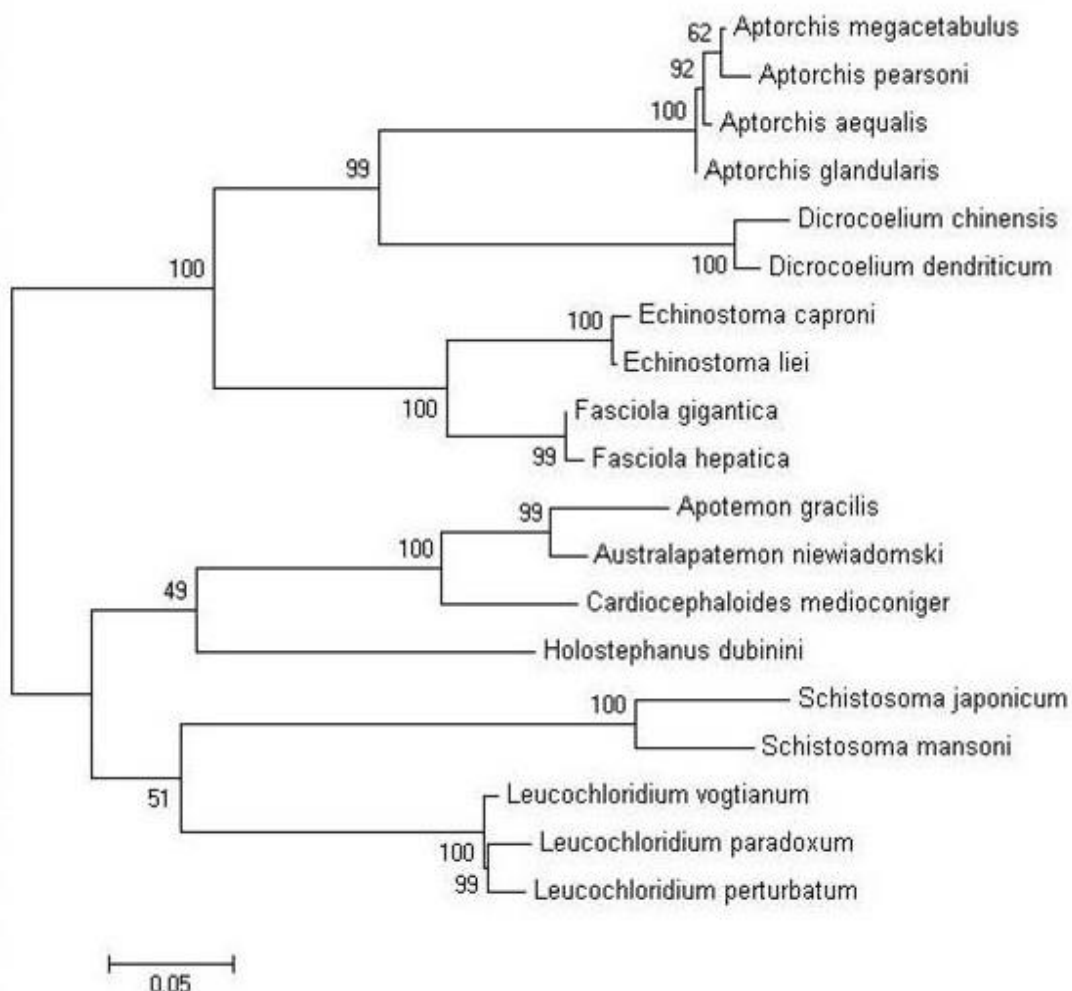


Рисунок 6. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям ITS1-5.8S-ITS2 представителей семейства Leucochloridiidae совместно с внешними группами методом ML.

Примечание: цифры означают бутстрэпную поддержку соответствующей ветви.

В целом она соответствует известной классификации Олсона (Olson et al., 2003) выполненной с использованием молекулярно-биологических данных. В то же время, построенная нами с помощью молекулярных маркеров схема во многом подтверждает справедливость классической системы Кэйбла.

ВЫВОДЫ

1. Представленное в работе явление множественного заражения моллюска *Succinea putris* одновременно тремя видами трематод рода *Leucochloridium*: *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* демонстрирует способность спорцист прободать стенку тела моллюска и выходить во внешнюю среду, что является уникальным механизмом, препятствующим гиперинвазии моллюска-хозяина.

2. Анализ нуклеотидных последовательностей кластера рДНК спороцист *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*, как и экспресс-анализ методом RAPD, подтвердил возможность идентификации видов трематод рода *Leucochloridium* на основе таких морфологических признаков, как форма и характер окраски отростков спороцист.

3. Полученная с помощью оригинальных специфических праймеров последовательность нуклеотидов кластера генов рРНК (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) *Leucochloridium paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum* является на данный момент наиболее полной из представленных в GenBank для трематод рода *Leucochloridium*. (JN639012, JN639011, KU351661 и KP938186, KP938187).

4. Филогенетический анализ с использованием нескольких ядерных маркеров (консервативных участков, кодирующих 18S, 28S рРНК; транскрибируемых участков, кодирующих ITS1, ITS2) позволил выявить отношения видов трематод *Leucochloridium* внутри рода, а также определить систематическое положение семейства Leucochloridiidae. Полученные дендрограммы подтверждают классические филогенетические схемы, основанные на морфологических признаках.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах:

1. **Жукова, А. А.** «Генотипирование трематод рода *Leucochloridium*, обитающих на территории Ленинградской области» / А. А. Жукова, Е. Е. Прохорова, Н. В. Цымбаленко, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // *Паразитология*. – СПб.: Наука, 2012. – Том 46. – Вып. 6. – С. 414 - 419.
2. **Zhukova, A. A.** Identification of species *Leucochloridium paradoxum* and *L. perturbatum* (TREMATODA) based on rDNA sequences / A. A. Zhukova, E. E. Prokhorova, A. S. Tokmakova, N. V. Tsymbalenko, G. L. Ataev // *Parazitologiya*. – 2014. – № 48. – P. 386 - 391.
3. Ataev, G. L. Multiple infection of amber *Succinea putris* snails with sporocysts of *Leucochloridium* spp. (Trematoda) / G. L. Ataev, **A. A. Zhukova**, A. S. Tokmakova, E. E. Prokhorova // *Parasitology Research*. – Springer: Verlag Berlin Heidelberg. – 2016. – P. 2 - 8. – ISSN 0932-0113.

Работы, опубликованные в других изданиях:

1. **Поспелова (Жукова), А. А.** «Определение видовой принадлежности трематод рода *Leucochloridium* с помощью молекулярно-генетических методов» / А. А. Поспелова (Жукова), Е. Е. Прохорова, Н. В. Цымбаленко, Г. Л. Атаев // *Функциональная морфология, экология и жизненные циклы животных: научные труды кафедры зоологии РГПУ им. А. И. Герцена*. – СПб.: ТЕССА. – 2011. – Вып. 11. – С. 51 - 68.

Работы, опубликованные в материалах региональных, всероссийских и международных конференций:

1. **Поспелова (Жукова), А. А.** «Определение трематод р. *Leucochloridium* с помощью молекулярно-генетических методов» / А. А. Поспелова, А. С. Токмакова // *Герценовские чтения: материалы межвузовской конференции молодых учёных*. – СПб.: ТЕССА. – 2010. – Вып. 10. – С. 80 - 81.
2. **Поспелова (Жукова), А. А.** «Определение видовой принадлежности трематод р. *Leucochloridium* с помощью молекулярно-генетических методов» / А. А. Поспелова // *Герценовские чтения: материалы межвузовской конференции молодых учёных*. - СПб.: ТЕССА. – 2011. – Вып. 11. – С. 84.

3. **Поспелова (Жукова), А. А.** «Генотипирование трематод р. *Leucochloridium*» / А. А. Поспелова, Е. Е. Прохорова // Материалы XLIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»; Новосибирский Государственный Университет. – Новосибирск. – 2011. – С. 196.
4. **Поспелова (Жукова), А. А.** «Определение трематод р. *Leucochloridium* с помощью молекулярно-генетических методов» / А. А. Поспелова // Материалы шестнадцатой Санкт-Петербургской ассамблеи молодых учёных и специалистов; Правительство Санкт-Петербурга и Комитет по науке и высшей школе. – СПб. – 2011. – С. 78.
5. **Поспелова (Жукова), А. А.** «Молекулярно-генетический анализ спороцист трематод рода *Leucochloridium*, паразитирующих в моллюсках *Succinea sp.* (Pulmonata) Ленинградской области» / А. А. Поспелова // Герценовские чтения: материалы межвузовской конференции молодых учёных. - СПб.: ТЕССА. – 2012. – Вып. 12. – С. 67.
6. **Поспелова (Жукова), А. А.** «Видовая идентификация спороцист трематод рода *Leucochloridium*, собранных на территории Ленинградской области» / А. А. Поспелова // XXXIX Межвузовская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицинской биологии и паразитологии»: материалы конференции. – СПб.: ВМА. – 2012. – С. 15
7. **Поспелова (Жукова), А. А.** «Молекулярно-генетический анализ спороцист трематод рода *Leucochloridium*, паразитирующих в моллюсках *Succinea sp.* (Pulmonata)» / А. А. Поспелова, А. С. Токмакова // Биология наука XXI века. 16 Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. Том 1. Пушино. – 2012 – С. 35
8. **Поспелова (Жукова), А. А.** «Генетический полиморфизм спороцист трематод рода *Leucochloridium*, паразитирующих в моллюсках рода *Succinea (Pulmonata)*» / А. А. Поспелова // Современные проблемы общей паразитологии: Материалы Международной научной конференции. – М.: РАН. – 2012. – С. 277 - 280
9. **Жукова А. А., Токмакова А. С.** «Полиморфизм рДНК трематод рода *Leucochloridium*» / А. А. Жукова, А. С. Токмакова // Материалы 51 международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»; Новосибирский Государственный Университет. – Новосибирск, 2013. – С. 160
10. **Жукова А. А.** «Полиморфизм кластера генов рибосомных РНК у трематод рода *Leucochloridium*» / А. А. Жукова, А. С. Токмакова // Биология наука XXI века. 17 Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. Пушино. – 2013.
11. **Жукова А. А.** «Сравнительный анализ рДНК трематод рода *Leucochloridium*» / А. А. Жукова, Е. Е. Прохорова // Материалы V Съезда Паразитологического общества при РАН: Всероссийской конференции с международным участием «Паразитология в изменяющемся мире»; ИСиЭЖ СО РАН. – Новосибирск: Гарамонд. – 2013. – С.72
12. **Жукова А. А.** «Генетический полиморфизм трематод рода *Leucochloridium*» / А. А. Жукова, А. С. Токмакова // XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов»: сборник тезисов. – Москва. – 2014. – С. 237
13. **Zhukova, A. A.** Phylogenetic intercommunications of trematodes of *Leucochloridium* genus. Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, Vladivostok – Vostok Marine Biological Station, September 1-10, 2015: Program & Abstracts. – Vladivostok. – 2015. – P. 85. – Engl. ISBN 978-5-7442-1563-7

14. Прохорова, Е. Е. 2015. Генотипирование трематод *Leucochloridium vogtianum* / Прохорова Е. Е., Жукова А. А., Токмакова А. С., Атаев Г. Л. // Материалы V Межрегиональной конференции «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке»: сборник тезисов. – Новосибирск. – 2015. – С. 83 - 84.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ТЕКСТЕ

к/к – конечная концентрация; ПААГ – полиакриламидный гель; ПЦР – полимеразная цепная реакция; п.н. – пар нуклеотидов; т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов; УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр; ITS (internal transcribed spacers) – внутренний транскрибируемый спейсер; ETS (external transcribed spacers) – внешний транскрибируемый спейсер; IGS (intergenic spacer) – межгенный спейсер; NTS (nontranscribed spacer) – нетранскрибируемый спейсер; RAPD-анализ (random amplified polymorphic DNA) – анализ полиморфизма фрагментов ДНК, амплифицированных с помощью случайных праймеров; ML (maximum likelihood) – метод максимального правдоподобия; ME (minimal evolution) – метод минимальной эволюции; MP (maximum parsimony) – метод максимальной экономии; NJ (neighbor-joining method) – метод ближайшего соседа.