

Время дивергенции между легочными пресноводными моллюсками (*Lymnaea stagnalis* L. и *Planorbarius corneus* L.)

В.В. Долматова

Учреждение образования «Витебский государственный университет
имени П.М. Машерова»

Малакофауна является высокочувствительной к загрязнениям вод загрязнителями и играет ведущую роль в аккумуляции и переносе химических веществ в водоемах. Однако по своему видовому составу отличается по реакции на загрязнители в связи с наличием различных переносчиков кислорода. Время дивергенции между прудовиком обыкновенным и катушкой роговой не установлено, вероятно, из-за высокой степени их родства.

Цель статьи – определение времени замещения гемоглобина на гемоцианин с помощью биоинформатических методов.

Материал и методы. При исследовании были использованы база данных www.timetree.org, дистанционно-матричный метод построения дендрограмм (метод связывания ближайших соседей – Neighbour-joining) и нуклеотидные последовательности гистона H4 для 64 организмов различных таксономических групп.

Результаты и их обсуждение. Построена дендрограмма, которая основана на определенном времени дивергенции между представителями семейств – *Radix auricularia* (семейство прудовики Lymnaeidae) и *Biomphalaria glabrata* (семейство катушки Planorbidae). Это время совпадает с тоарским климатическим событием (около 183 млн лет назад), когда в результате извержений вулканов снизилась концентрация кислорода в водных системах. При дополнительных исследованиях с использованием наземных моллюсков (например, виноградной улитки (*Helix pomatia*) – брюхоногого моллюска отряда легочных улиток семейства гелицид) были получены аналогичные результаты.

Заключение. Таким образом, описан биоинформатический подход для оценки времени дивергенции между двумя видами пресноводных легочных моллюсков в результате геологического катаклизма.

Ключевые слова: прудовик обыкновенный, катушка роговая, время дивергенции, гистон H4, тоарское климатическое событие.

Determination of the Divergence Time between Pulmonary Freshwater Mollusks (*Lymnaea stagnalis* L. and *Planorbarius corneus* L.)

V.V. Dolmatova

Educational Establishment «Vitebsk State P.M. Masherov University»

Malacofauna is highly sensitive to contamination of waters by pollutants and plays a leading role in the accumulation and transfer of chemicals in water bodies. However, its species composition is different in reactions to pollutants in connection with the presence of different oxygen carriers. The divergence time between the common pond snail and the horn coil is not defined, probably because of the high degree of their kinship.

The aim of the study was to determine the time of replacement of hemoglobin for hemocyanin using bioinformatics methods.

Material and methods. In the study we used www.timetree.org database, applied distance-matrix method for constructing dendrograms (the method of linking nearest neighbours – Neighbour-joining) as well as the nucleotide sequence of the histone H4 64 organisms of different taxonomic groups.

Findings and their discussion. A dendrogram was built, which is based on a specific time of divergence between members of families – *Radix auricularia* (family pond snails Lymnaeidae) and *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae family of coil). This time coincides with Toarcian climatic event (about 183 million years ago), when the result of volcanic eruptions decreased oxygen concentration in water systems. In additional studies using terrestrial mollusks (e.g., grape snails (*Helix pomatia*) is a gastropod mollusc of the detachment of the pulmonary snails of the family helioid) similar results were obtained.

Conclusion. The article describes the bioinformatics approach for estimating the time of divergence between two species of freshwater mollusks as a result of a geological cataclysm.

Key words: ordinary pond snail, horn coil, divergence time, histone H4, Toarcian climatic event.

Представители таксона *Mollusca* имеют четыре типа кислородпереносящих металлопротеинов и тканевых протогемовых белков: тканевые протогемы, гемоглобин красных кровяных клеток, внеклеточные гемоглобины и гемоцианины [1]. У прудовиков транспорт кислорода осуществляет медьсодержащий гемоцианин, а у катушек – железосодержащий гемоглобин. Существует прямая зависимость между активностью животного и концентрацией переносчиков кислорода во внутренней среде.

Большинство изменений в аминокислотной последовательности белков обусловлено мутациями небольших участков генома, медленно накапливающимися с течением времени. Точковые мутации и небольшие вставки и делеции возникают случайно, по-видимому, с более или менее равной вероятностью во всех участках генома, за исключением «горячих точек», где частота мутирования существенно выше. Многие мутации, изменяющие аминокислотную последовательность, оказываются вредными и довольно быстро отбрасываются в ходе естественного отбора (скорость этого процесса зависит от степени повреждающего эффекта). Меньшее число мутаций оказывается полезным, но эти мутации могут распространиться в популяции и, в конце концов, вытеснить исходную нуклеотидную последовательность. Когда мутантный вариант гена вытесняет исходный, мутация закрепляется в популяции. Однако имеется доля мутационных изменений в аминокислотной последовательности, которая остается нейтральной, т.е. не оказывает действия на функцию белка, и поэтому может накапливаться в результате случайного дрейфа и закрепления.

Скорость накопления мутационных изменений является характерной особенностью каждого белка, частично зависящей от его чувствительности к изменениям внутренней и внешней среды клетки и организма. При разделении одного вида на два новых каждый из них образует самостоятельный эволюционный пул. Сравнивая соответствующие белки двух видов, можно выявить различия между ними, накопившиеся с того времени, когда их предки перестали скрещиваться между собой. Некоторые белки высококонсервативны и мало меняются или не меняются от вида к виду. Это говорит о том, что практически любые изменения оказываются вредными и отбрасываются при естественном отборе.

Различия между двумя белками выражаются как их дивергенция, т.е. процент различающихся аминокислотных остатков. При сравнительном изучении определенного белка у нескольких видов его дивергенция для каждой пары сравниваемых видов пропорциональна (более или менее) времени, прошедшему с момента их разделения. Тем самым получаются эволюционные часы, измеряющие, по всей видимости, равномерное накопление мутаций в процессе эволюции данного белка. Скорость дивергенции может быть измерена как процент различий, накопившихся за миллион лет, или обратной величины-единицы эволюционного времени (ЕЭВ), соответствующей времени (в миллионах лет), необходимому для осуществления дивергенции на 1% [2].

Определенные времена дивергенции до сих пор остаются достаточно противоречивыми. Например, время дивергенции человека и шимпанзе варьирует от 3,6 до 13 млн лет назад. Наличие таких противоречий объясняется использованием различных методов определения времен дивергенции, изучением различных частей геномов (ядерных генов, митохондриальных генов, некодирующих участков и др.) и различными калибровочными точками.

Теоретической основой, на которой базируется определение времен дивергенции различных организмов в молекулярной эволюции, является гипотеза о «молекулярных часах», предложенная в 1962–1965 гг. Э. Цукеркэндлом и Л. Полингом. Согласно этой гипотезе число аминокислотных замен в сравниваемых белках организмов двух видов приблизительно пропорционально времени их дивергенции. Отсутствие строгой пропорциональности связано с тем, что ни один ген или белок не эволюционирует со строго постоянной скоростью на протяжении длительного времени, так как через некоторое время могут измениться их функции, а также вариация уровня мутаций и репарации у различных групп организмов [3].

Гистоны – ядерные белки, выполняющие 2 основные функции: они участвуют в упаковке нитей ДНК в ядре и в эпигенетической регуляции таких ядерных процессов, как транскрипция, репликация и репарация. Гистон H4 относится к коровым гистонам [4]. Гистон H4 является белком с небольшой молекулярной массой, состав которого чрезвычайно обогащен положительно заряженными аминокислотами лизином и аргинином. Положительно заряженные аминокислоты сосредоточены преимущественно в С-концевых и N-концевых частях молекул нуклеосомных гистонов, тогда как центральный домен относительно богат гидрофобными остатками. Нуклеосомные гистоны относятся к числу наиболее консервативных белков. Их аминокислотные последовательности имеют почти 100%-ную гомологию у всех эукариот. В последние годы обнаружено много так называемых вариантных форм гистонов. Как правило, эти формы отличаются от основных несколькими аминокислотными заменами. Вариантных форм гистона H4 пока не обнаружено [5].

Малакофауна является высокочувствительной к загрязнению вод поллютантами и играет ведущую роль в аккумуляции и переносе химических веществ в водоемах. Однако по своему видовому составу отличается

по реакции на загрязнители. Наличие у катушки вторичной жабры, гемоглобина, который повышает интенсивность поглощения кислорода гемолимфой, способность дышать с помощью заполненного водой легкого, позволяет ей меньше зависеть от поверхности воды, чем прудовику с гемоцианином, и обуславливает большую устойчивость к стрессовым воздействиям. Представляется интересным установить время дивергенции между близкородственными видами брюхоногих легочных моллюсков, обитающих в пресных стоячих водоемах.

Цель статьи – определение времени замещения гемоглобина на гемоцианин с помощью биоинформатических методов.

Материал и методы. Для установления времени дивергенции использована база данных www.timetree.org, режим поиска NODE TIME (поиск времени дивергенции для двух видов). Для построения дендрограммы применены дистанционно-матричный метод построения дендрограмм (метод связывания ближайших соседей – Neighbour-joining) и нуклеотидные последовательности гистона H4 из базы данных www.ncbi.nlm.nih.gov для 64 организмов различных таксономических групп (класс Млекопитающие: *Homo sapiens*, *Gorilla gorilla gorilla*, *Pan troglodytes*, *Pongo abelii*, *Macaca mulatta*, *Rhinopithecus roxellana*, *Mus musculus*, *Tarsius syrichta*, *Camelus bactrianus*, *Castor canadensis*, *Sus scrofa*, *Equus caballus*, *Equus przewalskii*, *Panthera pardus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Felis catus*, *Myotis davidii*, *Ceratotherium simum simum*, *Vicugna pacos*, *Manis javanica*, *Mesocricetus auratus*; класс Птицы: *Falco cherrug*, *Gallus gallus*, *Zonotrichia albicollis*, *Meleagris gallopavo*, *Calidris pugnax*, *Corvus cornix cornix*, *Aquila chrysaetos canadensis*, *Haliaeetus leucocephalus*, *Aptenodytes forsteri*, *Geospiza fortis*, *Columba livia*; класс Пресмыкающиеся: *Alligator mississippiensis*, *Gavialis gangeticus*, *Chrysemys picta bellii*, *Gekko japonicus*, *Anolis carolinensis*; класс Земноводные: *Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis*; класс Насекомые: *Heliconius numata silvana*, *Spodoptera frugiperda*, *Papilio xuthus*, *Calycopis cecrops*, *Plodia interpunctella*, *Danaus plexippus*, *Bombyx mori*, *Diachasma alloeum*; класс Брюхоногие: *Planorbis corneus*, *Radix auricularia*, *Biomphalaria glabrata*, *Lottia gigantea*, *Deroceras reticulatum*, *Leucostigma candidescens candidescens*, *Alopias bielzii*, *Nenia tridens*, *Cochlodina orthostoma orthostoma*, *Praxispira subserrulata*; класс Высшие раки: *Caridina multidentata*, *Parhyale hawaiiensis*; класс Коралловые полипы: *Nematostella vectensis*; класс Невооруженные немертины: *Carinoma sp.*, *Lineus bilineatus*; класс Ланцетники: *Branchiostoma floridae*; класс Сипункулиды: *Aspidosiphon parvulus*).

Для построения дендрограммы использована программа MEGA 5.2, в которую вносились 64 нуклеотидные последовательности гистона H4 организмов различных таксономических групп. Дендрограмма строилась по методу Neighbor-Joining Tree, модель Tamura-Nei. В основание ветвей было положено время дивергенции между катушкой роговой и прудовиком обыкновенным (*Planorbis corneus* и *Lymnaea stagnalis*).

Результаты и их обсуждение. Время дивергенции между прудовиком обыкновенным и катушкой роговой до настоящего времени не определено, вероятно, из-за высокой степени их родства. В связи с этим время дивергенции определялось между видами, принадлежащими к их семействам – *Radix auricularia* (семейство прудовики *Lymnaeidae*) и *Biomphalaria glabrata* (семейство катушки *Planorbidae*). В работе использован ряд представителей моллюсков: *Nenia tridens*, *Praxispira subserrulata*, *Alopias bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*. Время дивергенции устанавливалось между *Biomphalaria glabrata* и *Nenia tridens*, *Praxispira subserrulata*, *Alopias bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*; между *Planorbis corneus* и *Nenia tridens*, *Praxispira subserrulata*, *Alopias bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*; между *Radix auricularia* и *Nenia tridens*, *Praxispira subserrulata*, *Alopias bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*; между *Leucostigma candidescens* и *Radix auricularia*, *Biomphalaria glabrata*.

При определении времени дивергенции между семействами получены данные, которые можно считать временем дивергенции между прудовиком обыкновенным и катушкой роговой – 182 млн лет назад.

При дополнительных исследованиях с использованием наземных моллюсков, например, виноградной улитки (*Helix pomatia*, брюхоногий моллюск отряда легочных улиток семейства гелициды), были получены аналогичные результаты.

Дендрограмма представлена на рис. Точкой отмечено место расхождения прудовика обыкновенного и катушки роговой.

Данное время относится к тоарскому веку (эра, ярус). Тоарский ярус (182,7–174,1 млн лет назад) – верхний ярус нижнего отдела юрской системы. Около 183 млн лет назад на Земле случилось «тоарское климатическое событие» – в результате извержений вулканов в атмосферу попало много углекислого газа, среднегодовая температура Земли выросла на 5 градусов, увеличилось количество осадков и смытых в океан минеральных веществ. Потребляющие растворенный в воде кислород водоросли и бактерии начали бурно размножаться, что привело к формированию черных сланцев – образующихся в бескислородных условиях осадочных пород, богатых органикой [6].

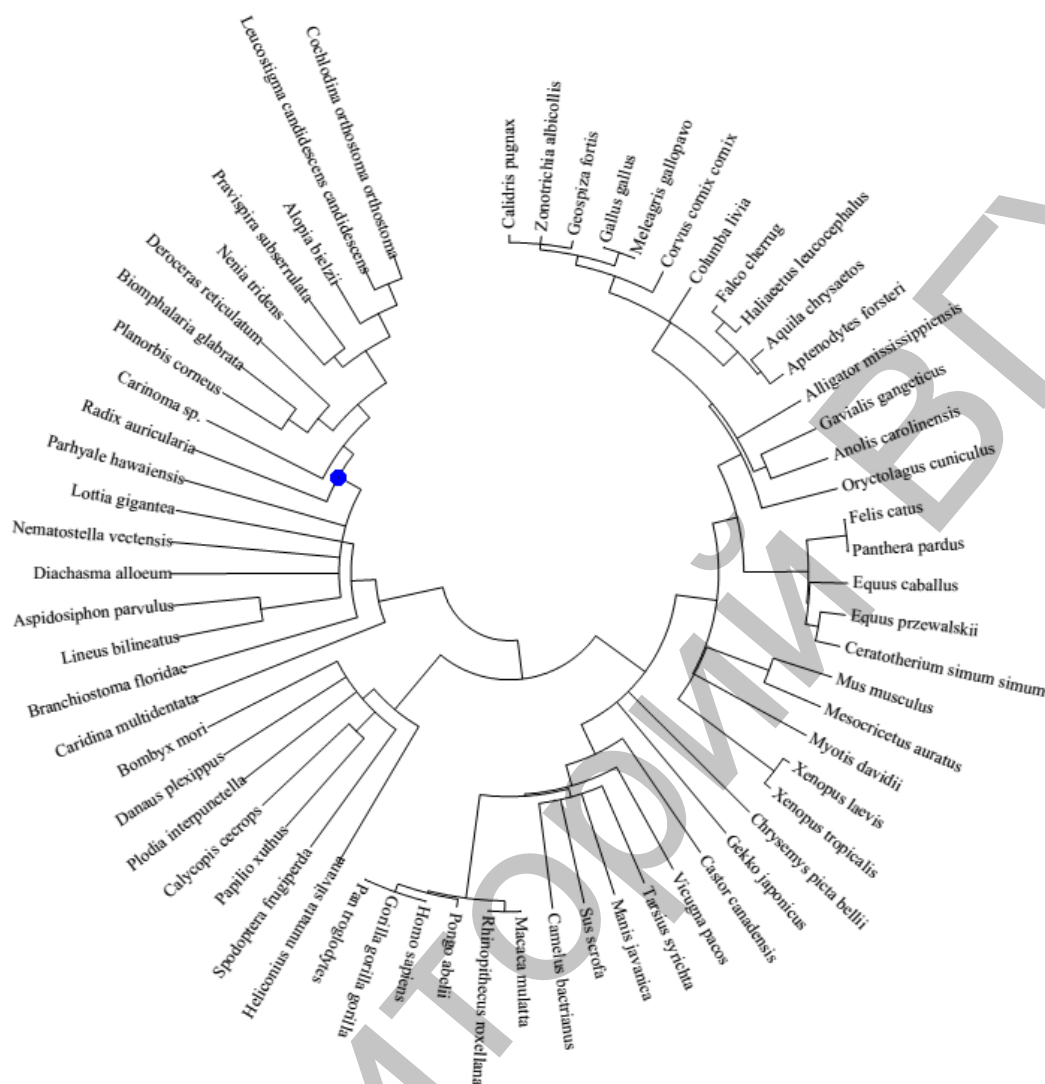


Рис. Дендрограмма для различных таксономических групп организмов, основанная на времени дивергенции между прудовиком обыкновенным и катушкой роговой, построенная при использовании нуклеотидных последовательностей гистона H4.

Заключение. В результате «тоарского климатического события», которое случилось около 183 млн лет назад, прудовики отделились от катушек (182 млн лет назад). Этот вывод базируется на комплексе биоинформатических исследований. Исходя из этого, можно предположить, что после «тоарского климатического события» гемоцианин возник не только у моллюсков, но и у членистоногих.

Следовательно, при уменьшении биодоступного кислорода произошла дивергенция легочных моллюсков с образованием гемоцианина из медьсодержащих тирозиназ, относящихся к оксидоредуктазам, в частности к феноксидазам, требующим для катализируемых реакций относительно низкие уровни энергии активации. Это был, вероятно, способ сохранения популяции при длительно существующих неблагоприятных условиях среды обитания.

Автор статьи выражает глубокую благодарность заведующему кафедрой общей химии Белорусского государственного медицинского университета, кандидату биологических наук, доценту Владиславу Викторовичу Хрусталеву за консультации и помощь в освоении работы с использованием компьютерного инструментария современной биоинформатики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алякринская, И.О. Гемоглобины и гемоцианины беспозвоночных (Биохимические адаптации к условиям среды) / И.О. Алякринская. – М.: Наука, 1979. – 153 с.
2. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин. – М.: Мир, 1987. – 544 с.

3. Бутвиловский, А.В. Основные методы молекулярной эволюции: монография / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский, В.В. Давыдов, Е.А. Черноус, В.В. Хрусталеv; под общ. ред. проф. Е.В. Барковского. – Минск: Белпринт, 2009. – 216 с.
4. Биологический энциклопедический словарь / гл. ред. М.С. Гиляров. – М.: Сов. энциклопедия, 1986. – 831 с.
5. Разин, С.В. Хроматин: упакованный геном / С.В. Разин, А.А. Быстрицкий. – М.: Биноm: Лаборатория знаний, 2009. – 176 с.
6. Xu, W. Carbon sequestration in an expanded lake system during the Toarcian oceanic anoxic event / W. Xu, Micha Ruhl, Hugh C. Jenkyns, Stephen P. Hesselbo, James B. Riding, David Selby, B. David A. Naafs, Johan W.H. Weijers, Richard D. Pancost, Erik W. Tegelaar & Erdem F. Idiz // Nature Geoscience. – 2017. – Vol. 10. – P. 129–134.

REFERENCES

1. Aliakrinskaya I.O. *Gemoglobini i gemotsianini bespozvonochnikh (Biokhemichekiye adaptatsii k usloviyam sredi* [Hemoglobines and Hemocianines of Invertebrates (Biochemical Adaptations to Environment)], М., Nauka, 1979, 153 p.
2. Lewin B. *Geni* [Genes], М., Mir, 1987, 544 p.
3. Butvilovski A.V., Barkovski E.V., Butvilovski V.E., Davydov V.V., Chernous E.A., Khrustalev V.V. *Osnovniye metody molekuliarnoi evoliutsii: monografiya* [Basic Methods of Molecular Evolution: Monograph], Мn., Belprint, 2009, 216 p.
4. Giliarov M.S. *Biologicheskii entsiklopedicheski slovar* [Biological Encyclopedic Dictionary], М., Sov. entsiklopediya, 1986, 831 p.
5. Razin S.V., Bystritski A.A. *Khromatin: upakovannii genom* [Chromatin: Packed Genome], М., Binom: Laboratoriya znaniy, 2009, 176 p.
6. Weimu Xu, Micha Ruhl, Hugh C. Jenkyns, Stephen P. Hesselbo, James B. Riding, David Selby, B. David A. Naafs, Johan W.H. Weijers, Richard D. Pancost, Erik W. Tegelaar & Erdem F. Idiz. Carbon sequestration in an expanded lake system during the Toarcian oceanic anoxic event. Nature Geoscience. – 2017. – Vol. 10. – P. 129–134.

Поступила в редакцию 02.06.2017

Адрес для корреспонденции: e-mail: vika.dolmatova19@yandex.by – Долматова В.В.