

Оксана Николаевна ЖИГИЛЕВА —  
доцент кафедры экологии и генетики  
Тюменского государственного университета,  
кандидат биологических наук  
zhigileva@mail.ru

УДК 639.371.5

## ПЦР-МАРКЕРЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ КАРПОВЫХ РЫБ К ТРЕМАТОДНОЙ ИНВАЗИИ\*

### PCR-MARKERS FOR SUSCEPTIBILITY TO TREMATODE INFECTION IN CYPRINID FISH

**АННОТАЦИЯ.** Выявлены ISSR-PCR маркеры, ассоциированные с группировками карповых рыб, имеющими повышенную восприимчивость к трематодной инвазии.

**SUMMARY.** ISSR-PCR markers associated with groups of cyprinid fish, which have increased susceptibility to trematode infestation were identified.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА.** Карповые рыбы, трематоды, восприимчивость, зараженность, ISSR-PCR маркеры.

**KEY WORDS.** Cyprinid fish, trematodes, susceptibility, infection, ISSR-PCR markers.

**Введение.** Трематодная инвазия является преобладающей для рыб Обь-Иртышского бассейна. Зараженность карповых рыб личинками трематод достигает 100%, некоторые из них имеют эпизоотологическое и эпидемиологическое значение [1]. В условиях интенсивного нефтегазопромыслового освоения Западной Сибири, сопровождающегося загрязнением водоемов, на фоне интенсивного промыслового давления на популяции рыб и глобальных изменений климата очевидна необходимость разработки и организации региональной системы мониторинга паразитарных систем. Восприимчивость к инвазии является генетически обусловленной характеристикой. Поэтому целью данной работы было изучение взаимосвязи зараженности трематодами с генотипами рыб и поиск маркеров паразито-резистентности. Решение этих вопросов позволило бы прогнозировать изменение напряженности паразитологической ситуации по актуальным трематодозам при изменении генетической структуры популяций рыб.

В качестве генетических маркеров были выбраны ISSR-PCR-маркеры, которые относятся к категории мультилокусных маркеров ДНК [2], [3]. Они отражают изменчивость генома в целом, включая кодирующую и некодирующую его части, в том числе регуляторные последовательности. Поскольку неспецифическая резистентность организма, включающая и устойчивость к паразитарной инвазии, носит полигенный характер, применение мультилокусных маркеров может быть весьма перспективным при поиске ассоциативной связи между генотипами и зараженностью паразитами.

**Материал и методика.** Материалом для исследования послужили 2 вида рыб — язь *Leuciscus idus* Linnaeus, 1758 и плотва *Rutilus rutilus* Pallas, 1811

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (ГК № П712).

(Surginiformes: Surginidae). Материал собран в ходе контрольных отловов на базе филиалов ГУ «Нижнеобьрыбводхоз» в ноябре-январе 2008-2009 гг. в шести реках Обь-Иртышского бассейна: Северная Сосьва (п. Пугоры, п. Сосьва, п. Хулимсунт), Обь (Белогорье, п. Кедровый, г. Нефтеюганск), Большой Салым (п. Лямпино), Конда (п. Болчары, п. Кондинское, п. Междуреченск), Иртыш (устье р. Конда), Тобол (с. Иковское). Объем выборки составил 111 особей плотвы и 143 особи язя\*.

Паразитологическое исследование рыб на инвазированность личинками трематод осуществляли по стандартной методике [4]. Для выявления описторхид использовали компрессионный метод в модификации [5]. Для видовой диагностики трематод использовали определители [6], [7]. Рассчитывали индекс обилия — среднее количество личинок паразита на одну рыбу, для описторхид — на 1 см<sup>2</sup> поверхности спинных мышц.

ДНК экстрагировали из сердечной мышечной ткани, фиксированной в 70% этаноле методом щелочного лизиса [8]. Амплификацию последовательностей, ограниченных простыми повторами, проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей ПЦР буфер (0.01 М трис-НСl, 0.05 М КСl, 0,1% тритон X-100), 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ каждого из dNTPs, 1 мкл раствора тотальной ДНК, 2,5 мМ праймера и 0,2 ед/мкл *Tag*-полимеразы («Fermentas») на амплификаторе Chromo-4 («Bio-Rad») в следующем режиме: 94 °С — 7 мин., затем 94 °С — 30 с, 52(56) °С — 45 с, 72 °С — 2 мин. (40 циклов), 72 °С — 7 мин. Для ISSR-PCR анализа использовали 3 праймера: (AG)<sub>8</sub>G (№2), (AG)<sub>8</sub>T (№3) и (CA)<sub>8</sub>G (№4). Анализ ISSR-PCR-фрагментов осуществляли в 2% агарозном геле. Длины фрагментов определяли с помощью маркера молекулярных масс ДНК 100bp («Fermentas»). Гели документировали с помощью системы VersaDoc (Bio-Rad). По электрофореграммам составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось «1» и рассматривалось как доминантный аллель, отсутствие — «0» и рассматривалось как рецессивный аллель. Методами статистических сравнений по критерию Стьюдента и дисперсионного анализа (ANOVA) по критерию Фишера сравнивали количество трех наиболее массовых видов паразитов и суммарное количество личинок трематод у рыб с разными ISSR-PCR-бэндами. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ Excel, STATISTICA версии 6.0 [9].

**Результаты и обсуждение.** У плотвы после электрофореза ПЦР-продуктов, синтезированных с использованием праймера № 3, удается идентифицировать 13 локусов (бэндов), 11 из которых полиморфны (рис. 1).

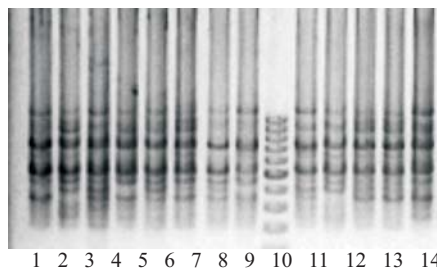


Рис. 1. Электрофореграмма ISSR-PCR-продуктов плотвы, полученных с использованием праймера № 3: 1-8, 10-14 разные особи, 9 — маркер молекулярных масс 100bp

\* Выражаю признательность с.н.с. Института краевой инфекционной патологии, к.м.н. В.В. Ожирельеву, предоставившему материал для исследования.

Из 11 проанализированных локусов достоверные различия в зараженности личинками трематод носителей разных аллелей выявлены только по одному (табл. 1).

Таблица 1

## Индекс обилия трематод у плотвы с разными ISSR-PCR-бэндами

Локус	<i>I. sp.</i>		P	<i>O. felineus</i>		P	<i>M. bilis</i>		P	всего		P
	0	1		0	1		0	1		0	1	
p3-1	0,1	0	0,50	0,3	0,6	0,32	2,1	0,2	0,50	3,6	0,8	0,43
p3-2	3,6	1,5	0,13	0,1	0,4	0,19	0,2	0,06	0,12	5,6	2,5	0,14
p3-3	1,8	2,6	0,54	0,3	0,2	0,42	0,09	0,1	0,77	2,8	4,5	0,38
p3-4	1,8	2,8	0,49	0,3	0,2	0,40	0,04	0,2*	0,04	3,3	3,7	0,83
p3-5	мономорфный											
p3-6	2,6	1,6	0,42	0,3	0,2	0,55	0,08	0,11	0,68	4,1	2,7	0,47
p3-7	мономорфный											
p3-8	2,4	0,5	0,24	0,3	0,2	0,62	0,1	0	0,25	4,1	0,3	0,11
p3-9	1,8	2,5	0,57	0,3	0,2	0,61	0,05	0,16	0,16	3,0	4,0	0,60
p3-10	2,1	1,9	0,90	0,3	0,2	0,66	0,1	0	0,35	3,3	4	0,82
p3-11	2,0	2,3	0,79	0,3	0,1	0,07	0,05	0,2	0,06	3,0	4,7	0,45
p3-12	1,8	2,1	0,83	0,3	0,3	0,94	0,1	0,1	1,00	4,6	3,2	0,62
p3-13	1,5	2,6	0,34	0,4	0,2	0,42	0,04	0,13	0,28	2,8	3,8	0,60

**Примечание:** \* — различия между носителями аллелей 1 и 0 достоверны.

По 4-ому бэнду у обладателей доминантного аллеля («1») было в 5 раз больше личинок *Metorchis bilis*, чем у обладателей рецессивного, 0-аллеля ( $F=0,046$ ,  $P<0,05$ ). Эти различия могут быть обусловлены двумя причинами — либо преимуществом при инвазии носителей определенного аллеля, либо особенностями пространственного распределения частот аллелей и встречаемости паразитов. Для проверки этих гипотез был проведен ANOVA-тест зависимости распределения аллелей и паразитов от места отлова. В обоих случаях получены достоверные зависимости. Значения F-критерия составили для ихтиокотилурусов — 3,6, для *O. felineus* — 4,7 и для суммарного количества личинок трематод — 11,2 ( $P<0,001$ ). Зависимость распределения аллелей от места отлова рыб была достоверной по 2-ому, 6-ому, 8-ому, 9-ому, 10-ому, 11-ому, 12-ому и 13-ому ISSR-PCR-локусам (табл. 2).

Таблица 2

## Зависимость распределения ISSR-PCR-бэндов плотвы от места отлова (ANOVA)

Бэнд	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
p3-1	0,705	10	0,070	4,992	108	0,046	1,52	0,140103
p3-2	6,596	10	0,659	17,252	108	0,159	4,12*	0,000077
p3-3	1,574	10	0,157	27,064	108	0,250	0,62	0,786887
p3-4	2,365	10	0,236	21,920	108	0,202	1,16	0,322144
p3-6	5,533	10	0,553	24,164	108	0,223	2,47*	0,010488
p3-8	5,110	10	0,511	12,183	108	0,112	4,53*	0,000024
p3-9	5,404	10	0,540	23,032	108	0,213	2,53*	0,008781
p3-10	3,164	10	0,316	12,801	108	0,118	2,67*	0,005904

Окончание табл. 2

p3-11	5,399	10	0,539	19,306	108	0,178	3,02*	0,0021
p3-12	6,860	10	0,686	12,299	108	0,113	6,02*	0
p3-13	9,435	10	0,943	20,143	108	0,186	5,05*	0,000005

**Примечание:** \* — значение F-критерия достоверно.

Это подтверждает факт пространственной неоднородности генетической структуры плотвы, отловленной в разных частях Обь-Иртышского бассейна и зависимость ее зараженности от локальных условий местообитания. Однако для *M. bilis* и для 4-ого локуса зависимость оказалась недостоверной. Следовательно, распределение частот аллелей этого локуса и обилие *M. bilis* не зависят от географического фактора, но зависят друг от друга, что позволяет принять первую гипотезу. Доминантный аллель («1») 4-го локуса может служить маркером предрасположенности плотвы к инвазии *M. bilis*, а рецессивный, 0-аллель — маркером устойчивости.

У язя на электрофореграммах ПЦР-продуктов, полученных с использованием трех праймеров, идентифицировано 20 локусов (бэндов), 8 из которых мономорфны. У этого вида ISSR-PCR-паттерны менее разнообразны и имеют иной характер распределения по сравнению с плотвой. На электрофореграмме ISSR-продуктов, синтезированных с использованием праймера № 3, у язя идентифицировано только 8 локусов (бэндов), продукты размером 900 п.н., соответствующие 4-ому локусу плотвы, отсутствуют (рис. 2). Разница генетических систем даже относительно близких видов животных ограничивает возможности использования выявленных у одного вида животных ISSR-маркеров для прогнозирования устойчивости к инвазии других видов.

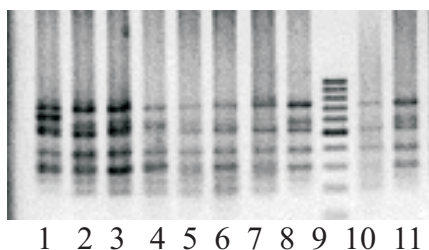


Рис. 2. Электрофореграмма ISSR-PCR-продуктов язя, полученных с использованием праймера №3: 1-8, 10-11 разные особи, 9 — маркер молекулярных масс 100bp

Из 12 полиморфных локусов статистически значимые различия по инвазированности личинками трематод обладателей разных аллелей выявлены по 6 (табл. 3).

Таблица 3

Индекс обилия трематод у язя с разными ISSR-PCR-бэндами

Бэнд	<i>I. sp.</i>		p	<i>O. felineus</i>		p	<i>M. bilis</i>		p	всего		p
	1	0		1	0		1	0		1	0	
p2-1	мономорфный											
p2-2	1,4	0,7	0,3	7,1*	4,0	0,007	1,3	1,3	0,9	8,5*	5,5	0,02
p2-3	мономорфный											

Окончание табл. 3

p2-4	0,9	2,6	0,3	5,1*	18,0	0,002	1,3	3,0	0,20	6,5*	22,0	0,001
p2-5	мономорфный											
p2-6	1,0	1,5	0,70	4,9*	12,6	0,002	1,3	2,0	0,38	6,3*	15,0	0,002
p2-7	1,0	0,3	0,68	4,9*	12,6	0,002	1,3	2,0	0,38	6,3*	15,0	0,002
p3-1	0,6	0,0	0,09	5,7	3,7	0,25	1,6	1,6	0,95	7,5	5,3	0,29
p3-2	0,1	1,1*	0,004	5,1	3,0	0,41	1,3	3,3*	0,04	6,6	6,3	0,92
p3-3	0,1	0,5	0,3	5,5	4,4	0,54	2,1	1,3	0,26	7,7	5,8	0,37
p3-4	0,4	0,0	0,6	4,8	0,0		1,6	0,0		6,5	0,0	
p3-5	мономорфный											
p3-6	мономорфный											
p3-7	0,4	0,0	0,5	4,3*	16,0	0,003	1,6	2,0	0,81	6,0*	18,0	0,01
p3-8	0,4	0,4	0,9	4,4	5,6	0,48	1,6	1,5	0,87	6,0	7,4	0,52
p4-1	мономорфный											
p4-2	0,7	1,7	0,23	5,9	4,1	0,15	1,3	1,2	0,81	7,4	5,5	0,19
p4-3	мономорфный											
p4-4	мономорфный											
p4-5	1,3	0,5	0,31	5,6	4,9	0,55	1,4	1,2	0,70	7,1	6,3	0,52

**Примечание:** \* — различия между носителями аллелей 1 и 0 достоверны.

Все полиморфные бэнды, идентифицированные с использованием праймера № 2, оказались ассоциированы с обилием метацеркарий *Opisthorchis felineus* в мышцах язей. Количество личинок было больше у обладателей доминантного аллеля «1» по локусу p2-2 и у обладателей рецессивного 0-аллеля по локусам p2-4, p2-6 и p2-7 ( $P < 0,05$ ). Суммарное количество трематод определяется количеством личинок описторхисов (по данным корреляционного анализа) и показывает такую же закономерность. Бэнды, синтезированные с использованием праймера № 4, не ассоциированы с трематодозной инвазией язя, а полученные с помощью праймера № 3 — ассоциированы с инвазией. У обладателей доминантного аллеля по локусу p3-7 было достоверно меньше метацеркарий *O. felineus* ( $P < 0,05$ ). У обладателей 0-аллеля локуса p3-2 было достоверно больше личинок *M. bilis* и *Ichthyocotylurus sp.* ( $P < 0,05$ ), чем у обладателей альтернативного аллеля «1». Интересно, что у плотвы бэнды, полученные с использованием 3-го праймера также были ассоциированы с инвазией *M. bilis*. Это может указывать на сходство генетических механизмов устойчивости разных видов карповых рыб к трематодозной инвазии.

В 5 случаях из 6 более инвазированы трематодами были язи с рецессивным аллелем ISSR-локуса, в 100% случаев повышенная инвазированность наблюдалась у носителей редкого аллеля. Это противоречит гипотезе [10] преимущества при инвазии хозяев с редкими биохимическими фенотипами. По нашему мнению, это может быть обусловлено естественным отбором против хозяев, наиболее инвазированных гельминтами, что и приводит к редкости аллеля. Критической паразитарной нагрузкой для язя является более 12 личинок *O. felineus* на 1 см<sup>2</sup> поверхности мышц.

Дисперсионный анализ выявил зависимость распределения аллелей от места отлова рыб по пяти локусам p2-2, p2-6, p3-1, p3-2 и p4-2 ( $P < 0,05$ ). Три из них (p2-2, p2-6, p3-2) были ассоциированы с трематодной инвазией. Это указывает

на пространственную сопряженность генетической структуры хозяина с устойчивостью к инвазии. Зависимость показателя зараженности от места отлова язя была достоверной только для одного из трех видов паразитов — *O. felineus* ( $F=6,02$ ,  $P<0,001$ ). Доминантные аллели локусов p2-4, p2-7 и p3-7, ассоциированные с инвазией *O. felineus*, распределялись независимо от географического фактора и могут служить маркерами устойчивости язя к описторхозу, а рецессивные 0-аллели — маркерами предрасположенности к инвазии.

Анонимность ISSR-PCR-маркеров, как и остальных RAPD-маркеров, в отличие от структурных генов с известной функцией, таких как изоферменты, не позволяет выяснить механизм устойчивости или восприимчивости к инвазии обладателя данного генотипа, и, по-видимому, не дает индивидуальных преимуществ в борьбе с паразитами. Однако легкость применения этого типа маркеров, универсальность праймеров, возможность вовлечения в анализ одновременно большого количества локусов делает их весьма перспективными для массового, популяционного анализа, позволяет проследить влияние паразитарного фактора на генетическую структуру популяций рыб.

**Выводы.** Таким образом, выявлена ассоциация генетических маркеров с предрасположенностью плотвы и язя к инвазии трематодами. Эти маркеры могут быть использованы для прогнозирования изменения напряженности паразитологической ситуации по актуальным трематодозам при изменении генетической структуры популяций рыб.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жигилева О.Н., Зеновкина Д.В., Ожирельев В.В. Зараженность метацеркариями трематод рыб семейства Карповых из рек Обь-Иртышского бассейна // Вестник Мордовского университета. Серия «Биологические науки». 2010. № 1. С. 170-174.
2. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6531-6535.
3. Zietjiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. P. 176-183.
4. Быховская-Павловская И.Е. Паразитологическое исследование рыб. Л.: Наука, 1985. 108 с.
5. Звягина В.В. Структурно-функциональные особенности метацеркарий *Opisthorchis felineus*; оптимизация способов обеззараживания и контроля рыбы, инвазированной личинками возбудителя описторхоза: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Тюмень, 1995. 16 с.
6. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.3. Паразитические многоклеточные. Ч. 2. Л.: Наука, 1987. 583 с.
7. Судариков В.Е., Шигин А.А., Курочкин Ю.В., Ламакин В.В., Стенько Р.П., Юрлова Н.И. Метацеркарии трематод — паразиты пресноводных гидробионтов Центральной России // Отв. ред. В.И. Фрезе. М.: Наука, 2002. 185 с.
8. Bender, W., Pierre, S., Hognes, D.S. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from Ace and rosy loci of bithorax complex in *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Biol. 1983. V. 168. P. 17-33.
9. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 1998.
10. Haldane, J.B.S. Disease and evolution // Ricerca Sci. Suppl. 1949. № 19. P. 68-76.