

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 575.89

**И.И. Брусенцов¹, И.В. Брусенцова¹, А.В. Катохин¹,
В.В. Беспрозванных², Н.Н. Семенченко³,
А.Э. Сазонов⁴, В.А. Мордвинов¹**

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск)

² Биолого-почвенный институт ДВО РАН (г. Владивосток)

³ Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
Хабаровский филиал (г. Хабаровск)

⁴ Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск)

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ КИТАЙСКОГО ПЕЧЕНОЧНОГО СОСАЛЬЩИКА (*Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875) НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 16.522.12.2006) и проекта № 19 Интеграция СО РАН.

Clonorchis sinensis относится к эпидемиологически значимым трематодам, так как способен паразитировать у человека, вызывая хроническое заболевание – клонорхоз. В России данный вид встречается только в бассейне р. Амур. В работе впервые исследуется генетическое разнообразие *C. sinensis* в российской части его ареала с использованием стандартного маркерного фрагмента ДНК – внутреннего транскрибируемого спейсера 1. Были проанализированы 52 особи из пяти отдаленных географических точек, расположенных в Хабаровском и Приморском краях. Полиморфизм маркерного фрагмента исследовался путем анализа данных секвенирования ДНК. Расчет стандартных статистических индексов показал низкое генетическое разнообразие *C. sinensis* на исследуемой территории. Значение индекса *Fst* свидетельствует о низкой степени дифференциации изученных популяций. Анализ распределения попарных нуклеотидных различий предполагает недавнее изменение численности вида. Выдвинуто предположение об относительно позднем заселении клонорхом Приморья в результате человеческих миграций.

Ключевые слова: популяционная генетика; филогеография; трематоды; *Clonorchis sinensis*; *Opisthorchiidae*.

Введение

Китайский печеночный сосальщик – паразитическая трематода из семейства *Opisthorchiidae*. Основной ареал вида приходится на страны Восточной и Юго-восточной Азии, в первую очередь Китай [1]. На территории

России паразит распространен только в бассейне р. Амур на Дальнем Востоке [2]. *C. sinensis*, как и его близкородственные виды *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) и *O. viverrini* (Poirier, 1886), паразитируя в желчных протоках окончательных хозяев – рыбообразных млекопитающих, включая человека [2], вызывает заболевание клонорхоз. В ряде случаев оно сопровождается тяжелыми осложнениями, в том числе холангиокарциномой. По данным Международного агентства по изучению рака (IARC) *C. sinensis* отнесен к канцерогенным факторам первой группы [3].

Первые оценки внутривидового генетического разнообразия *C. sinensis* были сделаны на основе результатов анализа нуклеотидного полиморфизма в ряде ядерных и митохондриальных маркеров у 3–4 особей из разных мест ареала [4, 5]. Кроме того, ранее для *ITS1* было выявлено два уровня внутривидовой вариабельности [6]. Однако, несмотря на большое эпидемиологическое значение этого паразитического вида, исследования его популяционной структуры до сих пор не проводились.

Популяционно-генетические исследования паразитических видов позволяют оценить степень их генетического разнообразия и имеют огромное значение в понимании процессов, проходящих в их популяциях в прошлом и в настоящее время. Понимание факторов, определяющих популяционно-генетическую структуру у трематод со сложным жизненным циклом, может иметь решающее значение для мероприятий, направленных на санитарно-эпидемиологический контроль трематодозов.

В настоящее время для популяционно-генетических исследований широко используются маркерные фрагменты ДНК (митохондриальные гены, *ITS1* и *ITS2*, микросателлитные последовательности), имеющие достаточную вариабельность, чтобы оценить генетическое разнообразие в природных популяциях и реконструировать филогеографию видов. *ITS1* является некодирующим участком в кластере рибосомальных генов и эволюционирует гораздо быстрее, чем последовательности собственно рибосомальных РНК, а также ядерных белок-кодирующих генов [7]. В результате высокой вариабельности *ITS1* часто используется для решения филогенетических и популяционных задач, в том числе и у трематод [8].

Цель работы – изучить генетическое разнообразие *C. sinensis* на российской части его ареала.

Материалы и методики исследования

Метацеркарии *C. sinensis* были собраны из мышечной ткани карповых рыб (Cyprinidae): голяна озёрного (*Phoxinus phoxinus*, Pallas, 1814), горчак обыкновенного (*Rhodeus sericeus*, *Rhodeus sericeus*, Pallas, 1776), желтощёка (*Elopichthys bambusa*, Richardson, 1845) и амурского чебачка (*Pseudorasbora parva*, Temminck и Schlegel, 1846), отловленных в трех гео-

графических точках: в Анученском (р. Арсеньевка) и Дальнереченском (р. Б. Уссурка) районах Приморского края и в г. Хабаровске (о. Б. Уссурийский, р. Амур) (рис. 1).



Рис. 1. Места сбора образцов *C. sinensis*. Вверху для каждого района показано количество проанализированных образцов

Из 26 образцов ДНК была выделена стандартным фенол-хлороформным методом [9]. Для ПЦР и секвенирования использовались следующие праймеры: прямой 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA и обратный 5'-ACAC-GAGCCGAGTGATCC с температурой отжига 59°C. ПЦР проводилась в общем объеме 20 мкл (250 мкМ dNTP, 25 мкМ dUTP, праймеры по 200 нМ каждого, 0,1 ед. урацил-ДНК-гликозилазы (Fermentas), 1,5 мМ MgCl₂, 1,5 ед.

TrueStart Hot Start Taq DNA polymerase (Fermentas) и соответствующий ей ПЦР буфер) при следующих условиях: 37°C – 5 мин, 94°C – 2 мин, 10 циклов: 94°C – 10 с, 69°C, декремент –1°C за цикл – 20 с, 72°C – 40 с, 20 циклов: 94°C – 10 с, 59°C – 20 с, 72°C – 40 с, финальная элонгация при 72°C – 5 мин. Секвенирование проводилось по методу Сэнгера с использованием BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA). Продукты реакции Сэнгера были проанализированы на приборе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Последовательности депонированы в Genbank (KC987514-539). Последовательность наиболее представленного гаплотипа находится в Genbank под номером KC987514.

Кроме полученных нами данных, мы также использовали 26 последовательностей фрагмента *ITS1 C. sinensis*, депонированных в Genbank с номером JQ048576-601 из Спасского (с. Кронштадтка) и Уссурийского (с. Кондратеновка) районов (см. рис. 1) [6]. Таким образом, для анализа была подготовлена выборка из 52 последовательностей; использовался фрагмент позиций 153–607 (JQ048601). Суммарно было охвачено 5 географических точек (см. рис. 1).

Расчет стандартных статистик генетического разнообразия и оценка демографической динамики вида были проведены с помощью программы DnaSP 4.5 [10]. Медианная сеть гаплотипов была построена методом median joining в программе Network 4.6 [11]. Степень дифференциации популяций рассчитана в программе Arlequin 3.5 [12].

Результаты исследования и обсуждение

Анализ нуклеотидного полиморфизма во фрагменте *ITS1* выявил низкое генетическое разнообразие у *C. sinensis* в Приморье. Анализируемый фрагмент был представлен двумя формами: 92,3% последовательностей имели 450 п.о., а 7,7% – 455 п.о. Различие последовательностей по длине объясняется разным количеством повторов (GCCTG). Было найдено всего 6 гаплотипов. Доля полиморфных позиций (S) составила 1,8% (8 пар оснований, из которых 5 приходится на инсерцию / делецию (И/Д)). Индекс генного (гаплотипического) разнообразия (H_d) – $0,21 \pm 0,05$, нуклеотидного (π) – $0,0006 \pm 0,0002$.

Далее мы провели оценку различий между 5 популяциями, использованными в анализе. Согласно S. Wright, полученное значение индекса F_{st} (0,045; $p = 0,059$) свидетельствует о низкой степени их дифференциации [13].

При построении сети гаплотипов было выявлено значительное преобладание одного (мажорного) гаплотипа, доля которого составила 88,5%. Из оставшихся 5 гаплотипов 3 были синглетными, т.е. встретились только у одной особи (рис. 2). Максимальное расстояние между гаплотипами составило 3 нуклеотидные замены и одну И/Д 5 оснований, т.е. оно является относительно большим для такой слабоструктурированной сети.

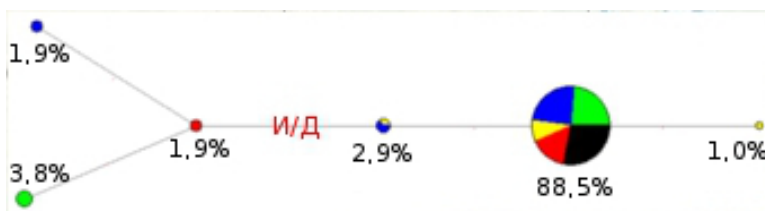


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов *C. sinensis*.

Указаны частоты гаплотипов в выборке, размер узла сети пропорционален частоте гаплотипа. Цветовая кодировка обозначает места сбора образцов и соответствует таковой на рис. 1

Таким образом, мы показали, что исследованная территории клонорха характеризуют:

- 1) низкое генетическое разнообразие;
- 2) низкие различия между популяциями;
- 3) бедная гаплотипическая сеть с преобладанием одного гаплотипа.

Наблюдаемую нами картину можно объяснить экспансией вида после переселения небольшой группы на новые территории («эффект основателя», когда происходит снижение разнообразия и случайное смещение частот гаплотипов) или после прохождения видом «узкого бутылочного горлышка» на занимаемой им ранее территории. Формирование подобной структуры под действием отбора (преобладание одного гаплотипа вследствие его приспособительного преимущества) можно исключить, поскольку *ITS1* считается селективно нейтральным участком ДНК.

Многие виды палеоарктической зоны претерпели снижение численности в результате геоклиматических событий плейстоцена с последующей экспансией из небольшой предковой группы, сохранившейся в убежищах (рефугиумах) [14]. В нашей работе, посвященной *O. felineus*, было показано крайне низкое разнообразие вида на огромной территории и высказано предположение о восстановлении этого вида из популяции с низкой численностью и бедным генофондом [15]. Напротив, у другого близкородственного вида *O. viverrini*, ареал которого ограничен бассейном р. Меконг в тропических широтах, было показано высокое генетическое разнообразие и наличие разветвленной сети гаплотипов [16]. К сожалению, фактически нет работ, исследующих генетическое разнообразие клонорха на территории его обширного ареала, приходящегося как на умеренную, так и на субтропическую климатические зоны.

Для подтверждения гипотезы об экспансии вида мы провели оценку динамики численности *C. sinensis* на российской части ареала с помощью анализа распределения попарных нуклеотидных различий. Было получено унимодальное L-образное распределение замен (рис. 3), что позволяет предположить недавнее изменение численности вида на российской части его ареала. Этот анализ также позволяет оценить параметр τ ($\tau = 2ut$; t – время,

рассчитанное в поколениях; u – скорость накопления мутаций в последовательности за поколение). Для шистосом (*Schistosomatidae*, *Trematoda*) было показано, что скорость накопления мутаций составляет 0,8% за миллион лет [17]. Используя данные С.А. Беэра о том, что смена поколений у близкородственного вида *O. felineus* происходит за один год, мы приняли такую же оценку для *C. sinensis* [18] и рассчитали, что изменение численности *C. sinensis* на изучаемой территории началось порядка 4,5 тыс. лет назад.

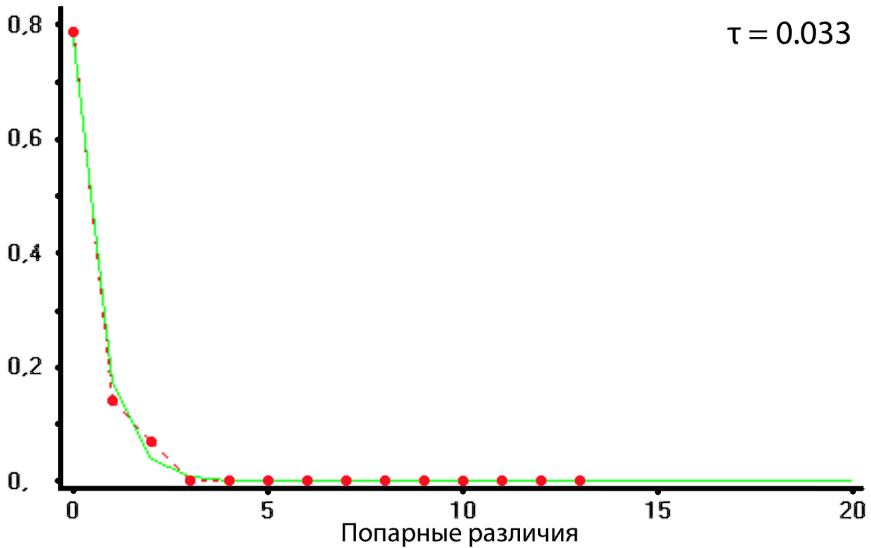


Рис. 3. Распределение попарных нуклеотидных различий. Зеленая сплошная линия – значения, ожидаемые для модели растущей популяции, красная пунктирная – полученные нами значения

Во время плейстоценовых похолоданий климат на изучаемой территории был значительно холоднее современного. Несмотря на отсутствие ледового щита, повсеместно встречались участки вечной мерзлоты, и долины были заболочены [19]. Таким образом, условия были непригодны для существования *C. sinensis*. Поскольку основной современный ареал *C. sinensis* расположен на территории Китая, то логично предположить, что заселение изучаемой территории произошло именно оттуда по завершению ледникового периода. Однако на пути естественной миграции из Восточной Азии на Дальний Восток России присутствует географический барьер – Малый Хинган и Маньчжуро-Корейские горы, являющиеся серьезным препятствием для диких животных [20, 21]. Поскольку данные археологических раскопок свидетельствуют о появлении активных миграций человеческих племен на территории Маньчжурии начиная с 6,5 тыс. лет назад, можно предположить, что основную роль в заселении Приморья клонорхом мог сыграть человек [22].

Заключение

Таким образом, показано низкое генетическое разнообразие *C. sinensis* на изучаемой территории. Филогеографический анализ вида позволил предположить, что подобная картина могла сформироваться вследствие недавнего проникновения вида на Дальний Восток России, имевшего место приблизительно 4,5 тыс. лет назад и предположительно связанного с миграциями человека.

Литература

1. *Посохов П.С.* Клонорхоз в Приамурье. Хабаровск : Изд-во Дальневосточ. гос. мед. ун-та, 2004. 187 с.
2. *Беспрозванных В.В., Ермоленко А.В., Румянцева Е.Е. и др.* Нозоареалы клонорхоза в Приморском крае // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2012. № 2. С. 7–14.
3. *Bouvard V., Baan R., Straif K. et al.* A review of human carcinogens--Part B: biological agents // The lancet oncology. 2009. Vol. 10, № 4. P. 321–322.
4. *Lee S., Huh S.* Variation of nuclear and mitochondrial DNAs in Korean and Chinese isolates of *Clonorchis sinensis* // The Korean journal of parasitology. 2004. Vol. 42, № 3. P. 145–148.
5. *Park G-M.* Genetic comparison of liver flukes, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*, based on rDNA and mtDNA gene sequences // Parasitology research. 2007. Vol. 100, № 2. P. 351–357.
6. *Tatonova Y., Chelomina G., Besprosvannykh V.* Genetic diversity of nuclear ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence in *Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875 (Trematoda: Opisthorchidae) from the Russian Far East // Parasitology international. 2012. Vol. 61, № 4. P. 664–674.
7. *Hwang U.W., Kim W.* General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics // The Korean journal of parasitology. 1999 Vol. 37. P. 215–228.
8. *Nolan M., Cribb T.* The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species // Advances in parasitology. 2005. Vol. 60, № 2. P. 101–163.
9. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2344 p.
10. *Rozas J., Sánchez-DelBarrio J., Messeguier X., Rozas R.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods // Bioinformatics (Oxford, England). 2003. Vol. 19, № 18. P. 2496–2497.
11. *Bandelt H., Forster P., Röhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Molecular biology and evolution. 1999. Vol. 16, № 1. P. 37–48.
12. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis // Evolutionary bioinformatics online. 2005. Vol. 1. P. 47–50.
13. *Wright S.* Evolution and Genetics of Population. Chicago : University of Chicago Press, 1978. 590 p.
14. *Hewitt G.* Post-glacial re-colonization of European biota // Biological Journal of the Linnean Society. 1999. Vol. 68, № 1–2. P. 87–112.
15. *Brusentsov I.I., Katokhin A.V., Brusentsova I.V. et al.* Low Genetic Diversity in Wide-Spread Eurasian Liver Fluke *Opisthorchis felinus* Suggests Special Demographic History of This Trematode Species // PloS one. 2013. Vol 8(4). e62453.

16. *Thaenkham U., Nuamtanong S., Sa-nguankiat S. et al.* Monophyly of *Opisthorchis viverrini* populations in the lower Mekong Basin, using mitochondrial DNA nad1 gene as the marker // *Parasitology international*. 2010. Vol. 59. P. 242–247.
17. *Despres L., Imbert-Establet D., Combes C., Bonhomme F.* Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiation of schistosomes (Platyhelminthes: Trematoda) // *Molecular phylogenetics and evolution*. 1992. Vol. 1, № 4. P. 295–304.
18. *Безр С.А.* Биология возбудителя описторхоза. М. : Тов-во науч. изд. КМК, 2005. 336 с.
19. *Белянин П.* Растительность междуручья рек Уссури и Сунгач в позднем плейстоцене (Приморский край). Актуальные проблемы палеогеографии и стратиграфии плейстоцена. М. : Географ. факультет МГУ, 2010. С. 14.
20. *Driscoll C., Yamaguchi N., Bar-Gal G. et al.* Mitochondrial phylogeography illuminates the origin of the extinct caspian tiger and its relationship to the amur tiger // *PloS one*. 2009. Vol. 4, № 1. P. e4125.
21. *Shi Y., Cui Z., Li J.* Reassessment of Quaternary glaciation problems in East China. *Earth Sciences 2* / ed. by G. Tu // *Advances in Science of China: Earth Sciences*. 1987. P. 45–54.
22. *Вострецов Ю.* Приморские охотники-собиратели и земледельцы бассейна Японского моря: адаптация и взаимодействие в среднем и позднем голоцене (6500–1800 лет назад) : автореф. дис. ... д-ра ист. наук. СПб., 2010. 64 с.

Поступила в редакцию 15.06.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 91–99

**Илја И. Брусенцов¹, Ирина В. Брусенцова¹, Алексей В. Катохин¹,
Владимир В. Беспрозванный², Надежда Н. Семенченко³,
Алексей Е. Сазовов⁴, Виatchesлав А. Мордвинов¹**

¹*Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

²*Institute of Biology and Soil Science of the Far Eastern Branch
of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia*

³*Pacific Research Fisheries Centre, Khabarovsk, Russia*

⁴*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

POPULATION GENETIC ANALYSIS AND PHYLOGEOGRAPHY OF CHINESE LIVER FLUKE (*Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875) FROM THE RUSSIA

This work was partially supported by the Ministry of education and science of Russia project № 16.522.12.2006 and the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (interdisciplinary integration project № 19 and 52).

*In the present work, genetic diversity and phylogeography of the Far Eastern population of the liver fluke *Clonorchis sinensis* has been studied using nuclear rDNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. *C. sinensis* is a causative factor of serious pathologies in humans. It is widely distributed in East Asia, but in Russia it is only found in the Far East. 26 metacercarian samples were collected at three distant localities in Khabarovsk and Primorsky Krai and were subjected to ITS1 sequencing. We also used 26 ITS1 sequences of *C. sinensis* from Primorsky Krai (two localities), which were previously deposited in GenBank. Statistical analysis was performed using the program DnaSP 4.5 and Arlequin 3.5. The median haplotype network was*

constructed by median joining using Network 4.6. Standard statistics showed low genetic diversity in the studied population: S , the number of polymorphic positions was 1.8%; Hd , haplotype diversity, was 0.21 ± 0.05 ; and π , nucleotide diversity, was 0.0006 ± 0.0002 . The obtained value of F_{st} was 0.045, which is indicative of low genetic differentiation.

To establish the genealogical relationships between the haplotypes, we constructed a statistical parsimony network. It was found out that one major haplotype was identified in 88.5% of the sampled individuals. Of other five haplotypes, three were unique (singlets). The maximum distance between haplotypes was 3 SNP and one indel (5 substitutions). To estimate the population dynamics of *C. sinensis* in Russian part of the area, the analysis of pairwise nucleotide differences distribution was conducted. Unimodal mismatch distribution suggests a recent change in population size. Therefore, we believe that our data are consistent with a "founder effect" hypothesis, when a small number of migrants that were not genetically representative of the ancestral population have colonized a new area. To estimate the expected time of the species expansion, we used substitution rate (0.8%/MY) previously established for *Schistosoma* species (*Schistosomatidae*, *Trematoda*). Based on these data, *C. sinensis* expansion began approximately sooner than 4.5 kBP. We conclude that the outspread of the studied species to the Russian Far East territory could be due to the Holocene migration of the final hosts including humans.

Key words: population genetics; phylogeography; *Trematoda*; *Clonorchis sinensis*; *Opisthorchiidae*.

Received June 15, 2013