

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Молекулярно-генетические подходы к видовой идентификации паразитических плоских червей рода *Ligophorus* (Monogenea), обитающих на лобане

Е.А. Водясова¹✉, Э.С. Челебиева¹, О.В. Шихат¹, Д.М. Атопкин², Е.В. Дмитриева¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук», Севастополь, Россия

² Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, Дальневосточное отделение Российской академии наук, Владивосток, Россия

✉ eavodiasova@gmail.com

Аннотация. *Mugil cephalus* L., 1758 (лобан) – ценная промысловая рыба и перспективный объект разведения в бассейнах Черного и Азовского морей. Изучение его паразитофауны крайне важно для рыбного промысла и марикультуры. Одними из массовых эктопаразитов, обитающих на жабрах кефалевых, являются моногенеи рода *Ligophorus*. На лобане в Азово-Черноморском регионе паразитируют два представителя этого рода: *Ligophorus mediterraneus* Sarabeev, Balbuena et Euzet, 2005 и *Ligophorus cephalis* Rubtsova, Balbuena, Sarabeev, Blasco-Costa et Euzet, 2006. Морфологическое определение этих видов весьма трудоемко и требует высокого уровня квалификации. Для быстрого и точного различия двух названных видов паразитов нами разработан метод, основанный на ПЦР переменных участков рибосомного гена 28S. Данный ген широко используется для молекулярной таксономии рода *Ligophorus*. В настоящей работе применялись три подхода: анализ длины амплифицированных фрагментов, аллель-специфичная ПЦР с детекцией в конечной точке и аллель-специфичная ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. Первый подход заключался в подборе праймеров для получения ПЦР-продуктов различной длины, которые были характерны для *L. mediterraneus* или *L. cephalis*. Этот подход был осуществлен благодаря наличию нескольких переменных локусов, которые находятся на расстоянии друг от друга. ПЦР-смесь содержала три праймера: один прямой и два обратных. Прямой праймер был комплементарен консервативному участку, который не различался между видами. Обратные праймеры были видоспецифичны, при этом для каждого вида они были комплементарны различным участкам ДНК, которые расположены на удалении 100 п. н. друг от друга. В результате *L. mediterraneus* характеризовался более короткими ампликонами, чем *L. cephalis*. Для второго и третьего подхода конструировалась пара праймеров по следующему принципу: прямой праймер был комплементарен обоим видам, так как подбирался к консервативному участку гена. Обратные праймеры были видоспецифичными и разрабатывались к переменному участку 28S. На этом участке два вида паразита различались тремя точечными мутациями. Таким образом, одна пара праймеров была комплементарна *L. mediterraneus*, вторая – *L. cephalis*. Анализ длины амплифицированных фрагментов и аллель-специфичная ПЦР в реальном времени продемонстрировали 100 % совпадение результатов генотипирования при сравнении с морфологической идентификацией и секвенированием по Сэнгеру. Разработанные протоколы генотипирования могут быть использованы не только для различия обитающих на лобане двух видов *Ligophorus* при экологических исследованиях и в ветеринарной практике, но и для последующей разработки подобных методов для других моногеней, среди которых много патогенных видов.

Ключевые слова: генотипирование; аллель-специфичная ПЦР; Monogenea; *Ligophorus*; *Mugil cephalus*.

Для цитирования: Водясова Е.А., Челебиева Э.С., Шихат О.В., Атопкин Д.М., Дмитриева Е.В. Молекулярно-генетические подходы к видовой идентификации паразитических плоских червей рода *Ligophorus* (Monogenea), обитающих на лобане. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(3):290-297. DOI 10.18699/VJGB-22-36

Molecular-genetic approaches to species identification of platyhelminthes of the genus *Ligophorus* (Monogenea) parasitising flathead mullet

Е.А. Vodiasova¹✉, E.S. Chelebieva¹, O.V. Shikhat¹, D.M. Atopkin², E.V. Dmitrieva¹

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

² Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

✉ eavodiasova@gmail.com

Abstract. *Mugil cephalus* L., 1758 (flathead mullet) is a valuable commercial fish and a promising object of artificial breeding in the Black Sea and the Sea of Azov, and the study of its parasite fauna is important for fishery and mariculture. Monogeneans of the genus *Ligophorus* are common ectoparasites dwelling on the gills of mullets. Two representatives of this genus parasitise flathead mullet in the Azov-Black Sea region, namely *Ligophorus*

mediterraneus Sarabeev, Balbuena et Euzet, 2005 and *Ligophorus cephalis* Rubtsova, Balbuena, Sarabeev, Blasco-Costa et Euzet, 2006. Morphological identification of these species requires spending much time and a high level of experience in monogenean taxonomy. For quick and correct species identification of these parasites, we have developed a genotyping approach based on the polymerase chain reaction of allele-specific gene sites for various Monogenea species. A fragment of the 28S ribosomal gene, which includes conserved and variable sites, was chosen as a genetic marker. Three approaches were used as follows: amplified fragment length analysis, allele-specific PCR with endpoint detection and allele-specific real-time PCR using SYBR Green intercalating dye. The first approach was by obtaining PCR products of different lengths that were specific either to *L. mediterraneus* or to *L. cephalis*. This approach was implemented due to the presence of several variable sites located at a distance from each other. The PCR mixture contained three primers: one forward and two reverse. The forward primer was complementary to the conserved site, which did not differ between species. Reverse primers were species-specific and, for each species, they were complementary to different DNA regions located 100 bp apart. As a result, *L. mediterraneus* was characterized by shorter amplicons than *L. cephalis*. For the second and third approaches, a pair of primers was designed according to the following principle: the forward primer was complementary to both species, since it was selected for the conserved gene region. Reverse primers were species-specific and were designed for the 28S variable region. The two parasite species were distinguished by three-point mutations. Thus, one pair of primers was complementary to *L. mediterraneus*, the other, to *L. cephalis*. The amplified fragment length analysis and the allele-specific real-time PCR demonstrated 100 % coincidence of genotyping results compared with Sanger sequencing. The developed genotyping protocols can be used not only to distinguish two species of *Ligophorus* from flathead mullet in ecological studies and veterinary practice but also for further development of similar approaches for other monogeneans, among which there are many pathogenic species.

Key words: genotyping; allele-specific PCR; Monogenea; *Ligophorus*; *Mugil cephalus*.

For citation: Vodiasova E.A., Chelebieva E.S., Shikhat O.V., Atopkin D.M., Dmitrieva E.V. Molecular-genetic approaches to species identification of platyhelminthes of the genus *Ligophorus* (Monogenea) parasitising flathead mullet. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):290-297. DOI 10.18699/VJGB-22-36

Введение

Моногенеи (Platyhelminthes: Monogenea) – паразиты, преимущественно рыб, имеющие прямой жизненный цикл. Каждый год описывают десятки новых таксонов этих паразитов. Их разнообразие достигло 5000 видов (Vanhove, 2013), и многие имеют эпизоотическое значение (Cribb et al., 2002; Bakke et al., 2007; Rubio-Godoy, 2007). Границы большинства видов установлены на основании морфологических критериев, а для видовой идентификации используются главным образом форма и размеры структур прикрепительного диска (Yamaguti, 1963; Гусев и др., 1985; Pugachev et al., 2009; Vignon, 2011; Strona et al., 2014; Kalafi et al., 2016). Однако эти структуры имеют высокую внутривидовую изменчивость (Ergens, Gelnar, 1985; Caltran et al., 1995; Dmitrieva, Dimitrov, 2002; Olstad et al., 2009; Mladineo et al., 2013). Последнее существенно затрудняет определение видовой принадлежности моногеней, а также ставит вопрос об установлении рамок их внутри- и межвидовой изменчивости. Сопоставление с реальными коллекционными образцами для подтверждения определения часто осложнено из-за труднодоступности коллекций с типовыми материалами. Сравнение организмов с множеством «похожих» видов из разных районов по кратким описаниям и порой неточным рисункам далеко не всегда позволяет достоверно определить вид. В результате увеличение числа «ложных» и недооценка «скрытых» видовых таксонов могут приводить к неправильному пониманию филогенеза, разнообразия и распространения представителей отдельных групп моногеней (Poiso et al., 2011), а иногда к проблемам с определением статуса патогенных видов, как, например, в случае с *Gyrodactylus salaris* и *G. thymalli* (Fromm et al., 2014; Mieszkowska et al., 2018).

В связи с вышесказанным разработка подходов и методов, позволяющих максимально точно идентифицировать виды моногеней, остается актуальной задачей как в теоретическом, так и в практическом плане. Одним из перспективных направлений в молекулярно-генетических исследованиях паразитов является разработка методов генотипирования видов и внутривидовых локальных группировок, как для целей исследования биоразнообразия отдельных таксонов, так и для целей экспресс-диагностики видов и их популяций (Токарев и др., 2015). В отношении моногеней такие работы единичны (Fromm et al., 2013, 2014; Mieszkowska et al., 2018), при этом в нескольких статьях рассматриваются проблемы ДНК-баркодинга видов моногеней (Littlewood, 2008; Vanhove, 2013). Молекулярные исследования моногеней рода *Ligophorus* Euzet et Suriano, 1977 ограничены несколькими работами, по результатам которых в базе GenBank NCBI размещено 135 последовательностей рибосомного кластера яДНК (на 27.11.2021). Фрагменты 18S, ITS1, 5.8S и 28S получены для 12 видов из Средиземного моря и двух видов из Черного моря (Blasco-Costa et al., 2012; Rodríguez-González et al., 2015). Для двух видов у побережья Бразилии секвенированы 18S, ITS1, 5.8S и 28S (Marchiori et al., 2015), а для 14 видов из Индийского океана получены фрагменты 18S, 28S и ITS1 (Soo et al., 2015; Khang et al., 2016; Pakdee et al., 2019). В ряде исследований (Blasco-Costa et al., 2012; Rodríguez-González et al., 2015; Khang et al., 2016) проводилось сравнение морфологической и генетической изменчивости, показавшее большую степень конгруэнтности между филогенетическими реконструкциями, основанными на этих данных, что позволяет предполагать перспективность применения последовательностей рибосомного кластера для генотипирования видов этого рода.

Лобан *Mugil cephalus* L., 1758 относится к промысловым рыбам Черного и Азовского морей, а также перспективным объектам марикультуры в регионе, поэтому изучение его паразитофауны крайне важно не только с научной, но и с практической стороны. Моногенеи рода *Ligophorus*, обитающие на жабрах кефалевых, являются для лобана одними из массовых эктопаразитов. В Азово-Черноморском регионе на лобане регистрируются *L. mediterraneus* Sarabeev, Balbuena et Euzet, 2005 и *L. cephalis* Rubtsova, Balbuena, Sarabeev, Blasco-Costa et Euzet, 2006, имеющие морфологически сходные прикрепительные структуры (Dmitrieva et al., 2009a, b), что затрудняет их видовое определение. В то же время данные виды имеют хороший уровень генетической дивергенции по рибосомным генам 28S и ITS1 (Blasco-Costa et al., 2012). Такое расхождение обусловлено одиночными нуклеотидными заменами, которые характерны для *L. cephalis* и *L. mediterraneus*. При оценке зараженности этими видами больших выборок рыб, например при выполнении экологических исследований или при ветеринарно-санитарных обследованиях, использование морфологических признаков затруднительно, а секвенирование с последующим проведением молекулярной таксономии занимает много времени и требует больших финансовых затрат. Кроме того, на одной особи кефали могут паразитировать до восьми видов *Ligophorus* (Dmitrieva et al., 2012; Soo et al., 2015). Эта ситуация не уникальна, она встречается в отношении видов одного рода у многих представителей семейства Dactylogyridae, к которым относятся и лигофорусы.

С появлением ПЦР в реальном времени стали создавать альтернативные подходы для генотипирования, основанные на аллель-специфической ПЦР, которые позволяют быстро и надежно провести видовую идентификацию. Однако для представителей семейства Dactylogyridae эти подходы не использовались. Таким образом, нашей целью было разработать экспресс-методику, с помощью которой можно различить два вида моногеней *L. cephalis* и *L. mediterraneus*, паразитирующих на лобане в Азово-Черноморском регионе, на основе изменчивости гена 28S. Учитывая, что многие представители Dactylogyridae имеют эпизоотическое значение, разработка простых и недорогих методов экспресс-генотипирования видов этого таксона для различия патогенных и непатогенных видов, в том числе на стадии личинки, актуальна и в практическом смысле.

Материалы и методы

Сбор материала. Материалом для работы послужили 20 экземпляров моногеней рода *Ligophorus*, собранных с жабр трех особей *Mugil cephalus* осенью 2019 г. в Черном море у побережья Крыма, в Балаклавской бухте. Червей собирали живыми, из части особи подготавливали глицерин-желатиновый препарат (Гусев, 1983) для идентификации видов по морфологии структур прикрепительного диска, другую часть этой же моногенеи фиксировали в 96 % этаноле для молекулярно-генетических исследований.

Таксономическая идентификация. Видовое определение проводили по форме и размерам срединных крючков и соединительных пластинок моногеней с использованием микроскопа Olympus CX41 и фазово-контрастной

оптики при увеличении $\times 800$ – 2000 на основе описаний видов *Ligophorus* от черноморских кефалей (Dmitrieva et al., 2009a, b). Измерения и фотографирование осуществляли с помощью программы для обработки цифровых изображений CellSense.

Выделение ДНК и молекулярно-генетический анализ. Выделение проводили с использованием набора «ДНК-экстран» (ООО «Синтол», Россия). Каждую особь инкубировали в 100 мкл лизирующего буфера (ООО «Синтол») с 5 мкл протеиназы К (ООО «Синтол») и 1 мкл 2-меркаптоэтанола при температуре 56 °С в течение 3 ч. После лизирования пробы встряхивали 20 с и дальнейшее выделение ДНК выполняли согласно рекомендациям производителя. Элюцию ДНК проводили в 30 мкл. Выделенную ДНК хранили при –20 °С.

Для молекулярной таксономии вида в качестве генетического маркера был выбран рибосомный ген 28S, который используется при анализе данного рода (Blasco-Costa et al., 2012; Soo et al., 2015; Pakdee et al., 2019). Фрагмент гена 28S амплифицировали с помощью праймеров U178 (5'-GCACCCGCTGAAУТТАAG-3') и LSU1200R (5'-GCATAGTTCACCATCTTTCCGG-3') (Littlewood et al., 2000; Lockyer et al., 2003) по следующему протоколу: предварительная денатурация при 95 °С в течение 3 мин; затем 38 циклов (денатурация при 94 °С – 40 с, отжиг при 56 °С – 30 с, синтез при 72 °С – 45 с). Каждую ПЦР-реакцию выполняли в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1–10 нг матричной ДНК, по 0.4 мкМ каждого праймера, 5x ПЦР-смесь ScreenMix с Taq-полимеразой (ООО «Евроген», Россия). Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1 % агарозном геле, окрашиванием бромидом этидия и визуализацией в ультрафиолетовом свете. ПЦР-продукты секвенировали в обоих направлениях с помощью стандартного набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc.). Полученные фрагменты 28S выравнивали в программе BIOEDIT (Hall, 1999), *L. mediterraneus* (JN996829, JN996828, JN996827) и *L. cephalis* (JN996830) выбрали в качестве референсных последовательности. Все нуклеотидные последовательности, полученные в ходе этого исследования, депонированы в международный банк генетических данных GenBank: *L. mediterraneus* (MZ413895–MZ413898) и *L. cephalis* (MZ413887–MZ413893).

Подбор праймеров для генотипирования *L. mediterraneus* и *L. cephalis*. Анализ фрагмента рибосомного гена 28S не выявил внутривидовой изменчивости по данному генетическому маркеру. Все нуклеотидные последовательности для каждого вида моногеней с лобана как из Средиземного моря (JN996829, JN996828, JN996827, JN996830), так и из Черного моря (данная работа) были идентичны. Всего было проанализировано семь последовательностей фрагмента 28S для *L. mediterraneus* и восемь последовательностей для *L. cephalis*. В то же время обнаружено несколько участков, имеющих характерные для *L. mediterraneus* и *L. cephalis* мутации в районе 450–480, 540–570 и 680–705 п. н. (рис. 1).

Для генотипирования отбирали те области ДНК, которые различались минимум на три нуклеотидные замены между двумя видами. Подбор праймеров, фланкирующих

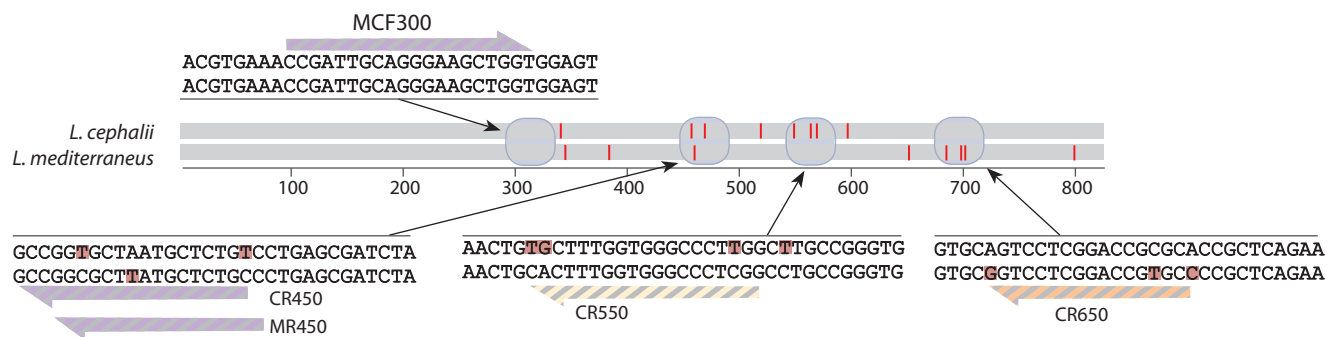


Рис. 1. Консервативные и полиморфные участки рибосомного гена 28S для *L. mediterraneus* и *L. cephalii*.

Таблица 1. Последовательности разработанных праймеров, используемых для генотипирования

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'	Температура плавления, °C
MCF300	AAACCGATTGCAGGGAAGCTGG	59.8
CR450	GGACAGAGCATTAGCACCGGC	60.0
MR450	GGCAGAGCATAAGCGCCG	60.7
CR550	AGCCAAGGGCCACCAAAGCA	63.4
CR650	GTGCGCGTCCGAGGACT	61.5

Таблица 2. Использование разработанных праймеров в зависимости от выбранного метода генотипирования

Метод	Праймер		Длина фрагмента, п. н.	Вид
	прямой	обратный		
Анализ длин ПЦР-продукта	U178	MR450	630	<i>L. mediterraneus</i>
		CR550	750	<i>L. cephalii</i>
	U178	MR450	630	<i>L. mediterraneus</i>
		CR650	880	<i>L. cephalii</i>
Аллель-специфическая ПЦР в конечной точке	U178	MR450	630	<i>L. mediterraneus</i>
		CR450	630	<i>L. cephalii</i>
Аллель-специфическая ПЦР в режиме реального времени	MCF300	MR450	170	<i>L. mediterraneus</i>
		CR450	170	<i>L. cephalii</i>

полиморфные регионы, производился с использованием интернет-ресурса <https://benchling.com/>. Разработанные праймеры представлены в табл. 1.

Все обратные праймеры были протестированы на уровень идентичности к другим видам с помощью алгоритма blastn по генетической базе данных NCBI. Проверка была только для обратных праймеров, так как именно они обуславливают определение вида. По результатам праймеры CR450 и CR550 показали 100 % идентичность при 100 % покрытии только к виду *L. cephalii*. Праймер MR450 кроме 100 % идентичности к *L. mediterraneus* продемонстрировал такую же идентичность к виду *L. saladensis* (номер GenBank KF442629). Данный вид встречается только у берегов Бразилии и обитает на другом хозяине – *Mugil liza*. Схожая ситуация и с прай-

мером CR650: помимо 100 % идентичности с *L. cephalii*, обнаружена 100 % идентичность с *L. heteronchus* (номер GenBank JN996812). Этот паразит тоже обитает на другом хозяине – *Planiliza saliens*. Таким образом, среди всех известных паразитов лобана разработанные нами праймеры позволяют идентифицировать два вида – *L. mediterraneus* и *L. cephalii*, что дает возможность использовать их не только в Азово-Черноморском бассейне.

Анализ длин амплифицированных фрагментов. Для генотипирования на основе анализа различных длин ампликонов было выбрано два варианта смеси праймеров. В первом случае длины ампликонов, характерные для *L. mediterraneus* и *L. cephalii*, различались на 120 нуклеотидов, во втором – на 250 нуклеотидов (табл. 2). Суть разработанного нами подхода заключается в следующем.

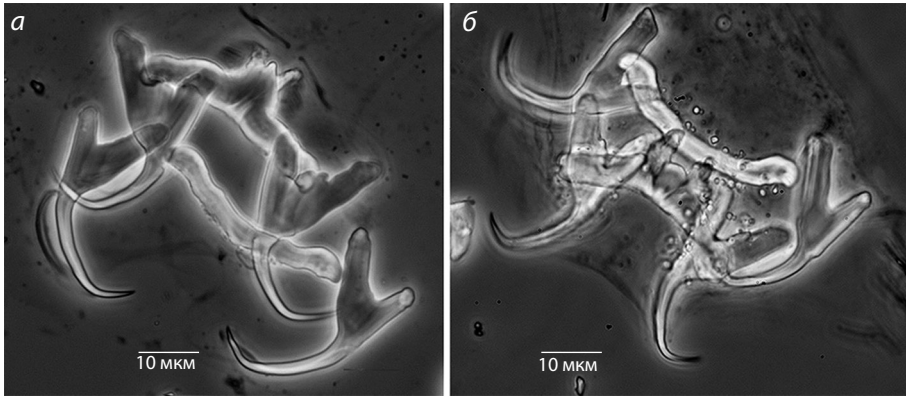


Рис. 2. Структуры прикрепительных дисков моногеней *L. cephalis* (а) и *L. mediterraneus* (б), собранных с жабр лобана *Mugil cephalus* в Черном море у побережья Крыма.

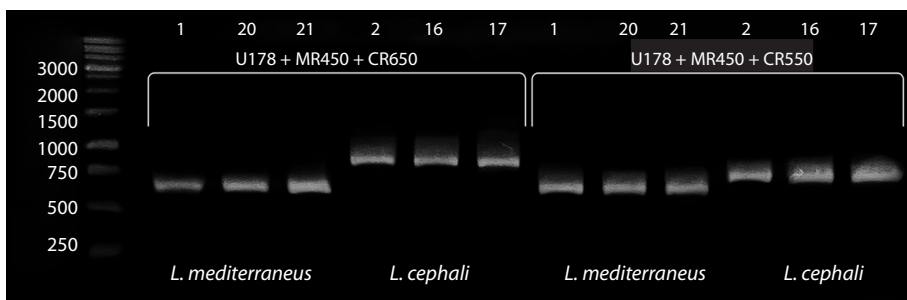


Рис. 3. Типирование образцов ДНК при помощи анализа длины амплифицированных фрагментов. Здесь и на рис. 4: вверху указаны номера исследуемых особей и используемая смесь праймеров, внизу – вид, который был определен на основе морфологии и молекулярной таксономии.

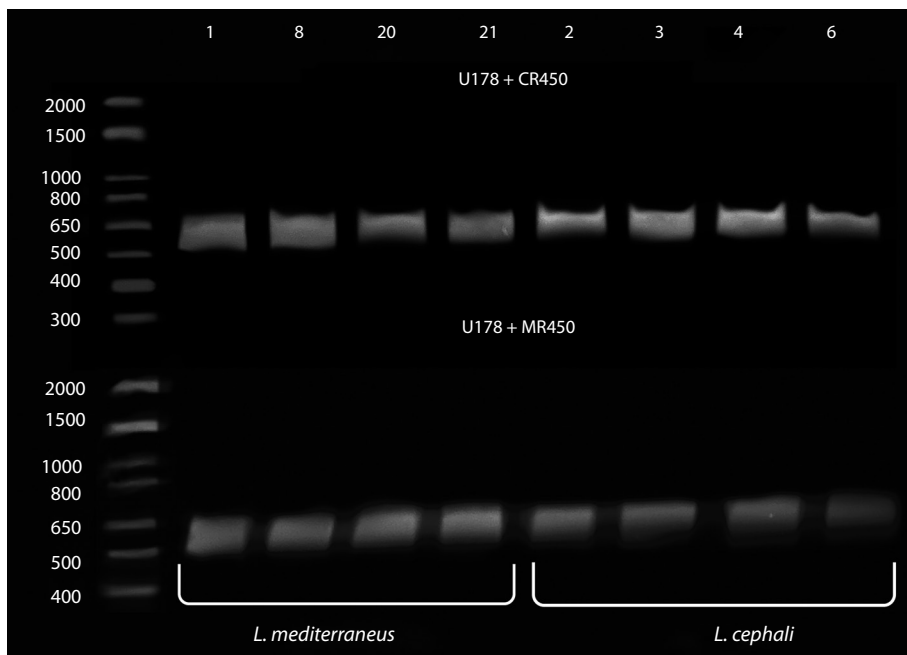


Рис. 4. Типирование образцов ДНК при помощи аллель-специфичной ПЦР с детекцией в конечной точке.

В ПЦР-смесь добавляются не два праймера (как при традиционной ПЦР), а три. Один праймер (прямой, U178) является комплементарным консервативному участку 28S и, соответственно, будет отжигаться у обоих видов. Вторым праймер (обратный) разрабатывали для участка, который различается между двумя видами

на несколько мутаций. В данной смеси это праймер MR450, который комплементарен последовательности, характеризующей вид *L. mediterraneus*. Третий праймер (обратный, CR550 или CR650) также разрабатывали для участка, который различается между двумя видами на несколько мутаций, но комплементарен *L. cephalis*.

Таким образом, в зависимости от матрицы ДНК будет происходить отжиг и наработка продукта с участием только одного из двух обратных праймеров. Обратные праймеры подобраны таким образом, что в случае отжига MR450 будет нарабатываться продукт длиной 630 п.н., а при отжиге другого обратного праймера длина ампликона будет длиннее. Так, при использовании праймера CR550 длина составит 750 п.н., а при использовании CR650 – 880 п.н. В результате постановки ПЦР-реакции с тремя праймерами можно различить два вида лигофорусов, основываясь на длине ампликонов.

Соотношение в ПЦР-смеси и условия амплификации были одинаковыми в обоих вариантах. Объем реакционной смеси 20 мкл. Конечная концентрация каждого праймера (ООО «Евроген», Россия) 0.25 мкМ. Амплификация проходила по следующему протоколу: предварительная денатурация при 95 °C – 3 мин, затем 38 циклов (денатурация при 94 °C – 40 с, отжиг при 56 °C – 30 с, синтез при 72 °C – 45 с). Детекцию продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, окрашиванием бромидом этидия и визуализацией в ультрафиолетовом свете. Для видов моногеней была характерна своя длина ампликона, которая указана в табл. 1.

Аллель-специфичная ПЦР в конечной точке и ПЦР в реальном времени. Генотипирование на основе аллель-специфичной ПЦР с детекцией ПЦР-продукта в конечной точке, как и в режиме реального времени, проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл. Конечная концентрация каждого праймера (ООО «Евро-

ген», Россия) составляла 0.2 мкМ. Используемые пары праймеров для каждого подхода указаны в табл. 2. Амплификация с детекцией ПЦР-продукта в конечной точке проходила по такому же протоколу, как и для анализа длин амплифицированных фрагментов.

При тестировании метода генотипирования с помощью аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени каждый образец анализировали в трех повторностях. Объем и состав реакционной смеси не менялся, тогда как условия амплификации были изменены: предварительная денатурация при 95 °С – 3 мин и затем 40 циклов (денатурация при 95 °С – 10 с, отжиг при 60 °С – 10 с, синтез при 72 °С – 30 с). В конце анализировали кривую плавления для оценки образования димеров праймеров.

Результаты и обсуждение

Морфологическая идентификация видов

Среди 20 собранных особей по морфологии идентифицировано два вида (рис. 2): 9 экземпляров *L. cephalis* (пробы № 2, 3, 4, 6, 7, 10, 16, 17, 19) и 11 экземпляров *L. mediterraneus* (пробы № 1, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 21).

Идентификация видов

с помощью различных методов генотипирования

Для всех 20 особей проводился морфологический анализ, с помощью которого были идентифицированы виды моногеней. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей фрагмента рибосомного гена 28S подтвердил морфологическую идентификацию 11 особей и позволил выделить участки, по которым различаются эти два вида (см. рис. 1). Затем ко всем 20 особям *Ligophorus* были применены описанные выше методы разделения двух видов на основе аллель-специфичной ПЦР для оценки их эффективности.

Метод генотипирования анализа длины ПЦР-продуктов двух полиморфных участков рибосомного гена 28S показал четкое разделение видов *L. cephalis* и *L. mediterraneus* (рис. 3). При использовании обоих вариантов смеси праймеров (U178+MR450+CR650 и U178+MR450+CR550) для всех особей наблюдалась амплификация ПЦР-продуктов только с одним обратным праймером, который имел полную комплементарность к исследуемому участку 28S.

При генотипировании аллель-специфичной ПЦР с детекцией в конечной точке для каждой пробы ставилось две реакции амплификации с разным составом праймеров. В одном варианте обратный праймер был комплементарен участку гена 28S, характерному для *L. mediterraneus* (MR450), в другом – этому же участку гена 28S, характерному для *L. cephalis* (CR450). Праймеры отличались на три нуклеотида. В ходе работы не удалось подобрать условия амплификации, при которых не происходило бы отжига праймеров, которые не полностью комплементарны. В результате при детекции в агарозном геле в конечной точке ПЦР-продукты обнаруживались всегда, хотя и с различной интенсивностью (рис. 4).

Применение этого же подхода, но с детекцией в режиме реального времени позволяет четко различить два вида (рис. 5). Это связано с различной скоростью накопления ПЦР-продуктов при использовании полностью и частично

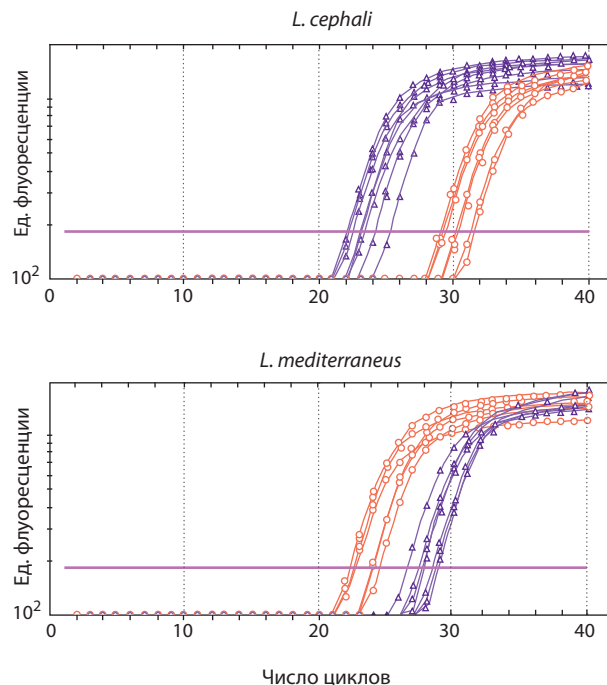


Рис. 5. Типирование образцов ДНК при помощи аллель-специфичной ПЦР в реальном времени.

По оси ординат значения даны в логарифмической шкале. Фиолетовым цветом обозначены кривые амплификации для смеси праймеров MCF300+CR450, желтым – для MCF300+MR450.

комплементарных праймеров. В данном подходе был заменен прямой праймер, чтобы получить более короткие продукты амплификации, что рекомендуется для ПЦР в реальном времени. Для каждой особи ставятся две реакции амплификации и затем вид определяется по меньшему значению St (номер цикла, в котором сигнал флуоресценции пересекает пороговую линию). Накопление продуктов идет быстрее в случае полной комплементарности праймера и матрицы исследуемой ДНК. Для всех особей было показано 100 % совпадение при идентификации с помощью аллель-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени с результатами морфологического анализа и данными секвенирования.

Заключение

В настоящей работе был разработан молекулярно-генетический подход, позволяющий быстро различить два вида моногеней – *L. mediterraneus* и *L. cephalis*, обитающих на *Mugil cephalus* в Азово-Черноморском бассейне. Из трех протестированных подходов два (метод анализа длин амплифицированных фрагментов и аллель-специфичная ПЦР в реальном времени) позволили достоверно различить *L. mediterraneus* и *L. cephalis*. Применение аллель-специфичной ПЦР с детекцией продуктов амплификации в конечной точке неэффективно, так как происходит отжиг и накопление продукта для обоих праймеров, комплементарных последовательностям, характерным как *L. mediterraneus*, так и *L. cephalis*. Наиболее экономически выгоден предложенный нами подход с использованием ПЦР-смеси, содержащей три праймера. Достаточно эффективным и быстрым можно считать метод аллель-

специфичной ПЦР в реальном времени, недостатком которого является лишь его высокая стоимость. Тем не менее разработанный подход гораздо быстрее и экономически выгоднее, чем секвенирование нуклеотидных последовательностей фрагмента рибосомного гена 28S.

Предлагаемые методы генотипирования могут использоваться для быстрого разделения двух видов плоских паразитических червей рода *Ligophorus* при оценке степени зараженности лобана этими паразитами в Азово-Черноморском регионе. Также следует отметить, что, исходя из данных о нуклеотидных последовательностях 28S для других паразитов этого рода, разработанные нами праймеры имеют 100 % идентичность только с этими двумя видами из всех обитающих на лобане. Это позволяет применять их и в других районах Мирового океана. Разработанный подход крайне полезен при проведении различных исследований рассматриваемых видов, таких как изучение их распространения, изменения соотношения двух видов на одной особи хозяина, конкуренции видов, влияния различных факторов на их численность и т. д. Кроме того, полученные результаты демонстрируют перспективность разработки таких подходов для оценки численности других видов моногеней, в том числе патогенных.

Список литературы / References

- Гусев А.В. Методика сбора и обработки материалов по моногенам, паразитирующим у рыб. Л.: Наука, 1983.
[Gusev A.V. Method for Collecting and Processing Materials on Monogeneans Parasitizing Fish. Leningrad: Nauka Publ., 1983. (in Russian)]
- Гусев А.В., Пугачев О.Н., Эргенс Р.Р., Хотеновский И.А. Класс Monogenea. В: Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т. 2. Под ред. О.Н. Бауера, А.В. Гусева. Л.: Наука, 1985;10-387.
[Gusev A.V., Pugachev O.N., Ergens R.R., Khotenovskiy I.A. Class Monogenea. In: Bauer O.N., Gusev A.V. (Eds.) Key to the Parasites of Freshwater Fish of the USSR Fauna. Vol. 2. Leningrad: Nauka Publ., 1985;10-387. (in Russian)]
- Токарев Ю.С., Васильева А.А., Грушевая И.В., Малыш Ю.М. Мультилокусное генотипирование как современный подход в диагностике микроспоридий – облигатных внутриклеточных паразитов животных. *Пробл. соврем. науки и образования*. 2015;12:51-55.
[Tokarev Yu.S., Vasilieva A.A., Grushevaya I.V., Malysh Yu.M. Multilocus genotyping as a modern approach to the diagnosis of microsporidia, obligate intracellular parasites of animals. *Problemy Sovremennoy Nauki i Obrazovaniya = Problems of Modern Science and Education*. 2015;12:51-55. (in Russian)]
- Bakke T.A., Cable J., Harris P.D. The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian-Doll Killers”. *Adv. Parasitol.* 2007;64:161-376. DOI 10.1016/S0065-308X(06)64003-7.
- Blasco-Costa I., Miguez-Lozano R., Sarabev V., Balbuena J.A. Molecular phylogeny of species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) and their affinities within the Dactylogyridae. *Parasitol. Int.* 2012;61(6):619-627. DOI 10.1016/j.parint.2012.06.004.
- Caltran H., Silan P., Roux M. *Ligophorus imitans* (Monogenea) Ectoparasite of *Liza ramada* (Teleostei). I. Populations naturelles et variabilité morphologique. *Ecologie*. 1995;26(2):95-104.
- Cribb T.H., Chisholm L.A., Bray R.A. Diversity in the Monogenea and Digenea: does lifestyle matter? *Int. J. Parasitol.* 2002;32(3):321-328. DOI 10.1016/S0020-7519(01)00333-2.
- Dmitrieva E., Dimitrov G. Variability in the taxonomic characters of Black Sea gyrodactylids (Monogenea). *Syst. Parasitol.* 2002;51(3):199-206. DOI 10.1023/A:1014594614921.
- Dmitrieva E.V., Gerasev P.I., Gibson D.I., Pronkina N.V., Galli P. Descriptions of eight new species of *Ligophorus* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Ancyrocephalidae) from Red Sea mullets. *Syst. Parasitol.* 2012;81(3):203-237. DOI 10.1007/s11230-011-9341-8.
- Dmitrieva E.V., Gerasev P.I., Merella P., Pugachev O.N. Redescription of *Ligophorus mediterraneus* Sarabev, Balbuena & Euzet, 2005 (Monogenea: Ancyrocephalidae) with some methodological notes. *Syst. Parasitol.* 2009a;73(2):95-105. DOI 10.1007/s11230-009-9177-7.
- Dmitrieva E.V., Gerasev P.I., Merella P., Pugachev O.N. Redescriptions of *Ligophorus cephalis* Rubtsova, Balbuena, Sarabev, Blasco-Costa & Euzet, 2006 and *L. chabaudi* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Ancyrocephalidae), with notes on the functional morphology of the copulatory organ. *Syst. Parasitol.* 2009b;73(3):175-191. DOI 10.1007/s11230-009-9192-8.
- Ergens R., Gelnar M. Experimental verification of the effect of temperature on the size of hard parts of opisthaptor of *Gyrodactylus katharineri* Malmberg, 1964 (Monogenea). *Folia Parasitologica*. 1985;32(4):377-380.
- Fromm B., Burow S., Hahn C., Bachmann L. MicroRNA loci support conspecificity of *Gyrodactylus salaris* and *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes: Monogenea). *Int. J. Parasitol.* 2014;44(11):787-793. DOI 10.1016/j.ijpara.2014.05.010.
- Fromm B., Worren M.M., Hahn C., Hovig E., Bachmann L. Substantial loss of conserved and gain of novel microRNA families in flatworms. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2619-2628. DOI 10.1093/molbev/mst155.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41. 1999;95-98.
- Kalafi E.Y., Tan W.B., Town C., Dhillon S.K. Automated identification of Monogeneans using digital image processing and K-nearest neighbour approaches. *BMC Bioinform.* 2016;17(19):511. DOI 10.1186/s12859-016-1376-z.
- Khang T.F., Soo O.Y.M., Tan W.B., Lim L.H.S. Monogenean anchor morphometry: systematic value, phylogenetic signal, and evolution. *PeerJ*. 2016;4:e1668. DOI 10.7717/peerj.1668.
- Littlewood D.T.J. Platyhelminth systematics and the emergence of new characters. *Parasite*. 2008;15:333-341. DOI 10.1051/parasite/2008153333.
- Littlewood D.T.J., Curini-Galletti M., Herniou E.A. The interrelationships of Proseriata (Platyhelminthes: Seriata) tested with molecules and morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2000;16(3):449-466. DOI 10.1006/mpev.2000.0802.
- Lockyer A.E., Olson P.D., Littlewood D.T.J. Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory. *Biol. J. Linn. Soc.* 2003;78(2):155-171. DOI 10.1046/j.1095-8312.2003.00141.x.
- Marchiori N.C., Pariselle A., Pereira J.J., Agnès J.-F., Durand J.-D., Vanhove M.P.M. A comparative study of *Ligophorus uruguayense* and *L. saladensis* (Monogenea: Ancyrocephalidae) from *Mugiliza* (Teleostei: Mugilidae) in southern Brazil. *Folia Parasitol.* 2015;62:024. DOI 10.14411/fp.2015.024.
- Mieszkowska A., Górniak M., Jurczak-Kurek A., Zięta M.S. Revision of *Gyrodactylus salaris* phylogeny inspired by new evidence for Eemian crossing between lineages living on grayling in Baltic and White sea basins. *PeerJ*. 2018;6:e5167. DOI 10.7717/peerj.5167.
- Mladineo I., Šegvić-Bubić T., Stanić R., Desdevises Y. Morphological plasticity and phylogeny in a monogenean parasite transferring between wild and reared fish populations. *PLoS One*. 2013;8(4):e62011. DOI 10.1371/journal.pone.0062011.
- Olstad K., Bachmann L., Bakke T.A. Phenotypic plasticity of taxonomic and diagnostic structures in gyrodactylosis-causing flatworms (Monogenea, Platyhelminthes). *Parasitology*. 2009;136:1305-1315. DOI 10.1017/S0031182009990680.

- Pakdee W., Ogawa K., Pornruseetriratn S., Thaenkham U., Yee-min T. The first record of *Ligophorus* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Dactylogyridae) on *Crenimugil buechanani* (Teleostei: Mugilidae) from Thailand based on morphological and molecular analyses. *J. Helminthol.* 2019;93(6):752-762. DOI 10.1017/S0022149X1800072X.
- Poisot T., Verneau O., Desdevises Y. Morphological and molecular evolution are not linked in *Lamellodiscus* (Platyhelminthes, Monogenea). *PLoS One.* 2011;6(10):e26252. DOI 10.1371/journal.pone.0026252.
- Pugachev O.N., Gerasev P.I., Gushev A.V., Ergens R., Khotenowsky I. Guide to Monogeneoidea of freshwater fish of Palaearctic and Amur regions. Milan: Ledizione-Ledi Publ., 2009.
- Rodríguez-González A., Miguez-Lozano R., Llopis-Belenguer C., Balbuena J.A. Phenotypic plasticity in haptor structures of *Ligophorus cephalis* (Monogenea: Dactylogyridae) on the flathead mullet (*Mugil cephalus*): a geometric morphometric approach. *Int. J. Parasitol.* 2015;45(5):295-303. DOI 10.1016/j.ijpara.2015.01.005.
- Rubio-Godoy M. Fish host-monogenean parasite interactions, with special reference to Polyopisthocotylea. In: Terrazas L.I. (Ed.) Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases. Thiruvananthapuram: Research Signpost, 2007;91-109.
- Soo O.Y.M., Tan W.B., Lim L.H.S. Three new species of *Ligophorus* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Ancyrocephalidae) from *Moolgarda buechanani* (Bleeker) off Johor, Malaysia based on morphological, morphometric and molecular data. *Raffles Bull. Zool.* 2015;63:49-65.
- Strona G., Montano S., Seveso D., Paolo G., Fattorini S. Identification of Monogenea made easier: a new statistical procedure for an automatic selection of diagnostic linear measurements in closely related species. *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* 2014;52(2):95-99. DOI 10.1111/jzs.12050.
- Vanhove M.P.M., Tessens B., Schoelinck C., Jondelius U., Littlewood D.T.J., Artois T., Huysse T. Problematic barcoding in flatworms: a case-study on monogeneans and rhabdocoels (Platyhelminthes). *ZooKeys.* 2013;365:355-379. DOI 10.3897/zookeys.365.5776.
- Vignon M. Putting in shape – towards a unified approach for the taxonomic description of monogenean haptor hard parts. *Syst. Parasitol.* 2011;79(3):161-174. DOI 10.1007/s11230-011-9303-1.
- Yamaguti S. Systema helminthum. Vol. IV. Monogenea and Aspidocotylea. New York; London: Intersci. Publ., 1963.

ORCID ID

E.A. Vodiasova orcid.org/0000-0003-3886-2880
E.S. Chelebieva orcid.org/0000-0002-7662-2573
O.V. Shikhat orcid.org/0000-0003-1909-3836
D.M. Atopkin orcid.org/0000-0001-8417-3424
E.V. Dmitrieva orcid.org/0000-0001-6300-2458

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-44-920004_p_a и в соответствии с государственным заданием № 0556-2021-0002, номер гос. регистрации 121030100028-0.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.07.2021. После доработки 06.01.2022. Принята к публикации 18.01.2022.