

**РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА DIPLOMONADIDA
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗАРАЖЕННОСТИ РЫБ**

**Н.Н. Деникина¹, И.А. Небесных¹, Е.В. Суханова¹,
Н.Л. Белькова^{1,2}, О.Т. Русинек^{2,3}, Е.В. Дзюба¹**

¹УРАН Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия

²Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

³УРАН Байкальский музей ИИЦ СО РАН, пос. Листвянка, Россия

Балықтардың асқорыту жүйесінің әртүрлі бөлімдерінде *Diplomonadida* отряды өкілдерін жылдам детекциялау әдісі жасалып, ұсынылды. Шығыс Сібір суқоймаларында *Thymallidae* тұқымдасының балықтарындағы *Diplomonadida* ареалы бойынша алғашқы нәтижелер алынды. Байкал көлі мен Сібір суқоймаларындағы балықтардың басқа түрлерінде *Diplomonadida* түрлік өзгешелігі мен ареалын анықтау үшін молекулалық-генетикалық детекциясын жасау қажеттілігі талқыланады.

Разработан и предложен метод быстрой детекции представителей отряда *Diplomonadida* в разных отделах пищеварительной системы рыб. Получены предварительные результаты по ареалу *Diplomonadida* в рыбах сем. *Thymallidae* водоёмов Восточной Сибири. Обсуждается необходимость молекулярно-генетической детекции *Diplomonadida* в других видах рыб оз. Байкал и водоемов Сибири для уточнения их видоспецифичности и ареалов.

A method for a rapid detection of the order Diplomonadida representatives in different section of fish digestive system was developed and proposed. We obtained primary results on the

Diplomonadida – жгутиковые простейшие, одни из примитивных эукариот, лишённые характерных митохондрий, пероксисом и аппарата Гольджи [1].

Несмотря на сравнительно высокий уровень изученности животных озера Байкал, данные о видовом составе паразитических простейших до сих пор являются не полными [2, 3, 4]. В настоящее время известно, что в рыбах Байкальского региона встречаются представители двух родов отряда *Diplomonadida* – *Hexamita* (*Octomitrus*) и *Spironucleus* [2, 5, 6]. Среди отмеченных у рыб дипломонад встречаются как комменсалы, так и патогенные организмы [7, 8]. Многие аспекты биологии и экологии этих животных, включая состав хозяев, географические ареалы и уровень патогенности различных видов, исследованы только частично. Это связано, прежде всего, со сложностью определения родов и видов отряда *Diplomonadida*. При этом важно указать, что активно развиваются исследования этой группы при помощи молекулярно-генетических методов [8, 9].

areal of Diplomonadida in fish of the family Thymallidae in the East Siberia. The necessity of molecular genetic detection of Diplomonadida in other fish species from Lake Baikal and other Siberian water bodies for the specification of their species-specificity and areal is discussed.

При исследовании микрофлоры желудочно-кишечного тракта черного байкальского хариуса (*Thymallus baicalensis* Dybowski, 1874) из р. Ангара нами были получены нуклеотидные последовательности фрагмента гена малой субъединицы рибосомной РНК, идентичные генотипу непатогенного морфологического типа *Spiroucleus barkhanus* (AM492686–AM492689), выделенного из таких пресноводных лососевидных рыб, как европейский хариус (*Thymallus thymallus*) и арктический голец (*Salvelinus alpinus*) [6, 10]. Затем с помощью видо-специфичной амплификации этот же генотип был обнаружен у черного байкальского хариуса из озера Байкал. Ранее считали, что *S. barkhanus* (Diplomonadida: Hexamitidae) существует в двух морфологически близких типах и специфичен для лососевидных рыб. Первый – пресноводный тип, не вызывает заболевания рыб и является их комменсалом [8, 11]. Второй – морской тип, вызывает серьезные системные инфекции у выращиваемых в аквакультуре рыб [12; 13; 14]. На основании анализа нуклеотидных последовательностей генов малой субъединицы

рРНК представители морского генотипа были реклассифицированы в новый вид *Spiroucleus salmonicida* [8]. Существующая молекулярно-генетическая система их детекции позволяет амплифицировать фрагменты генома более 1000 пар нуклеотидов [8], что важно для идентификации видов рода *Spiroucleus*. Однако метод предполагает получение длинного ампликона и не может быть использован в качестве экспресс-диагностической системы. Поэтому **целью данного исследования** стало создание удобной диагностической молекулярно-генетической системы для выявления дипломонад в разных отделах пищеварительной системы рыб с последующей её апробацией для оценки зараженности представителей сем. *Thymallidae* и других лососевидных рыб.

Материалы и методы. Ареал представителей сем. *Thymallidae* занимает большую территорию несвязанных между собой бассейнов рек и озер Палеарктики и Неарктики. Материалом для работы послужили рыбы сем. *Thymallidae* из озера Байкал, озер-истоков рек, впадающих в Байкал: Хубсугул (Монголия), Аршантай-Нур, Тухурен-Нур и Загатай-Нур (Восточные Саяны), рек Ангара и Чечуй (правый приток р. Лена) (таблица). Кроме того, были проанализированы представители других семейств лососевидных рыб: байкальский омуль *Coregonus migratorius*, ленок *Brachymystax lenok* и сиг-пыжьян

Таблица. Время и места сбора, количество и заражённость лососевидных рыб

Время и место сбора	Вид	Кол-во особей, экз.	Кол-во зараженных особей, экз. (%)
Водоемы Хубсугул-Байкало-Ангарской водной системы			
оз. Хубсугул, исток р. Селенга ноябрь	<i>Thymallus nigrescens</i>	14	5 (35,5)
оз. Загатай-Нур, исток р. Сенца август	<i>Thymallus baicalensis</i>	42	21 (50,0)
оз. Аршантай-Нур, исток р. Хойто-гол август	<i>Thymallus baicalensis</i>	18	11 (61,0)
оз. Тухурен-Нур, исток р. Хадрус август	<i>Thymallus sp.</i>	16	10 (62,5)
оз. Байкал август октябрь-ноябрь	<i>Thymallus baicalensis</i>	27	23 (85,0)
	<i>Coregonus migratorius</i>	20	6 (33)
р. Ангара, г. Иркутск май	<i>Thymallus baicalensis</i>	12	12 (100)
Бассейн р. Лена			
р. Чечуй, правый приток р. Лена сентябрь	<i>Thymallus sp.</i>	89	22 (24,0)
	<i>Brachymystax lenok</i>	24	10 (41,5)
	<i>Coregonus lavaretus</i>	11	6 (54,5)
	<i>pidschian</i>		

Coregonus lavaretus pidschian (таблица). Отлов рыб производили при помощи жаберных сетей (ячей 24–36 мм) в различные сезоны 2006–2010 гг. Для анализа взяты образцы как из свежееотловленных, так и подвергнутых замораживанию рыб. Суммарную ДНК из разных отделов кишечника и желчного пузыря рыб выделяли методом ферментативного лизиса с фенол-хлороформной экстракцией [15]. Разработали систему специфичных к фрагменту гена малой субъединицы рРНК представителей отряда Diplomonadida праймеров: 500L: CGTGCCAGCAGCCGCGGTAА [16] и DrR: 5' – AGCCGCAGACTCCACRTCT. Суммарную ДНК использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции с разработанными в данной

работе праймерами в режиме: 94°C – 20 сек.; 60°C – 20 сек.; 72°C – 30 сек., 35 циклов. Длина ампликонов составила около 450 п.н., их анализировали с использованием электрофореза в 2% агарозном геле.

Для сравнения те же образцы ДНК амплифицировали с ранее опубликованными видоспецифичными праймерами Spiro-1F–Spiro-2R [11] в режиме: 94°C – 45 сек.; 55°C – 45 сек.; 72°C – 60 сек., 35 циклов. Результаты реакции анализировали также электрофорезом в 1,5% агарозном геле.

Результаты и обсуждение. Для оптимизации процесса первичной пробоподготовки и определения методов отбора, хранения и консервации материала для детекции Diplomonadida пробы отби-

рали как у замороженных, так и у свежееотловленных рыб. В видоспецифичной амплификации нами было проанализировано 37 препаратов суммарных ДНК, выделенных из предварительно замороженных рыб. Для всех проб показано, что видоспецифичный фрагмент длиной 1428 н. п. после амплификации с тотальной ДНК не детектируется. *Diplomonadida* имеют тонкую структурную оболочку, которая легко разрушается при замораживании, после чего ДНК деградирует до мелких фрагментов. Это обстоятельство не позволяет использовать ранее предложенную видоспецифичную амплификацию для диагностических целей. Разработанная нами система праймеров позволила в ряде случаев получить целевой ампликон даже из замороженных образцов.

Диагностическая система праймеров, позволяющая амплифицировать нуклеотидные последовательности фрагментов гена малой субъединицы рРНК диплонад длиной 450 п.н., была апробирована в работе по определению ареала представителей сем. *Thymallidae*, зараженных дипломонадами. Проанализировано 217 проб, для 104 из которых получен положительный результат на наличие представителей отряда *Diplomonadida* (таблица). Кроме того, они детектированы и в других лососевидных рыбах (таблица).

Обнаружен ярко выраженный тренд зараженности хариусов в системе оз. Хубсугул, Аршантай-Нур, Тухурен-Нур

и Загатай-Нур – оз. Байкал – р. Ангара (таблица). Из 13 особей, выловленных в оз. Хубсугул, положительный результат был получен в 38,5% случаев, в оз. Загатай-Нур – в 50,0%, в оз. Аршантай-Нур – в 61,0%, в оз. Тухурен-Нур – в 62,5%. Максимальная зараженность отмечена в оз. Байкал и р. Ангара – 85,0% и 100%, соответственно.

Для сравнительной оценки зараженности рыб сем. *Thymallidae* в водоемах Восточной Сибири анализировали хариусов, отловленных в р. Чечуй (водосборный бассейн р. Лена). Зараженность рыб р. Чечуй оказалась меньше, чем в других водоемах и составила 24,0%. Однако следует отметить, что проанализированные образцы были отобраны в разные сезоны (таблица). Поскольку нельзя не учитывать вероятность сезонных колебаний доли зараженных рыб, полученные данные можно считать предварительными. Необходим анализ сезонной динамики показателя зараженности для каждого конкретного района и исследований.

В настоящее время известно, что в рыбах Байкальского региона встречаются представители двух родов – *Hexamita* (*Octomitus*) и *Spironucleus* [2; 10]. В озере Байкал паразитические организмы *Hexamita sp.* и *H. truttae* отмечены у байкальского омуля (*Coregonus migratorius*), байкальских хариусов (*Thymallidae*), сибирского ельца *Leuciscus leuciscus*, налима *Lota lota*, а также у эндемичных керчаковых рыб (*Batrachocottus multiradiatus*,

B. nikolskii, *Cottocomephorus grewingkii*, *Limnocottus bergianus*) [2, 3, 4, 17]. Поэтому с учетом полученных данных необходимо применение комплекса морфологических, ультраструктурных и молекулярно-генетических методов для дальнейших исследований представителей отряда Diplomonadida в других видах рыб озера Байкал и его бассейна. Это важно для выявления уровня филогенетических связей между паразитическими простейшими этой группы.

Выводы: Разработана методика молекулярно-генетической детекции Diplomonadida. Определена зараженность рыб сем. *Thymallidae* Восточной Сибири представителями отряда Diplomonadida, выявлены отличия зараженности в озёрах Байкал, Хубсугул, Аршантай-Нур, Тухурен-Нур и Загатай-Нур (Восточные Саяны), реках Ангара и Чечуй (приток р. Лена). Определены задачи будущих исследований.

Авторы выражают благодарность за предоставленный материал к.б.н. М.И. Лазареву.

Работа выполнена в рамках программы РАН №26, подпрограммы 1, проект 26.13 и при поддержке НОЦ «Байкал».

ЛИТЕРАТУРА

1. Keeling P.J., Doolittle W.F. Widespread and ancient distribution of a noncanonical genetic code in Diplomonads // *Mol. Biol. Evol.* – 1997. – V.14, No. 9. – P. 895–901.
2. Заика В.Е. Паразитофауна рыб озера Байкал – М.: Наука, 1965. – 107 с.
3. Пронин Н.М. Полимастиготы (Mastigophora: Polymastigota) // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: в 2 т. – Новосибирск: Наука, 2001. – Т.1: Озе-

ро Байкал, кн. 1./ О.А. Тимошкин, Т.Я. Ситникова, О.Т. Русинек и др. – (Справочники и определители по фауне и флоре озера Байкал). – С. 129.

4. Русинек О.Т. Паразиты рыб озера Байкал (фауна, сообщества, зоогеография, история формирования). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. – 571 с.

5. Пугачев О.Н. Каталог паразитов пресноводных рыб Северной Азии. Простейшие. – СПб., ЗИН РАН, 2001. – 242 с.

6. Белькова Н.Л., Дзюба Е.В., Суханова Е.В. Молекулярно-генетическая идентификация кишечной микрофлоры и протистов байкальских рыб // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: в 2 томах. – Новосибирск: Наука, 2009. – Т. II: Водоемы и водотоки юга Восточной Сибири и Северной Монголии / О.А. Тимошкин, В.И. Провиз, Т.Я. Ситникова и др. – (Справочники и определители по фауне и флоре озера Байкал). – С. 957-980.

7. Poynton S.L., Morrison C.M. Morphology of diplomonad flagellates: *Spironucleus torosa* n. sp. from Atlantic Cod *Gadus morhua* L., and Haddock *Melanogrammus aeglefinus* (L.) and Hexamita salmonis Moore from Brook Trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) // *J. Eukar. Microbiol.* – 1990. – V. 37, No. 5. – P. 369–383.

8. Jorgensen A., Sterud E. The marine pathogenic genotype of *Spironucleus barkhanus* from farmed salmonids redescribed as *Spironucleus salmonicida* n. sp. // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2006. – V. 53, No. 6. – P. 531–541.

9. Poynton S.L., Sterud E. Guidelines for species descriptions of diplomonad flagellates from fish // *Journal of Fish Diseases.* – 2002. – V. 25. – P. 15–31.

10. Белькова Н.Л., Дзюба Е.В., Суханова Е.В. Молекулярно-генетическая детекция непатогенного генотипа *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida: Hexamitidae) в черном байкальском хариусе (*Thymallus arcticus baicalensis* Dybowski, 1874) // *Изв. РАН. Сер. «Б».* – 2008. – Т. 35, №2. – С. 253–256.

11. Jorgensen A., Sterud E. SSU rRNA gene sequence reveals two genotypes of *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida) from farmed and wild Arctic charr *Salvelinus alpinus* // *Dis. Aquat. Org.* – 2004. – V. 62. – P. 93–96.

12. Mo T.A., Poppe T.T., Iversen L. Systematic hexamitosis in saltwater reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* – 1990. – V. 10. – P. 69.

13. Kent M.L., Ellis J., Fournie J.W. et al. // Systematic hexamitid (Protozoa, Diplomonadida) infection in seawater pen-reared Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* // *Dis. Aquat. Org.* – 1992. – V. 14. – P. 81–89.

14. *Sterud E., Mo T.A., Poppe T.T.* Systematic spironucleosis in seafarmed Atlantic salmon *Salmo salar*, caused by *Spironucleus barkhanus* transmitted from feral Arctic char *Salvelinus alpinus* // *Dis. Aquat. Org.* – 1998. – V. 33. – P. 63–66.
15. *Белькова Н.Л.* Таксономическое разнообразие микробного сообщества водной толщи озера Байкал: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Владивосток: ДВГУ, 2004. – 20 с.
16. *Денисова Л.Я., Белькова Н.Л., Тулоханов И.И., Зайчиков Е.Ф.* Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК // *Микробиология.* – 1999. – Т. 68, №4. – С. 475–483.
17. *Пронин Н.М.* Паразиты и болезни омуля // *Экология, болезни и разведение байкальского омуля* / Г.А. Афанасьев, Н.М. Пронин, И.Г. Топорков и др. – Новосибирск: Наука, 1981. – С. 114–159.