

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА И ОКЕАНОГРАФИИ»**

Полярный филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ПИНРО» им. Н.М. Книповича)



Лососевые рыбы: биология, воспроизводство, промысел

**Материалы всероссийской
научно-практической конференции**

(г. Мурманск, 23-24 марта 2023 г.)

**Мурманск
2023**

УДК 597
Л 79

Л 79 **Лососевые рыбы:** биология, воспроизводство, промысел: материалы всероссийской научно-практической конференции (г. Мурманск, 23-24 марта 2023 г.) / Полярный филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ПИНРО» им. Н.М. Книповича); научный редактор К.М. Соколов. – Мурманск: ПИНРО им. Н.М. Книповича, 2023. – 524 с.

ISBN 978-5-86349-288-9

Сборник подготовлен по материалам всероссийской конференции ученых и специалистов «Лососевые рыбы: биология, воспроизводство, промысел». Организатор конференции – Полярный филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ПИНРО» им. Н.М. Книповича).

Мероприятие посвящено 120-летию с начала исследований атлантического лосося на Кольском полуострове.

В книге представлены результаты работ по следующим направлениям: биология лососевых рек; история исследований; современное состояние популяций анадромных рыб; естественное и искусственное воспроизводство; аквакультура, проблемы и перспективы; паразиты и болезни рыб; биохимия и физиология; распределение и миграции; сохранение видов и их охрана; антропогенное влияние на популяции лососевых рыб; промысел анадромных рыб в различных регионах России; любительское рыболовство.

Издание предназначено для специалистов, интересующихся различными аспектами решения проблем биологии, распределения и промысла лососевых рыб России, присущих современному отечественному рыбному хозяйству.

Научный редактор канд. биол. наук К.М. Соколов

Редакционная коллегия:

*М.Ю. Алексеев, канд. биол. наук, А.В. Зубченко, д-р биол. наук,
Т.А. Карасева, канд. биол. наук, Л.И. Пестрикова, канд. биол. наук, А.В. Ткаченко*

ISBN 978-5-86349-288-9

© «ПИНРО» им. Н.М. Книповича, 2023

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ТРЕМАТОД РОДА *DIPLOSTOMUM* ЛОСОСЕВЫХ РЫБ РАЗНОТИПНЫХ ВОДОЕМОВ РОССИИ

Г.В. Изотова^{1,2,3}, П.Г. Власенко^{1,2}, Г.Н. Маркевич¹,
Е.Н. Кашинская^{1,2}, М.М. Соловьев^{1,2}

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
(ИПЭЭ РАН), г. Москва

²Институт систематики и экологии животных СО РАН (ИСиЭЖ СО РАН),
г. Новосибирск

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет»
(НГАУ), г. Новосибирск

Аннотация. Трематоды рода *Diplostomum* – паразиты глаз и головного мозга рыб, вызывающие нарушение пространственной ориентации и питания. Проведена идентификация диплостомид некоторых лососевых рыб методом ДНК-баркодинга на основе гена мтДНК *cox1* в трех озерах России: Кроноцкое (п-ов Камчатка), Телецкое (Республика Алтай) и Баунт (Республика Бурятия). Выявлено 5 клад видового уровня, 4 из которых идентифицируемые до вида. Проведены анализ и описание морфологии каждого вида.

Ключевые слова: оз. Кроноцкое, оз. Телецкое, оз. Баунт, ДНК-баркодирование, Diplostomidae.

ВВЕДЕНИЕ

Трематоды рода *Diplostomum* – широко распространенные дигенетические сосальщики. Первым промежуточным хозяином паразита выступают пресноводные моллюски семейства Lymnaeidae, обитающие на мелководье, где происходят эмиссия церкарий из моллюсков и последующее заражение второго промежуточного хозяина – рыбы. Окончательными хозяевами являются рыбоядные птицы, с которым паразиты способны распространяться между водоемами (Шигин, 1993).

Рыбы заражаются на мелководье, где церкарии проникают в мягкие ткани молоди рыб и мигрируют по направлению к глазам и головному мозгу, в ходе чего вызывают повреждения нервной и кровеносной систем. Трематоды локализуются в хрусталике, на сетчатке либо в стекловидном теле глаза или же в головном мозге, что негативно сказывается на ориентации хозяина в пространстве и влияет на особенности его питания, нанося существенный вред рыбному хозяйству, снижая темпы роста и упитанность зараженных рыб, в том числе лососевых. Один из ключевых вопросов в борьбе с диплостомозами – установление их видового состава и

особенностей жизненного цикла каждого отдельного вида (Фауна и экология..., 1986; Фрезе, 2002).

Ранние исследования, посвященные вопросу видового определения диплостомид, основываются на морфологическом подходе. Данный метод, ввиду недостатка и слабой выраженности морфологических признаков у данных трематод на стадии метацеркарии, недостаточно точен. В настоящий момент систематика диплостомид, обитающих на территории России, включает как невалидные, так и криптические виды (Фрезе, 2002; Шигин, 1993). Мы использовали метод ДНК-баркодирования по фрагменту митохондриального гена первой субъединицы цитохромоксидазы (мтДНК *cox1*), успешно применяющийся в исследованиях, которые посвящены видovому определению личиночных стадий трематод (Воронова, Буна, Курченко, 2012; Locke, Al-Nasiri, Caffara, 2015).

В данной работе рассматривается видовой состав диплостомид лососевых рыб трех олиготрофных горных озер – Кроноцкое, Телецкое и Баунт.

Озеро Телецкое расположено в горах Республики Алтай на высоте 436 м над уровнем моря и характеризуется высокими перепадами глубин с максимальной 325 м и средней около 180 м. В нем обитают 13 видов рыб, в том числе массовые виды лососевых рыб, такие как сиг Правдина, телецкий сиг, сибирский хариус, таймень и ленок. Ранее в озере диплостомиды фиксировались в глазах ельца и подкаменщика, но вид паразита установлен не был (Рыбы Телецкого озера, 1981; Титова, 1954).

Озеро Баунт входит в Ципо-Ципиканскую систему озер, расположенную на севере Республики Бурятия, в долине реки Ципа. Водоем расположен на высоте 1060 м над уровнем моря. Максимальная глубина озера составляет 33 м, средняя – 17 м. В нем обитают свыше 20 видов рыб, среди которых лососевые – три формы/вида сига, баунтовская ряпушка, таймень и ленок. В озере ранее диплостомиды были обнаружены в глазах ерша и налима и определены как вид *D. volvens* (Давыдов, 1955; Дугаров, Батуева, Бурдуковская, 2021).

Озеро Кроноцкое – самый большой пресноводный водоем п-ова Камчатка. Средняя глубина озера составляет 51 м, максимальная – 148 м. В нем обитают два вида лососевых рыб: кокань (карликовая форма нерки) и множество экотипов северной мальмы, среди которых выделяют пять основных форм: малоротый, большеротый, длинноголовый, носатый и белый гольцы. Ранее в глазах кокани и гольцов обнаруживались неидентифицированные диплостомиды, обозначенные как *D. sp. 1* и *D. sp. 2* (Бусарова, Кнудсен, Маркевич, 2016).

Таким образом, задачей нашей работы является определение видового состава диплостомид, паразитирующих в лососевых рыбах озер Кроноцкое,

Телецкое и Баунт, и установление гостальной специфичности идентифицированных видов паразитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала проводился в 2019-2022 г. на базе научного стационара на оз. Телецкое и в полевых лабораториях на озерах Кроноцкое и Баунт. Всего в ходе работ на оз. Кроноцкое было осмотрено свыше 100 лососевых рыб, с которых было собрано 39 диплостомид. На оз. Телецкое в результате осмотра более 80 рыб было собрано 3 экз. диплостомид. С оз. Баунт в результате паразитологического осмотра свыше 50 баунтовских сигаов был собран 1 экз. трематоды. Исследование проводилось с использованием бинокля Zeiss Stemi DV4. После вскрытия глаза и головной мозг извлекались в отдельные чашки Петри, где проводился отдельный сбор паразитологического материала с внутренней среды глаз, ретины, хрусталика и головного мозга рыбы. Трематоды фиксировались последовательно в 70- и 96 %-ном спирте для дальнейшего изучения в лаборатории.

Выделение тотальной ДНК проводилось с применением 5%-го водного раствора ионообменной смолы Chelex (Bio-Rad) и добавлением протеиназы К для полного растворения мягких тканей. В качестве маркера использовался фрагмент митохондриальной ДНК первой субъединицы цитохромоксидазы *cox1*. Для амплификации применялись праймеры Dice1F (5'-CGT TTR AAT TAT ACG GAT CC-3') и Dice1R (5'-AGC ATA GTA ATM GCA GCA GC-3') и протокол амплификации (Steenkiste, Locke, Castelin, 2015). Очистка ампликонов и секвенирование проводилось в ЦКП «Геномика». Выравнивание полученных последовательностей на основе алгоритма ClustalW, встроенного в программу MEGA v. 11. Для построения консенсусного дерева, определения видов и их отношения друг к другу применялись программы MrBayes (Hulsenbeck, Ronquist, 2001) и MEGA v. 11 (2018), также в анализ были включены референсные последовательности *cox1* диплостомид из GenBank, для определения ближайших гомологичных последовательностей использован NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Для установления морфологических признаков каждого вида использовались тринокуляр Olympus Vx40 и специализированное ПО для работы с цифровыми снимками – Olympus Vision. Отобранные для секвенирования трематоды фотографировали и измеряли перед выделением ДНК. В ходе анализа были исследованы 16 морфологических признаков диплостомид: длина А, ширина В, отношение длины к ширине АВ, длина и ширина ротовой присоски, длина и ширина псевдоприсосок, длина и ширина брюшной присоски, длины префаринкса, фаринкса и пищевода,

длины и ширина органа Брандеса, длина и ширина экскреторного пузыря (Фрезе, 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате филогенетического анализа исследуемые последовательности диплостомид рыб образовали пять клад видового уровня, среди них четыре идентифицируемые – *D. sp. Lineage 5* (Locke, Al-Nasiri, Caffara, 2015), *D. mergi*, *D. pseudospathaceum* и *D. spathaceum*. Также присутствует один неидентифицируемый вид – *D. sp. 1*.

D. mergi оказался единственным видом, обнаруженным только в хрусталике исследуемой рыбы – телецкого сига. Тем не менее, в кладе *D. sp. Lineage 5*, в основном состоящей из диплостомид внутренней среды глаза кокани, большеротого, малоротого, белого и длинноголового гольцов, присутствуют две метацеркарии из оз. Телецкое, обнаруженные нами в хрусталике двух телецких сигов. Все остальные клады включают в себя только диплостомид внутренней среды глаз.

Виды *D. pseudospathaceum* и *D. spathaceum* в оз. Кроноцкое обнаруживаются во внутренней среде глаза гольцов и кокани. Данные два вида ранее нигде, кроме хрусталика, не регистрировались.

Далее приводится морфологическое описание обнаруженных нами видов по зафиксированным в спирте экземплярам (значения представлены в микрометрах, в скобках указаны средние значения для каждого вида).

D. sp. 1. Длина А и ширина В: 599-358 × 472-283 (530 × 406), отношение длины к ширине АВ 1,61-1,03 (1,32), ротовая присоска округлая 91-45 × 87-37 (67 × 63), фаринкс и префаринкс сходной длины 37-18 и 38-20 (28,61 и 28,84), пищевод в среднем в 1,4 раза длиннее фаринкса 50-31 (41), псевдоприсоски ушковидные, хорошо выраженные 69-43 × 88-36 (60 × 57), брюшная присоска эквивалентна ротовой 80-58 × 89-54 (65 × 66), орган Брандеса овальный 103-79 × 71-65 (100 × 68), экскреторный пузырь V-образный 115-65 × 130-140 (91 × 140).

D. sp. Lineage 5. Длина А и ширина В: 639-329 × 406-303 (482 × 364), отношение длины к ширине АВ 1,67-1,08 (1,31), ротовая присоска округлая 70-34 × 69-39 (56 × 59), фаринкс чуть длиннее префаринкса 34-22 и 31-23 соответственно (29 и 25), пищевод в среднем в 1,7 раза длиннее фаринкса 51-30 (47), псевдоприсоски ушковидные, слабовыраженные 66-41 × 59-44 (57 × 53), брюшная присоска чуть больше ротовой 70-44 × 73-48 (61 × 60), орган Брандеса округлый 143-67 × 134-64 (109 × 101), экскреторный пузырь V-образный 117-62 × 161-91 (93 × 130).

D. mergi. Длина А и ширина В: 512 × 401, отношение длины к ширине АВ 1,27, ротовая присоска округлая 56 × 57, фаринкс чуть длиннее

префаринкса 27 и 25 соответственно, пищевод в 1,5 раза длиннее фаринкса, псевдоприсоски ушковидные, слабовыраженные 62×55 , брюшная присоска одинакова в размерах с ротовой 59×55 , орган Брандеса округлый 121×138 , экскреторный пузырь округлый 125×138 .

D. pseudospathaceum. Длина А и ширина В: $376-261 \times 343-236$ (331×272), отношение длины к ширине АВ 1,32-1,07 (1,21), ротовая присоска вытянутая $75-48 \times 57-52$ (61×55), фаринкс значительно длиннее префаринкса 59-43 и 27-12 соответственно (46 и 21), пищевод одинакового с фаринксом размера 58-21 (45), псевдоприсоски ушковидные, хорошо выраженные $64-43 \times 67-47$ (58×55), брюшная присоска сходна по размерам с ротовой $67-57 \times 65-51$ (60×57), орган Брандеса округлый $127-99 \times 144-97$ (116×111), экскреторный пузырь V-образный $55-42 \times 75-56$ (48×65).

D. spathaceum. Длина А и ширина В: $404-395 \times 347-279$ (400×313), отношение длины к ширине АВ 1,41-1,16 (1,29), ротовая присоска вытянутая $62-49 \times 60-51$ (56×46), фаринкс в два раза длиннее префаринкса 49-43 и 26-23 соответственно (46 и 25), пищевод короче фаринкса 19-28 (24), псевдоприсоски ушковидные, вытянутые, хорошо выраженные $71-64 \times 63-56$ (67×66), брюшная присоска крупнее ротовой $67-65 \times 66-63$ (66×64), орган Брандеса округлый $98-96 \times 111-99$ (97×105), экскреторный пузырь V-образный $65-62 \times 83-76$ (63×80).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе филогенетического анализа изученные последовательности трематод рода *Diplostomum* лососевых рыб озер Кривоное, Телецкое и Байкал сформировали пять клад видового уровня. Среди этих клад четыре идентифицируются до вида. Для каждого вида был проведен морфологический анализ и дано описание. Таким образом, ДНК-баркодирование по митохондриальному гену *cox1* демонстрирует более высокую точность определения и больший уровень биоразнообразия трематод в данных водоемах.

Из пяти рассматриваемых клад видового уровня четыре сформированы паразитами рыб оз. Кривоное, что говорит о большем количестве видов в водоеме, чем было ранее указано в работе, основанной на морфологическом анализе. Важно отметить, что в данном озере виды, ранее регистрировавшиеся только в хрусталике глаза рыб, обнаруживаются в нетипичной локализации – во внутренней среде глаз. Последовательности двух экземпляров того же вида трематод из оз. Телецкое были обнаружены нами в хрусталике. Это говорит о необходимости дальнейшего изучения паразитофауны диплостомид оз. Кривоное.

Исходя из полученных результатов, следующим этапом нашей работы станет анализ видового состава диплостомид в данных водоемах методом NGS-секвенирования – метагеномного анализа для массовой идентификации диплостомид. Данный подход позволит нам установить не только качественный, но и количественный состав данных трематод в рыбах исследуемых озер и составить общую картину зараженности для дальнейшего изучения пути и распространения между водоемами как внутри России, так и за ее пределами.

Секвенирование выполнено при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-74-10054. Метаанализ данных выполнен при поддержке Мегагранта № 220-6544-5338.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Бусарова, О.Ю. Паразитофауна гольцов (*Salvelinus*) озера Кроноцкое, Камчатка / О.Ю. Бусарова, Р. Кнудсен, Г.Н. Маркевич // Паразитология. – 2016. – С. 409-425.

Воронова, Н.В. Последовательность гена субъединицы I цитохромоксидазы С в молекулярной таксономии животных: принципы, результаты и проблемы использования / Н.В. Воронова, С.В. Буна, В.П. Курченко // Труды БГУ. – Минск: БГУ, 2015. – Т. 7, ч. 1. – С. 22-42.

Давыдов, Л.К. Гидрография СССР (Воды суши) / Л.К. Давыдов. – Ленинград: Изд-во Ленингр. гос. ун-та, 1955. – 560 с.

Дугаров, Ж.Н. Паразитофауна обыкновенного ерша *Gymnoscephalus serpius* (L.) в Ципо-Ципиканских (Баунтовских) озерах (Забайкалье). Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии / Ж. Н. Дугаров, М.Д. Батуева, Т.Г. Бурдуковская // Материалы IV всероссийской конференции. – Улан-Удэ: Бурятский научный центр Сибирского отделения РАН, 2021. – С. 141-143.

Рыбы Телецкого озера / А.Н. Гундризер, Б.Г. Иогансен, В.В. Кафанова [и др.]. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1981. – 160 с.

Соусь, С.М. Паразиты рыб Новосибирской области / С.М. Соусь, А.А. Ростовцев. – Тюмень: Госрыбцентр, 2006. – 194 с.

Титова, С.Д. Паразиты рыб Телецкого озера / С.Д. Титова // Труды проблемных и тематических совещаний ЗИН. – Томск: Томский Гос. университет, 1954. – Вып. 4. – С. 70-84.

Фауна и экология паразитов рыб бассейна озера Малые Чаны / Т.А. Бочарова, Г.И. Гундризер, А.Н. Соусь [и др.] // Экология озера Чаны. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1986. – С. 108-117.

Фрезе, В.И. Метацеркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов центральной России / В.И. Фрезе. – Москва: Наука, 2002. – 260 с.

Шигин, А.А. Трематоды фауны России и сопредельных регионов. Род *Diplostomum*. Мариты / А.А. Шигин. – Москва: Наука, 1993. – 208 с.

Blast: Basic Logical Alignment Search Tool [Электронный ресурс] <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Hulsenbeck, J.P. Bayesian inference of phylogeny / J.P. Hulsenbek, F. Ronquist // *Bioinformatics*, 17, 2001. – P. 754-755.

Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stetcher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution*, 35, 2018. – P. 1547-1549.

Locke, S.A. Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes / S.A. Locke, S. Al-Nasiri F. S., M. Caffara // *International Journal for Parasitology*, 2015. – P. 841-855.

Steenkiste, V.N. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes) / V.N. Steenkiste, S.A. Locke, M. Castelin // *Mol Ecol Resource*, 2015. – P. 945-952.