

На правах рукописи

НЕБЕСНЫХ

Иван Александрович

**ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ DIPLOMONADIDA
В ЛОСОСЕВИДНЫХ РЫБАХ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ:
ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТЫ**

03.02.08 – экология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Иркутск – 2017

Работа выполнена на базе лаборатории ихтиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН).

Научный руководитель: **Деникина Наталья Николаевна**
кандидат биологических наук, доцент, с.н.с. лаборатории аналитической биоорганической химии ФГБУН Лимнологический институт СО РАН

Научный консультант: **Дзюба Елена Владимировна**
кандидат биологических наук, заведующий лабораторией ихтиологии ФГБУН Лимнологический институт СО РАН

Официальные оппоненты: **Смирнов Василий Васильевич**
доктор биологических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Байкальский музей Иркутского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук», Иркутская обл., пос. Листвянка

Соколов Сергей Геннадьевич
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фауны и экологии паразитов Центра паразитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (ИПЭЭ РАН), г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН», г. Улан-Удэ

Защита состоится 8 декабря 2017 г. в 16 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Иркутский государственный университет, аудитория 219.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» им. В.Г. Распутина по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124, и на сайте Иркутского государственного университета <http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=112>.

Отзыв просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет ИГУ. Тел. / факс: (3952) 241855; e-mail: dissovet07@gmail.com.

Автореферат разослан «___» октября 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



А. А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Diplomonadida – жгутиковые простейшие, известные как самые примитивные эукариоты, поскольку лишены характерных митохондрий, пероксисом и аппарата Гольджи [Keeling, Doolittle, 1997]. Многие аспекты биологии и экологии этих животных, включая специфичных хозяев, географические ареалы и патогенность различных видов мало изучены, что, прежде всего, связано с неточным определением родов и видов отряда Diplomonadida. В настоящее время разрабатываются надежные систематические критерии, предлагаемые для характеристики этой группы паразитических простейших. Среди представителей отряда Diplomonadida встречаются как обычные комменсалы пищеварительного тракта животных, так и патогенные организмы [Poynnton, Morrison, 1990; Jorgensen, Sterud, 2004 и др.]. Изучение их является весьма актуальным, особенно для аквакультуры, с целью разработки тонких методов диагностики протозойных инфекций для предотвращения гибели разводимых рыб.

Среди диплононад наиболее характерными и специфичными паразитами рыб являются представители рода *Spiroucleus*. Вызванные ими периодические вспышки заболеваний лососевых рыб приносят огромные убытки при индустриальном рыбоводстве [Jorgensen, Sterud, 2006; Guz, Puk, 2015]. В качестве симбионтов лососевидных рыб описаны три представителя этого рода: *Spiroucleus barkhanus*, *S. salmonicida* и *S. salmonis*. В настоящее время *S. barkhanus* относят к комменсалам пресноводных рыб, этот вид выделен из кишечника и желчного пузыря европейского хариуса *Thymallus thymallus*, сибирского хариуса *T. arcticus* и арктического гольца *Salvelinus alpinus*, в естественных условиях не вызывает заболевания рыб. *S. salmonis* локализуется в пилорических придатках и кишечнике хозяина, в аквакультуре может приводить к массовой гибели пресноводных лососевых рыб, таких, как радужная форель *Oncorhynchus mykiss*. *S. salmonicida* вызывает серьезные системные инфекции у выращиваемых в морской аквакультуре рыб (атлантический лосось *Salmo salar*, чавыча *Oncorhynchus tshawytscha* и радужная форель *O. mykiss*) [Mo et al., 1990; Kent et al., 1992; Sterud et al., 1998; Jorgensen, Sterud, 2006; Guz, Puk, 2015 и др.].

Несмотря на сравнительно высокий уровень изученности животных озера Байкал, данные о видовом составе паразитических простейших являются неполными [Заика, 1965; Тимошкин и др., 2001; Пронин, 2001; Русинек, 2007]. К настоящему времени в рыбах оз. Байкал зарегистрированы представители двух родов диплононад. Методы микроскопии позволили определить *Hexamita* sp. и *H. truttae* в пищеварительной системе байкальского омуля *Coregonus migratorius*, байкальских хариусов (Thymallidae), сибирского ельца *Leuciscus leuciscus*, налима *Lota lota*, а также у эндемичных коттоидных рыб: *Batrachocottus multiradiatus*, *Batrachocottus nikolskii*, *Cottocomephorus grewingkii*, *Limnocottus bergianus* [Заика, 1965; Пронин, 1981, 2001; Пугачев, 2001; Русинек, 2007]. Молекулярно-генетический анализ ассоциированной микрофлоры кишечника черного байкальского хариуса *Thymallus baicalensis* выявил генотип *S. barkhanus* [Белькова и др., 2008]. Лососевидные рыбы являются перспективными объектами для искусственного воспроизводства и акклиматизации в озерах и водохранилищах. В настоящий момент становится очевидной необходимость применения комплекса классических и молекулярно-генетических методов для детекции паразитических простейших отряда Diplomonadida в рыбах Восточной Сибири с учётом экологических особенностей рыб. Изучение диплононад послужит основой для подготовки рекомендаций по

профилактике заболеваний рыб в условиях искусственного содержания: в живых музейных экспозициях, при подращивании молоди и товарном производстве рыб в аквакультуре.

Цель исследования. Цель работы – изучить распространение и генетическое разнообразие Diplomonadida в лососевидных рыбах Восточной Сибири с учётом экологических особенностей рыб. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать систему молекулярно-генетической детекции представителей паразитических простейших отряда Diplomonadida в пищеварительной системе рыб.

2. Определить зараженность лососевидных рыб Восточной Сибири представителями Diplomonadida и выявить экологические характеристики рыб, которые могут являться факторами, влияющими на распространение инфекции и повышающими риск инвазии.

3. Определить генетическое разнообразие паразитических простейших отряда Diplomonadida в лососевидных рыбах Восточной Сибири.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Использование молекулярно-генетических методов для изучения представителей отряда Diplomonadida в пищеварительной системе различных видов рыб является решением проблемы их идентификации и исследования зараженности.

2. В составе микробиоценоза пищеварительной системы рыб родов *Thymallus* и *Coregonus* Восточной Сибири присутствует единственный вид отряда Diplomonadida – *S. barkhanus*. Вид представлен двумя генотипами, космополитным для лососевидных и родоспецифичным для сиговых рыб.

Научная новизна. В пищеварительной системе лососевидных рыб Восточной Сибири определён единственный представитель паразитических простейших Diplomonadida – вид *S. barkhanus*. Наряду с космополитным генотипом *S. barkhanus*, зарегистрированным ранее в лососевидных рыбах Голарктики, выявлен новый генотип, достоверно отличающийся по последовательности гена малой субъединицы рРНК, характерный для сиговых рыб. Установлено, что зараженность дипломонадами детерминирована морфофункциональными и экологическими особенностями рыб.

Практическая значимость полученных результатов. Разработанные системы молекулярно-генетической детекции позволяют диагностировать присутствие представителей паразитических простейших отряда Diplomonadida в пищеварительной системе рыб. В качестве основного объекта выбраны лососевидные рыбы, которые являются перспективными объектами для искусственного воспроизводства и акклиматизации в озерах и водохранилищах. Методические разработки детекции паразитических Diplomonadida могут быть рекомендованы к использованию для проведения профилактических мероприятий в аквакультуре.

Реализация и внедрение результатов исследования. Теоретические положения и результаты проведенных исследований использованы при подготовке научно-исследовательских отчетов по Программе РАН «Биологическое разнообразие»: № 27.13 «Исследование симбиотической и паразитической микрофлоры лососевидных рыб и закономерности ее формирования» (2009-2011 гг.) и № 30.9 «Микрофлора, ассоциированная с рыбами: биоразнообразие и экологическая безопасность» (2013-2015 гг.), интеграционному проекту СО РАН № 6 «Закономерности поведения байкальского омуля и гидроакустическая оценка динамики его популяций как ключевого промыслового вида» (2009-2011 гг.). Результаты исследований были использованы при составлении Государственного

доклада о состоянии и об охране окружающей среды Иркутской области в 2011 году (2012 г.), а также при составлении отчетов по бюджетной теме ФГБУН ЛИН СО РАН «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии на примере рыб, губок и ассоциированной с ними микрофлоры» (0345–2014–0002, № гос. рег. 01201353444).

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на международных и российских конференциях: Первой международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию со дня рождения М.А. Козлова «Современные зоологические исследования в России и сопредельных странах» (Чебоксары, 2011); II международной научно-практической конференции «Проблемы современной биологии» (Москва, 2011); VI международной конференции «Биология: от молекулы до биосферы» (Харьков, Украина, 2011); V Всероссийском с международным участием медико-биологическом Конгрессе «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012); VIII Международной научно-практической конференции «Наука и инновации – 2012» (Польша, 2012); Международной научно-практической конференции «Биологическое разнообразие – основа устойчивого развития» (Грозный, Махачкала, 2017).

Публикации. Результаты исследования опубликованы в 16 научных работах, из них 4 – статьи, из которых 2 из списка ВАК, одна коллективная монография и 11 – тезисы и материалы конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка литературы и трех приложений. Работа изложена на 127 страницах, содержит 8 таблиц, 24 рисунка. Список литературы включает 181 наименование, из которых 103 зарубежных издания.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н., доценту Н.Н. Деникиной и научному консультанту к.б.н. Е.В. Дзюба за помощь в организации и проведении исследований, к.б.н., доценту Н.Л. Бельковой, к.б.н. А.М. Мамонтову и к.б.н. Л.И. Черногор за ценные консультации, к.б.н. Н.А. Рожковой и к.б.н. И.В. Вейнберг за помощь в определении кормовых объектов рыб, сотрудникам лаборатории ихтиологии, аналитической биоорганической химии ЛИН СО РАН, зав. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов Института общей и экспериментальной биологии СО РАН д.б.н., профессору Н.М. Пронину, гл.н.с. Байкальского музея ИНЦ СО РАН д.б.н. О.Т. Русинек за оказанную помощь при выполнении работ и обсуждении результатов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Приведена характеристика представителей отряда Diplomonadida: эволюционное положение, филогения, таксономия, морфология, разнообразие мест обитания, жизненный цикл и размножение. Представлены данные по истории изучения представителей отряда Diplomonadida в рыбах, в том числе и рыбах Восточной Сибири, а также связанные с зараженностью патологии.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Характеристика объектов исследования и пробоподготовка

Отбор проб для исследования питания различных видов лососевидных рыб. В работе использованы материалы, полученные в августе 2009 г. и в сентябре 2010 г. на р. Чечуй (правый приток р. Лена). Рыб отлавливали жаберными сетями (ячей 32-40

мм) общей длиной 100 м. Исследовано питание у 42 экз. ленка, 82 экз. хариуса, 34 экз. сига-пыжьяна и 55 экз. валька.

Отбор проб рыб и кормовых организмов для исследования зараженности дипломонадами. Для отработки методики детекции дипломонад и исследования зараженности лососевидных рыб были взяты желчные пузыри и пробы разных отделов кишечника у свежевывловленных рыб. Всего исследовано: байкальского омуля прибрежной МЭГ – 58 экз., пелагической – 21, придонно- глубоководной – 41, байкальского озерного сига – 25, тугуна – 25, сига-пыжьяна – 30, черного байкальского хариуса – 240, белого байкальского хариуса – 28, косогольского хариуса – 13, байкалоленского хариуса – 89 и сибирского хариуса – 5 экз. Пробы разных отделов кишечника брали в лабораторных условиях непосредственно в лизирующий буфер с последующим выделением ДНК. Желчные пузыри фиксировали 70% этанолом и транспортировали в лабораторию. Часть желчных пузырей брали у свежемороженых рыб в лизирующий буфер с последующим выделением ДНК. В работе были использованы пробы из рыб сем. *Thymallidae* из оз. Байкал, Хубсугул (Монголия), р. Ангара и озер-истоков рек, впадающих в неё: Аршантай-Нур, Тухурен-Нур и Загасатай-Нур (Восточные Саяны), а также р. Чечуй (бассейн р. Лена) и р. Непа (бассейн р. Нижняя Тунгуска). Байкальский озерный сиг был собран в двух районах оз. Байкал, а сиг-пыжьян в реках Баргузин, Чечуй, Киренга и Непа. Сборы материалов по зараженности байкальского омуля выполняли при проведении гидроакустической съемки по учету ресурсов этого вида рыб 25 мая – 15 июня 2011 г. по всей акватории озера Байкал. Рыбы были собраны разноглубинным тралом РК-15/30 на различных глубинах. Проведено 20 контрольных тралений. Кроме байкальского омуля в период проведения гидроакустической съемки, были взяты эндемичные виды коттоидных рыб: два пелагических (малая голомянка *Comephorus dybowski* Korotneff, 1905 (17 экз.) и большая голомянка *Comephorus baicalensis* (Pallas, 1776) (5)) и три бенто-пелагических (длиннокрылая широколобка *Cottocomephorus inermis* (Jakowlew, 1890) (10), желтокрылка *Cottocomephorus grewingkii* (Dybowski, 1874) (58) и северобайкальская широколобка *Cottocomephorus alexandrae* Taliev, 1935 (60)). Общая карта мест сбора проб для анализа зараженности лососевидных рыб Восточной Сибири *S. barkhanus* представлена на рисунке 1.

Сбор проб доминирующих в пище рыб кормовых организмов (гастропод, личинок ручейников и амфипод) проводили с использованием легкого водолазного снаряжения в июле 2014 г. в районе пос. Большие Коты. Взято по 25 экз. в каждой группе беспозвоночных животных. Кроме этого, были собраны личинки сетеплетущих ручейников *Stenopsyche mormorata* Navas, 1920 – 25 экз. из р. Чечуй в сентябре 2010 г. Пробы фиксировали этанолом 70%.

2.2 Методы исследования

Биологический анализ. Первичную и камеральную обработку всех собранных рыб проводили по общепринятым в ихтиологии методикам [Чугунова, 1939; Правдин, 1966]. Для определения принадлежности особи байкальского омуля к конкретной МЭГ использовалась система морфологических признаков [Смирнов, 1983].

Методы изучения питания рыб. Материалы по питанию рыб обрабатывали в соответствии со стандартными количественно-весовыми методами [Руководство ..., 1961]. В лабораторных условиях взвешивали содержимое желудков (фиксированное в 70% этиловом спирте). Определяли кормовые объекты до вида. Относительное значение отдельных групп кормовых организмов в спектрах питания выражали в процентах частоты встречаемости, долях численности и массы отдельных

компонентов от их общего значения и внутри каждой группы беспозвоночных. Рассчитывали индексы наполнения желудков ($^0/_{000}$) и долю рыб с пустыми желудками (%). Для характеристики сходства пищевых спектров рыб применяли СП-коэффициент (или ИПС – индекс пищевого сходства) А.А. Шорыгина [1952], выражающий относительную степень совпадения состава пищи сравниваемых видов.

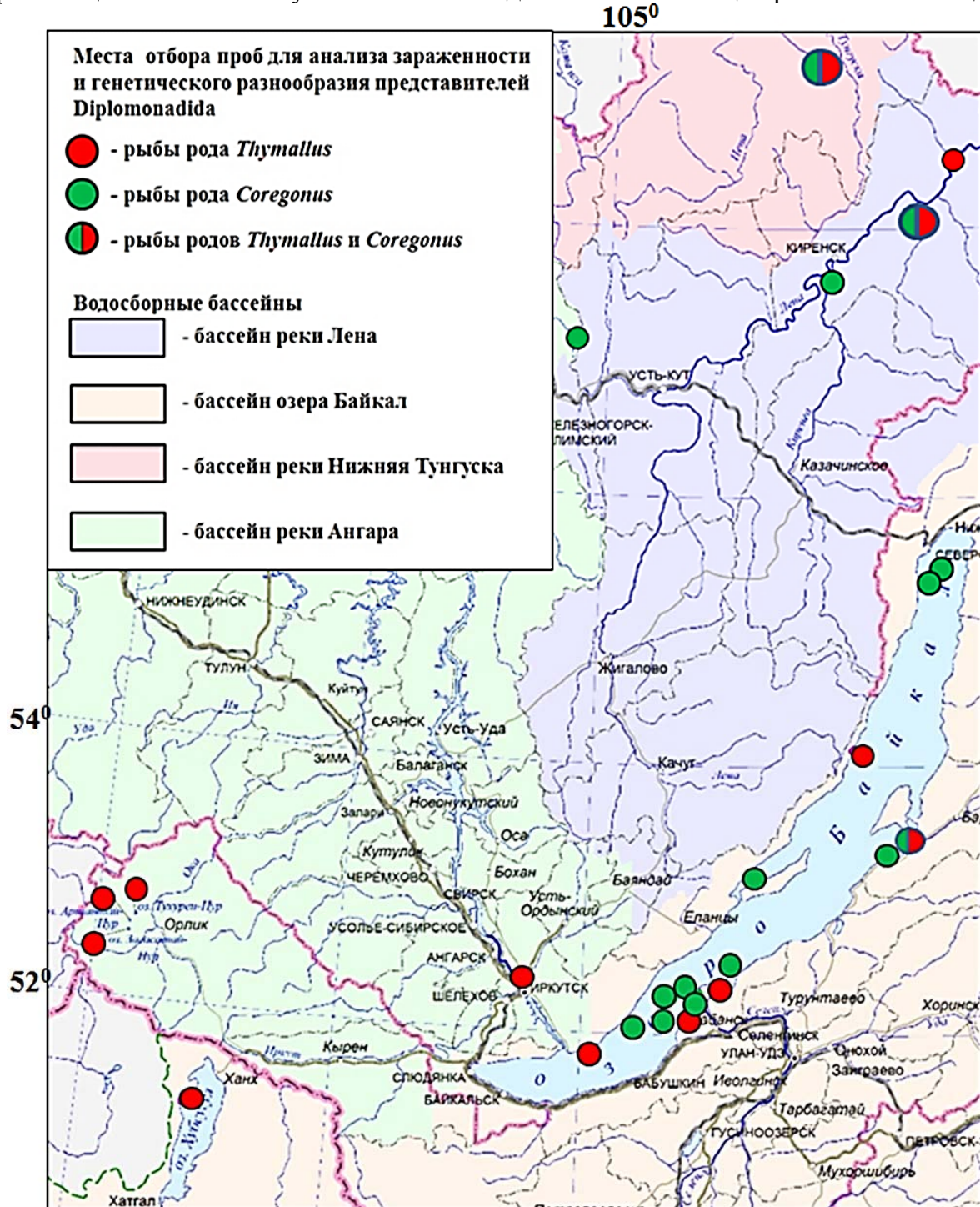


Рисунок 1. Карта сбора проб для определения зараженности лососевидных рыб Восточной Сибири *S. barkhanus*

Статистическая обработка. Оценку достоверности различий между выборками оценивали с помощью критерия хи-квадрат X^2 (с поправкой на непрерывность) [Лакин, 1990]. Статистическая обработка материала проведена в системе анализа R [Мастицкий, 2014].

2.2.1 Молекулярно-генетические методы

Выделение суммарной ДНК проводили двумя методами: на сорбентах с помощью наборов ДНК-сорб В и РИБО-сорб по инструкциям производителя (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) и химического лизиса с фенол-хлороформной экстракцией. Выделение плазмидной ДНК с исследуемым фрагментом проводили коммерческим набором AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, США).

Дизайн праймеров разного уровня специфичности на представителей *Diplomonadida* проводили на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена малой субъединицы рРНК в международных базах данных. Для диагностики присутствия ДНК диплонад в качестве праймерных использовали участки, консервативные для эукариот (DpFun-DpR). При этом специфичность целевых ампликонов обеспечивается разницей в длине фрагмента исследуемого гена у диплонад (~450 п. н.) и прочих эукариотических организмов (~630 п. н. и более). Амплификацию фрагментов гена малой субъединицы рРНК *S. barkhanus* проводили с использованием видоспецифичных праймеров, разработанных и апробированных в настоящем исследовании (табл. 1, рис. 2).



Рисунок 2. Схема размещения праймеров на последовательности гена малой субъединицы рРНК

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в стандартной реакционной смеси. Использовали следующие режимы реакции: DpFun/DpR: 94°C – 15"; 65°C – 20"; 72°C – 30"; DPSF/DpR1+: 94°C – 15"; 68°C – 15"; 72°C – 15"; DPSF/Sp+R: 94°C – 15"; 68°C – 15"; 72°C – 30"; Sp+1F/DpR1+: 94°C – 15 с; 68°C – 15 с; 72°C – 30 с. 35 циклов, в первом цикле денатурацию проводили в течение 5 мин. Использовали термоциклеры: Techne (Progene, Англия); BioRad (США) и БисН (Россия).

Таблица 1. Пары праймеров, использованные в работе

Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Длина ампликона (п.н.)
DPFUN 5'-GCCAGCAGCCGCGGTAATTCC	DPR 5'-AGCCGCAGACTCCACRTCT	450
DPSF 5'-CAGCCGCGGTAATTCCGACAC	DPR1+ 5'-AGCCGCAGACTCCACGTCTGGTGG	450
DPSF 5'-CAGCCGCGGTAATTCCGACAC	Sp+R 5'-GCAGCCTTGTTACGACTTCTCC	984
Sp+1F 5'-GCCATGCATGCCTATGTGTAGAC	DpR1+ 5'-AGCCGCAGACTCCACGTCTGGTGG	881

Анализ продуктов амплификации проводили разделением фрагментов ДНК в 1,5% агарозном геле в 1×ТА буфере с окрашиванием бромидом этидиума. Полосы, соответствующие целевым продуктам, вырезали и экстрагировали из геля методом замораживания-оттаивания. Водную фазу, содержащую ампликоны использовали для секвенирования или лигирования.

Лигирование ампликонов, полученных с парой праймеров DpFun/DpR, проводили с помощью набора GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва). Трансформацию проводили с компетентными клетками *Escherichia coli* (штаммы XL-1 и DH-5L), полученными по методике с CaCl₂ [Sambrook et al., 1989]. Скрининг колоний после лигирования основан на прямой положительной селекции клонов, содержащих вставку целевого ампликона.

Секвенирование, идентификация нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ. Секвенирование проводили на автоматических секвенаторах: ABI310A и ABI 3130xl (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, США). Сравнительный анализ последовательностей проводили с помощью пакета программы FASTA (URL: <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>) и BLAST (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), на наличие химерных структур проверяли программой Pintail (URL: <http://www.bioinformatics-toolkit.org/Web-Pintail/>). Филогенетический анализ проводили отдельно для фрагментов гена малой субъединицы рРНК 450 п.н. и 1430 п.н. В филогенетическом анализе использовали опубликованные последовательности генов малой субъединицы рРНК *S. barkhanus*, *S. salmonicida*, *S. torosa*, *S. salmonis* и *S. vortens*. Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы MAFFT v 6.882b [Kato, Toh, 2008]. Байесовский анализ проводили с помощью программы MrBayes v. 3.2.1. [Ronquist, Huelsenbeck, 2003] с использованием параметра «mixed». Марковские цепи Монте-Карло запускали дважды (параметр по умолчанию) по 2000000 генераций. Из анализа исключали первые 20000 деревьев, считая их неустойчивыми.

2.2.2 Методы микроскопического анализа

Световая микроскопия. Препараты из свежих тканей кишечника черного байкальского хариуса окрашивали по Романовскому-Гимзе и фотографировали с помощью световых микроскопов Axiovert 200 и AxioStar plus (Zeiss, Германия). Использовали объектив с увеличением $\times 100$.

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ЛОСОСЕВИДНЫХ РЫБ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ ОТРЯДА DIPLOMONADIDA

3.1. Разработка и апробация метода молекулярно-генетической детекции представителей отряда Diplomonadida

В настоящее время в рыбах описаны 5 видов Diplomonadida: *S. barkhanus*, *S. salmonicida*, *S. salmonis*, *S. torosa* и *S. vortens*. Разработаны системы видоспецифичной амплификации, однако при исследовании дипломонад в рыбах они оказались малоэффективными. Во-первых, неизвестна видовая принадлежность в связи с недостатком корректной информации, следовательно, необходима система детекции дипломонад, как крупного таксона. Во-вторых, Diplomonadida имеют тонкую легко разрушающуюся клеточную оболочку. С учетом агрессивности окружающей среды (пищеварительные ферменты и др.) и удаленности мест сбора полевого материала, это обстоятельство требует быстрой, простой и качественной пробоподготовки. В противном случае ДНК деградирует до мелких фрагментов.

Разработанный и апробированный в настоящей работе метод молекулярно-генетической детекции представителей отряда Diplomonadida в рыбах основан на применении универсальных праймеров (DpFun/DpR) к фрагменту гена малой субъединицы рРНК эукариотических организмов. Дипломонады имеют стандартную для эукариот структуру рибосомного оперона, но размеры генов малой и большой субъединиц рРНК значительно меньше и сравнимы с прокариотическими. Это обстоятельство позволяет разделять целевые ампликоны (~ 450 п.н.) и фрагменты ДНК хозяина и кормовых объектов (~630 п. н. и более) при электрофорезе в агарозном геле. Метод обладает рядом преимуществ по сравнению с ранее принятыми в детекции дипломонад методами микроскопии: сбор и первичная пробоподготовка образцов в полевых условиях, приемлемые требования к хранению и транспортировке, возможность проведения серийных анализов, экономичность и

воспроизводимость. Определение видовой принадлежности представителей *Diplomonadida* методами микроскопии требует длительной дорогостоящей пробоподготовки и соответствующего оборудования (трансмиссионный микроскоп). Доступная световая микроскопия, к сожалению, такой информации не дает. Небольшая величина амплифицируемого фрагмента ДНК, с одной стороны, позволяет получать целевые ампликоны даже из замороженных и фиксированных спиртом образцов, с другой стороны, достаточна для определения видовой принадлежности диплонада при анализе нуклеотидной последовательности.

В процессе апробации метода в проанализированных образцах был выявлен единственный вид *Diplomonadida* – *S. barkhanus*, после чего диагностическая система праймеров была оптимизирована. Праймеры DPSF/DpR1+ более специфичны и их применение позволяет увеличить выход целевого ампликона по сравнению с фрагментом ДНК хозяина и кормовых объектов (рис. 3). Эти же праймеры в парах Sp+1F/DpR1+ и DPSF/DpR1+ были использованы при получении длинных ампликонов для определения последовательности гена малой субъединицы рРНК.

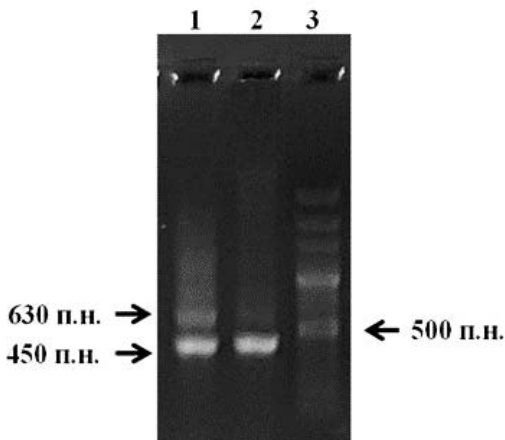


Рисунок 3. Пример электрофореграммы продуктов амплификации ДНК *S. barkhanus* из желчного пузыря черного байкальского хариуса на парах праймеров разной специфичности: 1 – DpFun/DpR; 2 – DPSF/DpR1+; 3 – маркер молекулярного веса

Далее в анализе использовали двустадийную ПЦР: для обогащения ДНК *S. barkhanus* первый раунд проводили на паре специфичных праймеров Sp+1F/ Sp+R, фланкирующих фрагмент гена малой субъединицы рРНК длиной 1420 п.н., после чего проводили следующий раунд на паре праймеров DPSF/DpR1+. В качестве матрицы во втором раунде использовали реакцию смесь, полученную в результате первого раунда ПЦР. Дополнительный этап анализа позволил значительно очистить целевой ампликон от аналогичного фрагмента ДНК хозяина (рис. 4).

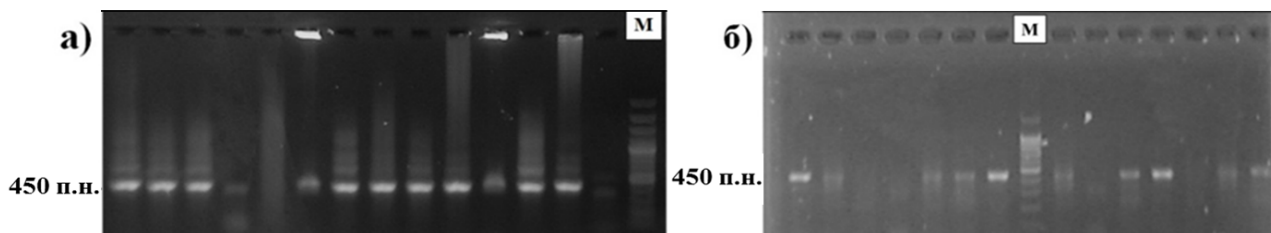


Рисунок 4. Пример электрофореграммы продуктов амплификации ДНК *S. barkhanus* из желчного пузыря черного байкальского хариуса, оз. Байкал: а) DPSF/DpR1+; б) двустадийная ПЦР Sp+1F/ Sp+R, DPSF/DpR1+; М – маркер молекулярного веса

В результате разработки и апробации системы молекулярно-генетической детекции диплонадов были определены основные требования к транспортировке и хранению образцов, пробоподготовке и выделению ДНК. Оптимальным условием получения проб качественной ДНК является непосредственное выделение ДНК из образцов свежевывловленных рыб без консервации и хранения. При этом важно, чтобы все операции проводились быстро во избежание нагревания рыб. Если отбор проб проводят в полевых условиях, желчные пузыри необходимо извлечь из

свежевыловленной рыбы, не допуская ее нагревания на воздухе, и немедленно фиксировать этанолом. Транспортировать фиксированные пробы желчных пузырей необходимо в охлажденном виде.

При выделении ДНК необходимо учитывать присутствие в образце клеток хозяина и по возможности минимизировать их лизис. С этой целью желчные пузыри необходимо вскрывать и лизис проводить достаточно быстро (5-10 мин). По возможности, в случае крупных наполненных желчных пузырей, их желателно разрезать, содержимое перенести в другую пробирку и только потом приступать к выделению ДНК. Необходимо отметить, что количество и локализация ДНК *S. barkhanus* у зараженных рыб может различаться: так, при анализе разных отделов кишечника у различных особей в некоторых случаях положительными были пробы заднего кишечника, в некоторых – переднего, иногда только желчного пузыря. По-видимому, это зависит от времени, прошедшего с последнего приема пищи и от прочих факторов (в частности, какие именно кормовые объекты употребляла рыба, насколько активно питалась и двигалась, и многих других факторов). Следует также отметить, что диагностика по пробам кишечника крайне затруднительна по причине значительного количества бактериальной ДНК, создающей мощный фон и не позволяющей проводить прямую идентификацию полученного ампликона. Для установления принадлежности ДНК к конкретному виду диплоноад требуется дополнительная стадия клонирования анализируемого ампликона. Для оценки зараженности диплоноадами в дальнейших исследованиях использовали только желчные пузыри рыб. Очевидно, что такой анализ может давать ложноотрицательные результаты, однако оценка даже минимальных показателей зараженности позволяет проводить мониторинг представленности и распространения паразитических простейших отряда Diplomonadida в рыбах Восточной Сибири.

3.2. Определение зараженности рыб сем. *Thymallidae* представителями отряда *Diplomonadida*

Ареал представителей рода *Thymallus* занимает большую территорию несвязанных между собой бассейнов рек и озер Палеарктики и Неарктики. Диагностическая система праймеров, позволяющая амплифицировать нуклеотидные последовательности фрагментов гена малой субъединицы рРНК диплоноад длиной 450 п.н., была апробирована в работе по оценке зараженности диплоноадами представителей сем. *Thymallidae*. Обнаружен ярко выраженный тренд зараженности хариусов в водосборном бассейне р. Ангара: минимальная в оз. Хубсугул (38,5%), в р. Баргузин и оз. Байкал значительная (80,0 и 85,2% соответственно) и максимальная в р. Ангара (100%) (рис. 4-6).

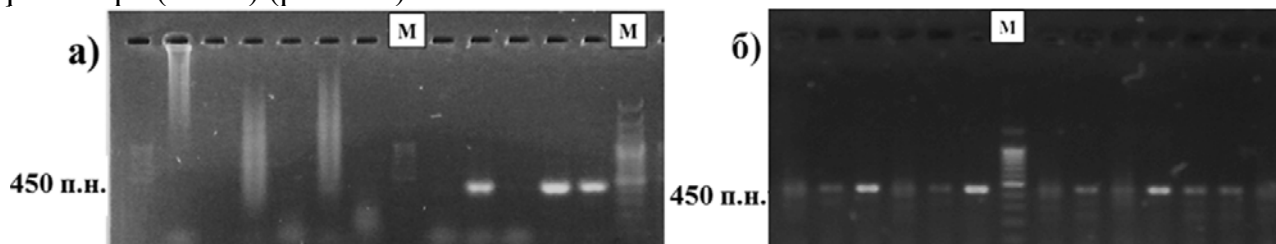


Рисунок 5. Пример электрофореграммы продуктов амплификации ДНК *S. barkhanus* из желчного пузыря: а) косокольского хариуса, оз. Хубсугул; б) черного байкальского хариуса, р. Ангара. М – маркер молекулярного веса

Исходя из предположения, что цисты диплоноад лучше сохраняются и/или «захораниваются» в илистых грунтах (д.б.н. Русинек О.Г., личное сообщение),

логично было ожидать большую зараженность у белого байкальского хариуса, предпочитающего илистые грунты и обитающего преимущественно на Селенгинском мелководье, чем черного байкальского хариуса, основные места нагула которого расположены в прибрежной зоне озера с каменистыми грунтами. Однако различий выявлено не было. По-видимому, концентрация жизнеспособных цист дипломанад не зависит от структуры и состава грунта.

В озерах Восточных Саян Аршантай-Нур, Тухурен-Нур и Загасатай-Нур, являющихся истоками рек, впадающих в Оку – приток р. Ангара, зараженность средняя (табл. 2, рис. 5, 6). Для сравнительной оценки зараженности рыб рода *Thymallus* в водоемах Восточной Сибири анализировали хариусов, отловленных в р. Чечуй (водосборный бассейн р. Лена) и в р. Непа (р. Нижняя Тунгуска). Зараженность рыб в этих реках оказалась наименьшей – 24 и 20% соответственно (табл. 2, рис. 6).

Таблица 2. Зараженность представителей рода *Thymallus* в разных водосборных бассейнах Восточной Сибири.

Вид	Место сбора	Кол-во экз.	Зараженность экз.; %
Черный байкальский хариус	р. Ангара	60	60; 100
	оз. Загасатай-Нур	42	21; 50
	оз. Аршантай-Нур	18	11; 61,1
	оз. Тухурен-Нур	16	10; 62,5
	оз. Байкал	40	34; 85*
	оз. Байкал: пос. Большие Коты	54	46; 85,2*
Белый байкальский хариус	оз. Байкал: р-н дельты р.Селенга	28	24; 85,7
Черный байкальский хариус	р. Баргузин	10	8; 80
Косогольский хариус	оз. Хубсугул	13	5; 38,5
Байкалоленский хариус	р. Чечуй	89	22; 24*
Сибирский хариус	р. Непа	5	1; 20

Примечание. * – значение достоверно отличается от других выборок ($p < 0.05$).

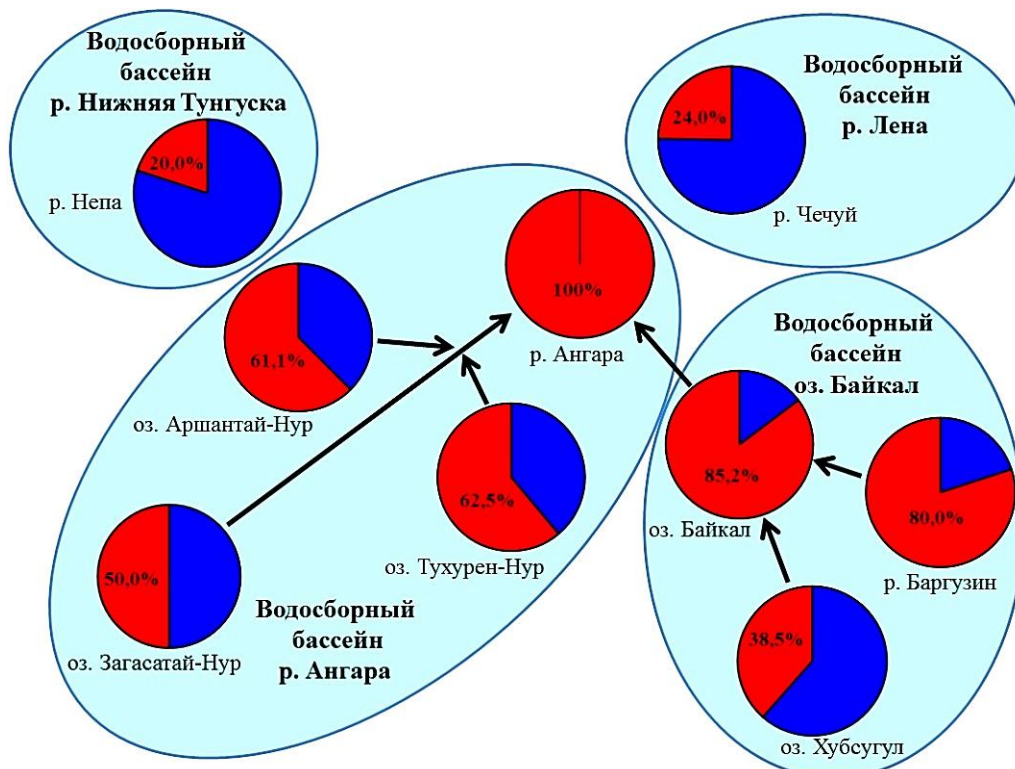


Рисунок 6. Зараженность представителей рода *Thymallus* в разных водосборных бассейнах Восточной Сибири

3.3. Детекция *Diplomonadida* у байкальского омуля

Результаты молекулярно-генетической детекции представителей отряда *Diplomonadida* у байкальского омуля выявили парадоксальную картину зараженности. Исходя из того, что сезонные миграции байкальского омуля прибрежной и придонно-глубоководной МЭГ предусматривают достаточно большое пространственное пересечение с черным байкальским хариусом, имеющим высокую зараженность, логично было ожидать максимальную зараженность у этих групп. Однако положительный результат на наличие представителей отряда *Diplomonadida* получен для 17 из 58 особей прибрежной МЭГ, 14 из 41 придонно-глубоководной и 16 из 20 пелагической, что составляет 29, 34 и 80% соответственно (рис. 7).

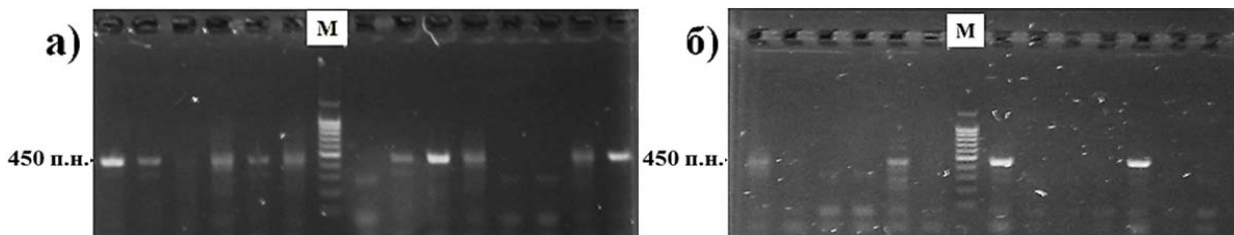


Рисунок 7. Пример электрофореграммы продуктов амплификации ДНК *S. barkhanus* из желчного пузыря байкальского омуля: а) пелагической и б) прибрежной МЭГ. М – маркер молекулярного веса

Полученные результаты сравнительного анализа зараженности байкальского омуля показали, что наибольшая доля инфицированных особей (80%) отмечена у рыб пелагической МЭГ. Это, вероятно, обусловлено различиями в питании рыб разных МЭГ. Байкальский омуль – эврифаг, в годовом рационе разных популяций сходные организмы. При этом у омуля пелагической (многотычинковой) МЭГ преобладает зоопланктон (эпишура байкальская), у прибрежно-пелагической (среднетычинковой) – донные амфиподы, а у придонно-глубоководной (малотычинковой) – макроектопус и молодь коттоидных рыб [Волерман, Конторин, 1983; Смирнов и др., 2009]. У омуля пелагической МЭГ индекс длины жаберной дуги (в % от длины головы) с возрастом уменьшается до 53,5%, что при большом количестве жаберных тычинок обеспечивает формирование своеобразного «жаберного сита», позволяющего отфильтровывать мелкие пищевые объекты. У представителей придонно-глубоководной МЭГ индекс длины жаберной дуги на 6-7% больше. Длинная жаберная дужка при наименьшем количестве коротких жаберных тычинок и соответствующем увеличении расстояния между ними обеспечивает больший ток воды через жаберный аппарат при схватывании крупных пищевых объектов [Смирнов и др., 2009].

Представители рода *Spironucleus*, паразитирующие в рыбах, имеют прямой жизненный цикл с двумя этапами: неподвижные цисты в воде и подвижные трофозоиты в рыбе. Цисты – устойчивые стадии жизненного цикла дипломонад, способные выжить вне организма хозяина [Kulda et al., 1978; Brugerolle, Lee, 2002; Woo, 2006]. Их размеры от 0,3 до 13 мкм в диаметре. Исследования жизненного цикла не проводились, но предполагается, что цисты выходят из рыбы с фекалиями, проводят некоторое время в воде, а затем с водой и пищей попадают в нового хозяина [Woo, 2006]. Трофозоиты паразитических видов являются подвижными стадиями, активно питаются и размножаются в просвете кишечника. Они не могут долго существовать вне хозяина (от 15-30 мин. у *S. salmonis* до четырех часов у *S. salmonicida* [Kent et al., 1992]). Однако в работах по экспериментальному

заражению рыб была доказана возможность прямой передачи инвазии в больших скоплениях рыб [Guo, Woo, 2004].

Поскольку байкальский омуль в весенний период формирует крупные скопления высокой плотности, а трофозоиты *S. barkhanus* способны выживать в пресной воде, существует высокая вероятность прямого инфицирования ими рыб. Средняя длина тела трофозоитов составляет 15,6 мкм (11,0-20,0), а средняя ширина 9,4 мкм (6,0-14,0) [Sterud et al., 1997]. Длина жгутиков может превышать размеры тела в 1,5-2,0 раза, т.е. общая длина свободно двигающегося трофозоида со жгутиками достигает более 60 мкм [Woo, 2006]. Вероятно, байкальский омуль пелагической МЭГ способен отфильтровывать их на жаберном сите и заглатывать вместе с основным кормовым объектом эпишурой, минимальная длина тела науплиальных стадий которой составляет от 100 мкм [Атлас ..., 1995]. Таким образом, заражение байкальского омуля пелагической МЭГ более вероятно, чем представителей других МЭГ.

3.4. Детекция *S. barkhanus* у прибрежно-пелагических и пелагических коттоидных рыб оз. Байкал

Для выявления возможного обмена паразитами между байкальским омулем и другими видами рыб в пелагиали оз. Байкал был проведен скрининг прибрежно-пелагических и пелагических коттоидных рыб на присутствие *S. barkhanus*. Необходимость этих экспериментов продиктована следующими обстоятельствами: 1) в открытой пелагиали оз. Байкал обитают пять эндемичных видов Cottoidei: большая и малая голомянки – истинно пелагические виды; три бенто-пелагических вида рода *Cottocomephorus* (длиннокрылая широколобка, желтокрылка и северобайкальская широколобка) и байкальский омуль [Атлас..., 2002]. Места обитания этих видов коттоидных рыб совпадают с таковыми байкальского омуля в зимне-весенний период; 2) пищевые спектры этих видов схожи с пищевым спектром байкальского омуля в нагульный период и включают в себя зоопланктон: эпиштуру байкальскую и макрогектопуса; 3) бенто-пелагические коттоидные рыбы нерестятся в прибрежной зоне оз. Байкал, где обитает черный байкальский хариус. Есть данные о находке *Hexamita* в желтокрылке [Заика, 1965]. Поскольку видовая принадлежность, определенная в 1965 г., в свете пересмотренной классификации достаточно неоднозначна, а указанная локализация – кишечник и желчный пузырь – соответствует *S. barkhanus*, анализ был необходим. Все перечисленные выше экологические особенности коттоидных рыб, обитающих в пелагиали озера, позволяют предположить наличие у них дипломонад, ранее обнаруженных у черного байкальского хариуса и байкальского омуля. Для проведения диагностического скрининга использовали образцы желчных пузырей обоих полов голомянок, длиннокрылой широколобки, желтокрылки и северобайкальской широколобки. Проведенный анализ не выявил присутствия ДНК *S. barkhanus* в исследованных образцах ДНК. Обнаружение *Hexamita* в желтокрылке [Заика, 1965] и отсутствие *S. barkhanus* в наших пробах можно объяснить тем, что взятые на исследование рыбы сильно различались. В цитируемой работе указаны следующие места сбора рыб: исток Ангары, пос. Листвянка, зал. Большие Коты и пос. Голоустное. Скорее всего для паразитологического анализа были взяты рыбы из прибрежной зоны оз. Байкал. Желтокрылка является наиболее многочисленным представителем ихтиоценоза мелководной зоны. В пределах вида выделяют три одновременно нерестующих популяции (стада): мартовская, майская и августовская [Талиев, 1955; Коряков, 1972]. Желтокрылка в качестве субстрата для нереста использует многоярусные каменистые

грунты в прибрежной зоне озера. В зависимости от сроков нереста и температурного режима в период развития икринок у разновременно нерестующих стад желтокрылки инкубационный период развития кладок составляет от 20 до 80-90 суток. С момента нереста до самого выхода из неё личинок кладку оберегает самец. Большинство самцов после периода охраны кладок погибают. Данная зона является основным местом нагула черного байкальского хариуса, зараженность которого достигает 85,2%. Мы предполагаем, что пробы желтокрылки, в которых отмечено наличие *Hexamita* [Заика, 1965] были взяты в период нахождения рыб на нерестилищах, поэтому в открытой пелагиали озера в нагульных особях желтокрылки *S. barkhanus* не был детектирован. Возможно и другое объяснение: поскольку более ранние данные [Заика, 1965] были получены с использованием методов световой микроскопии, отнесение дипломонад лососевых и коттоидных рыб к одному виду требует проведения дополнительных исследований с использованием молекулярно-генетических методов, так как в коттоидных рыбах могут присутствовать дипломонады другого вида (или видов), отличные от *S. barkhanus*.

3.5. Детекция *S. barkhanus* у других видов лососевидных рыб Восточной Сибири

В работе также определяли зараженность байкальского озерного сига, сига-пыжьяна, тугуна, ленка и валька из оз. Байкал и других водоемов и водотоков Восточной Сибири (табл. 3). В проанализированных образцах, так же, как в байкальском омуле и черном байкальском хариусе, был обнаружен единственный вид дипломонад – *S. barkhanus*. Поскольку выборки непрезентативные, однозначные выводы о реальных масштабах зараженности сделать затруднительно. Тем не менее, можно с уверенностью утверждать, что зараженность сигов существенно ниже, чем у хариусов и байкальского омуля (табл. 3). Данные по зараженности ленка и валька также можно считать предварительными. Они были получены с применением только одного метода выделения ДНК на сорбенте.

Таблица 3. Зараженность лососевидных рыб в разных водосборных бассейнах Восточной Сибири

Вид	Место сбора	Кол-во экз.	Зараженность, экз.; %
Байкальский озерный сиг	оз. Байкал: Малое море	15	3; 20
	оз. Байкал: Баргузинский залив	10	1; 10
Тугун	р. Непа	3	0; 0
	р. Чечуй	15	2; 13,3
	р. Киренга	7	1; 14,2
Сиг-пыжьян	р. Баргузин	8	1; 12,5
	р. Непа	1	0; 0
	р. Чечуй	19	0; 0
	р. Киренга	2	0; 0
Ленок	р. Чечуй	24	10; 41,5
Валек	р. Чечуй	11	6; 54,6

3.6. Краткая характеристика пищевых взаимоотношений лососевидных рыб реки Чечуй

Подробное исследование пищевых взаимоотношений лососевидных рыб в р. Чечуй было обусловлено необходимостью выявления взаимосвязи зараженности их представителями Diplomonadida. Река Чечуй по классификации Дж. Иллиеса и Л. Ботошениану [Illies, Botosaneanu, 1963] река относится к разряду лососевых, так как является местом размножения и нагула ценных видов лососевидных рыб: ленка *Brachymystax lenok* (Pallas, 1773), байкалоленского хариуса *Thymallus baicalolenensis*

Matveev, Samusenok, Pronin et Telpukhovsky, 2005, сига-пыжьяна *Coregonus pidschian* (Gmelin, 1789) и валька *Prosopium cylindraceum* (Pallas, 1784).

Основой питания **байкалоленского хариуса** являлись амфибиотические насекомые и другие членистоногие, принадлежащие к различным отрядам (Trichoptera (табл. 4), Chironomidae, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Aranei, Lepidoptera, Diptera, Plecoptera, Ephemeroptera, Cicadidae, Hydracarina и Heteroptera) (76,0% по массе). Доля личинок ручейников составляла 19,4%. Дополнением к пище служили личинки веснянок сем. Capniidae, поденок сем. Heptageniidae и двукрылых сем. Tabanidae. В меньшей степени представлены гастроподы (0,7%). Средний индекс наполнения желудков $90,95^{0/000}$. Основу питания **валька** составляли амфибиотические насекомые (95,1%) относящиеся к различным отрядам Trichoptera (табл. 4), Chironomidae, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Aranei, Lepidoptera, Plecoptera, Diptera, Ephemeroptera, Cicadidae, Hydracarina и Heteroptera. Доля личинок ручейников составляла 4,9%. Дополнением к пище служили личинки поденок Ephemeroptera, веснянок сем. Perlodidae, хирономид Chironomidae и мокреца Ceratopogonidae. Средний индекс наполнения желудков $30,62^{0/000}$. Доля личинок ручейников в пищевом спектре **сига-пыжьяна** составляла 56,2%. Также в большом количестве отмечены амфибиотические насекомые (33,9%). Дополнением к пище служили личинки поденок Ephemeroptera, веснянок сем. Perlodidae, хирономид Chironomidae. Средний индекс наполнения желудков $53,02^{0/000}$. Основу питания **ленка** составляла рыбная пища (пестроногий подкаменщик *Cottus poecilopus*) (57,6%). Доля личинок ручейников составляла 14,8%. Дополнением к пище служили личинки поденок Ephemeroptera, веснянок сем. Perlodidae, мошки сем. Simuliidae, двукрылых сем. Limoniidae и Tabanidae (27,6%). Средний индекс наполнения желудков $107,91^{0/000}$.

Таблица 4. Встречаемость видов ручейников в желудках разных видов рыб, %

Ручейники	Хариус	Ленок	Валёк	Сиг
<i>Rhyacophila impar</i>	5,7	8,7	0	25,0
<i>Glossosoma</i> sp.	8,6	0	25,0	25,0
<i>Arctopsyche ladogensis</i>	11,4	21,7	43,8	50,0
<i>Hydropsyche nevae</i>	5,7	0	25,0	0
<i>Stenopsyche marmorata</i>	34,3	43,5	56,3	50,0
<i>Apatania crymoiphila</i>	91,4	100	68,7	100
<i>A. stigmatella</i>	5,7	0	0	0
<i>Apatania</i> sp.	17,1	0	12,5	50,0
<i>Limnephilus</i> sp. ₁	5,7	0	25,0	0
<i>Limnephilus</i> sp. ₂	0	0	6,25	0
<i>Brachycentrus americanus</i>	22,9	13,0	31,3	0
<i>Ceraclea annulicornis</i>	2,9	0	0	0
<i>Oecetis</i> sp.	0	4,3	0	0

Сравнительный анализ питания исследуемых видов показал, что степень их пищевого сходства колеблется от 32,5 до 80,9%. Высокий индекс пищевого сходства (80,9%) отмечается у хариуса и валька, за счет питания их амфибиотическими насекомыми. Значительное снижение степени сходства состава пищи у ленка и валька (32,5%) происходит за счет потребления рыбной пищи ленок и доминированием амфибиотических насекомых в пище валька. В период массового вылета имаго насекомых, последние становятся доминирующими кормовыми объектами рыб, что приводит к перекрыванию их пищевых спектров и повышению индекса пищевого сходства. Полученные материалы по питанию рыб показывают, что основой пищи

байкалоленского хариуса, валька, сига-пыжьяна и ленка являются амфибиотические насекомые. У всех перечисленных видов рыб личинки ручейников могут составлять до 100% пищевого комка. В желудках рыб было зарегистрировано 13 таксонов видового и родового уровней ручейников из семейств: Apataniidae, Arctopsychidae, Brachycentridae, Glossosomatidae, Hydropsychidae, Leptoceridae, Limnephilidae, Rhyacophilidae и Stenopsychidae (табл. 4). Постоянными компонентами пищи всех рыб являются личинки *A. crymoiphila* и сетеплетущих ручейников *A. ladogensis* и *S. mormorata*. Такие виды как *B. americanus*, *Glossosoma* sp., *H. nevae* и *Limnephilus* sp. могут встречаться в желудках отдельных рыб в значительном количестве. Остальные виды являются случайными компонентами в пище рыб. Полученные данные свидетельствуют о динамичности пищевых взаимоотношений лососевидных рыб; конкуренция между видами ослабляется как за счет питания наиболее массовой группой кормовых организмов, так и в результате расхождения пищевых спектров при питании разными группами бентоса. Подробное исследование пищевых взаимоотношений лососевидных рыб в р. Чечуй для выявления взаимосвязи зараженности их представителями Diplomonadida позволило установить кормовой объект, присутствовавший в пище всех видов рыб – личинки *S. mormorata*. Результаты детекции в них дипломонад приведены в следующей главе.

3.7. Детекция *S. barkhanus* у кормовых объектов лососевидных рыб Восточной Сибири

Для выявления взаимосвязи зараженности черного байкальского хариуса представителями Diplomonadida с его питанием были проанализированы основные группы беспозвоночных животных, доминирующие в желудках рыб. Можно предположить, что беспозвоночные животные – кормовые объекты рыб заглатывают или отфильтровывают цисты дипломонад в процессе питания. Также возможно налипание цист на домики или сети личинок ручейников и на обрастания раковин моллюсков. Разработанная система не апробирована на цистах дипломонад. Учитывая сложность выделения ДНК из цист других паразитов, в частности паразитических червей, трудно было ожидать положительных результатов. Однако была сделана попытка проанализировать беспозвоночных животных на присутствие ДНК *S. barkhanus*.

Анализ проб, доминирующих в пище рыб оз. Байкал кормовых организмов, принадлежащих к разным систематическим группам животных не выявил присутствия ДНК *S. barkhanus*. Полученные материалы по питанию рыб в р. Чечуй показывают, что основой пищи байкалоленского хариуса, валька, сига-пыжьяна и ленка являются амфибиотические насекомые. Личинки сетеплетущих ручейников *S. mormorata* в большом количестве присутствовали в пище всех рыб (табл. 4). Проведенный анализ с помощью разработанной молекулярно-генетической системы детекции 25 экз. *S. mormorata* также не выявил присутствия ДНК *S. barkhanus*.

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ *S. BARKHANUS* В ЛОСОСЕВИДНЫХ РЫБАХ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

Анализ всех отсеквенированных коротких ампликонов длиной 450 п.н., полученных с использованием пар праймеров DpFun/DpR и DPSF/DpR1+, выявил лишь *S. barkhanus*. Других представителей рода *Spironucleus* в исследованных рыбах обнаружено не было. На кладограмме все анализируемые последовательности с

вероятностью 100% сгруппированы со *S. barkhanus*, полученными из лососевых рыб из различных мест обитания (рис. 8).

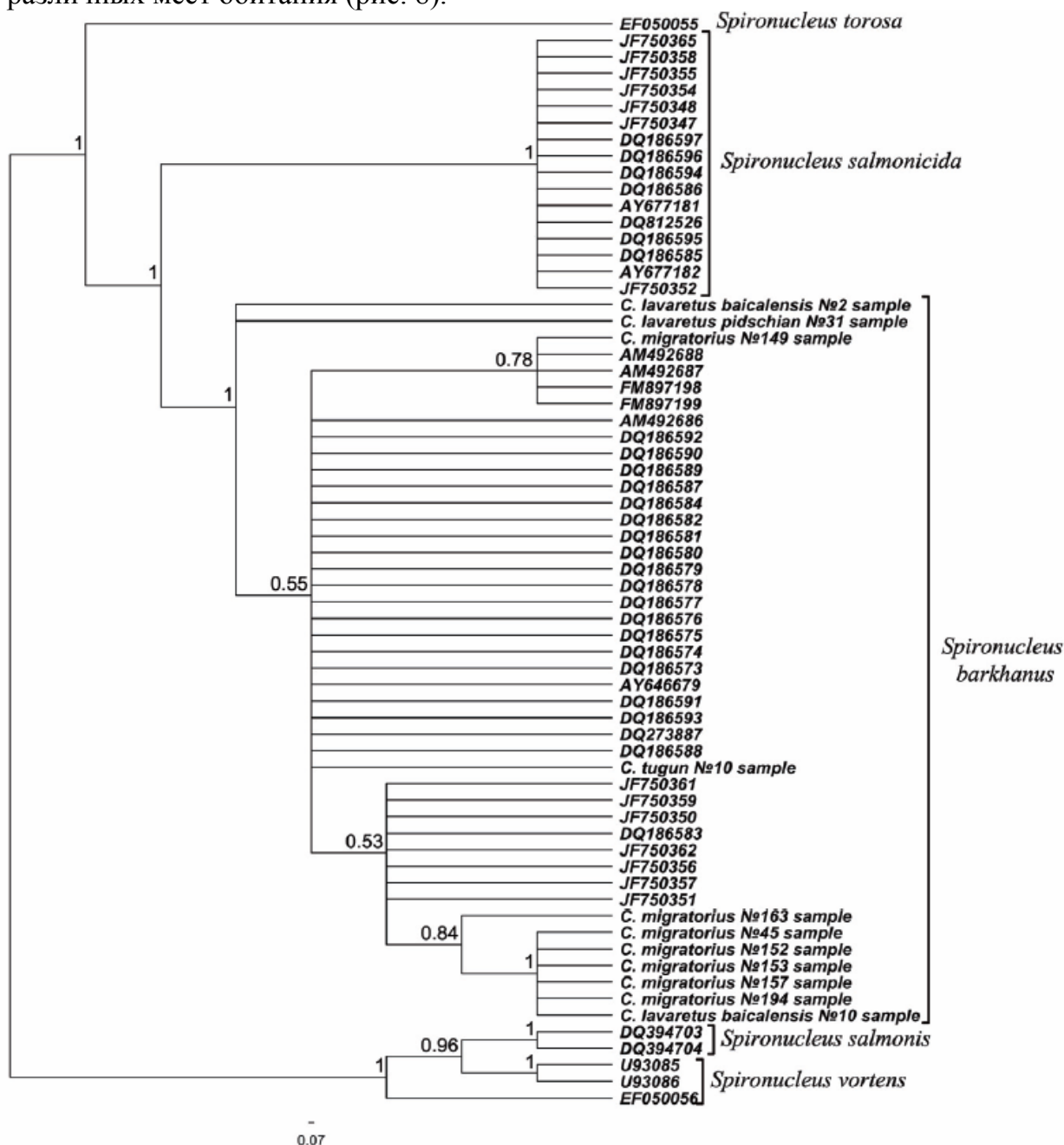


Рисунок 8. Байесово дерево, построенное на основании анализа фрагментов гена малой субъединицы рРНК длиной от 445 п.н. представителей рода *Spironucleus*

Однако кладограмма, основанная на анализе коротких фрагментов, не представляет информацию о различии генотипов *S. barkhanus*. Кластеризация последовательностей в пределах клады *S. barkhanus* показала низкую точность: большинство узлов имеет поддержку менее чем 90%.

Для определения внутривидового генетического разнообразия *S. barkhanus* были идентифицированы и проанализированы последовательности фрагментов гена SSU rRNA длиной 1430 пар оснований. При сравнении со всеми имеющимися в международной базе данных последовательностями соответствующей длины представителей рода *Spironucleus* из рыб, как и в анализе коротких фрагментов, все полученные последовательности с вероятностью 100% вошли в кладу *S. barkhanus*

(рис. 9). Однако последовательности из образцов байкальского омуля №45 и байкальского сига №10 с вероятностью 100% формируют отдельный кластер в кладе *S. barkhanus*. Все остальные последовательности из представителей различных родов семейства лососевых из Северной Европы и Канады, в том числе ранее опубликованные из черного байкальского хариуса, попали в основной кластер *S. barkhanus*. Разделение на группы в рамках этого большого кластера было неоднозначным (апостериорные вероятности менее 95%).

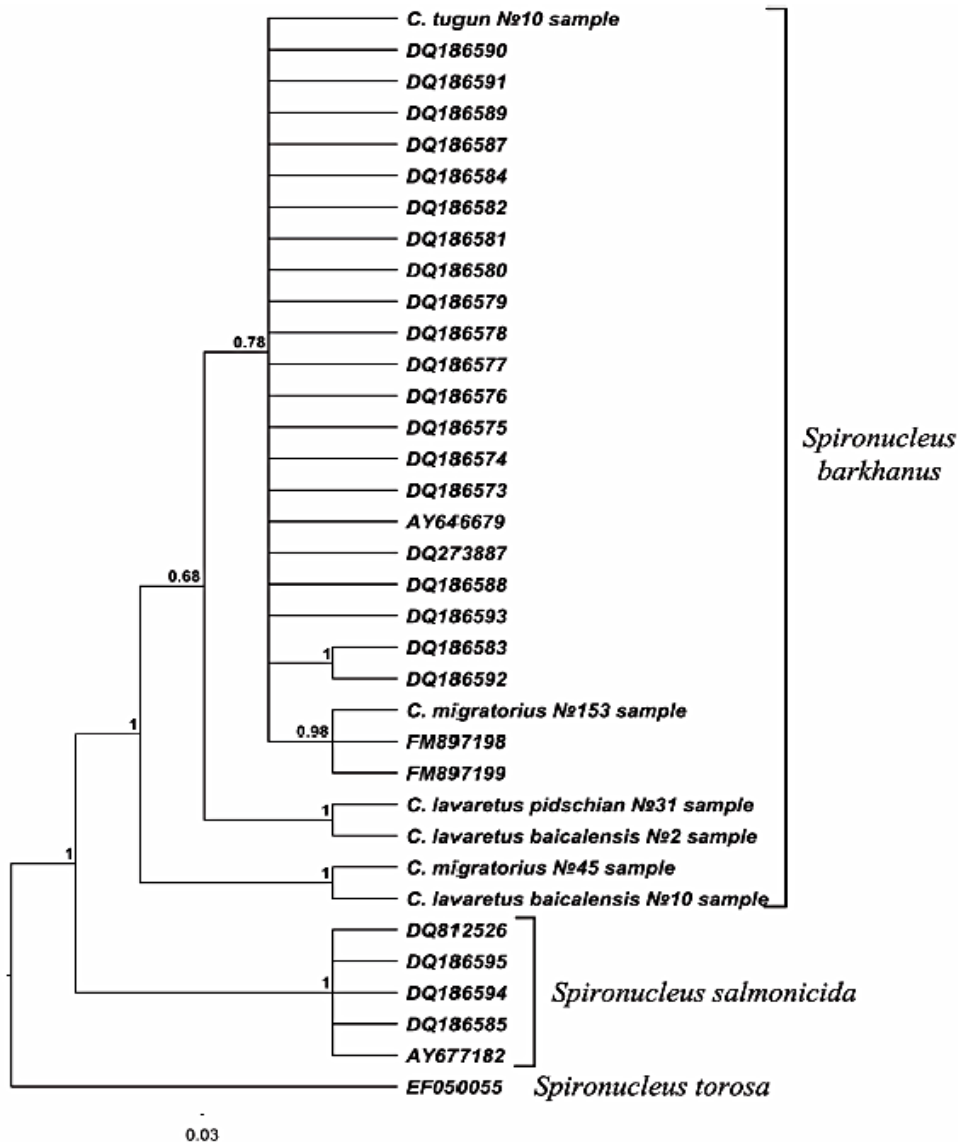


Рисунок 9. Байесово дерево, построенное на основании анализа фрагментов гена малой субъединицы рРНК длиной от 1430 п.н. представителей рода *Spironucleus*

Таким образом, результаты показали внутривидовое генетическое разнообразие *S. barkhanus*. Наряду с космополитным генотипом, идентифицированным в рыбах семейства лососевых Голарктики, в том числе Восточной Сибири, у рыб рода *Coregonus* озера Байкал был обнаружен значительно отличающийся генотип *S. barkhanus*.

По данным гидроакустических съемок было установлено, что байкальский омуль присутствует повсеместно в верхних слоях эпипелагиали до глубин 350-400 м по всей акватории озера и образует максимальные концентрации в присклоновой зоне и особенно в зоне влияния речного стока, а также над поднятиями дна.

Показано, что распределение омуля варьирует по сезонам и отличается у разных МЭГ. Для зимнего распределения характерна концентрация всех МЭГ в прикляпной зоне на глубине 100-350 м, рассредоточение рыб в нижних горизонтах эпипелагиали и практическое отсутствие омуля в верхнем 50 м слое как у берега, так и в открытых районах. В ранневесенний переходный период пелагический омуль находится на глубине 50-150 м, а придонно-глубоководный на глубине 250-350 м. В этот период омуль разных МЭГ пространственно обособлен и распределение пелагического омуля практически не пересекается с распределением других видов пузырных рыб. В период весенних нагульных миграций байкальский омуль может образовывать огромные скопления высотой до 120 м и протяженностью – 1100 м. Одним из факторов, способствующих заражению спиرونуклеусами двух форм внутри нагульных популяций байкальского омуля, являются создаваемые в этот период высокие концентрации численности рыб, физиологическое состояние рыб после «зимовки» и низкая интенсивность их питания.

Морфологические различия в строении жаберного аппарата у трех МЭГ байкальского омуля, вероятно, являются факторами, способствующими более сильной зараженности пелагического омуля, чем прибрежного и придонно-глубоководного. Создаваемые в зимний период высокие концентрации байкальского омуля, подтвержденные данными акустической съемки, также способствуют заражению рыб между собой и смешиванию спиرونуклеусов (наличие «прибрежного» генотипа у пелагического омуля). К сожалению, нет никаких данных о нуклеотидных последовательностях *Diplomonadida*, полученных из рыб рода *Coregonus* из Европы. Генетическое разнообразие *S. barkhanus*, по-видимому, типично для рода *Coregonus*. Поскольку при анализе использован небольшой размер выборки, выводы о распределении нового генотипа *S. barkhanus* могут оказаться преждевременными.

Космополитный генотип *S. barkhanus* был получен из рыб рода *Coregonus* как внутри водосборного бассейна Байкала, так и за его пределами. Новый генотип *S. barkhanus* был обнаружен только у рыб рода *Coregonus* оз. Байкал. Современные представления о происхождении и эволюции рыб рода *Coregonus* в озере [Sukhanova et al., 2012] позволяют сформулировать гипотезу о совместной эволюции рыб и их специфических паразитов. Вероятный предок сиговых рыб в озере был заражен *S. barkhanus* с генотипом, широко распространенным среди лососевых рыб в Голарктике. Симпатрическая изоляция рыб рода *Coregonus* была связана со значительным разнообразием экологических ниш в оз. Байкал, где сформировался их родоспецифичный генотип *S. barkhanus*. Результаты, полученные в настоящем исследовании, соответствуют этой гипотезе. Байкальский омуль, в отличие от других сиговых, доминирующий вид в озере и формирует скопления высокой плотности, способствуя интенсивному обмену *Spiroucleus* между отдельными особями. Тип питания (фильтрация), вероятно, определяет высокую зараженность *S. barkhanus* у байкальского омуля пелагической группы. О высокой родоспецифичности нового генотипа *S. barkhanus* свидетельствует обнаружение обоих генотипов у сиговых рыб с разными уровнями инвазии, в то время как у рыб рода *Thymallus*, несмотря на очень высокую зараженность, определен только космополитный генотип *S. barkhanus*. По-видимому, рыбы из рода *Thymallus* являются резервуаром космополитного генотипа и источником заражения. Для дальнейшей проверки гипотезы необходимо охарактеризовать *S. barkhanus* из рыб рода *Coregonus* других регионов Европы, Западной Сибири и Дальнего Востока.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе впервые проведен систематизированный анализ распространения и генетического разнообразия представителей отряда Diplomonadida в лососевидных рыбах Восточной Сибири с учётом их экологических особенностей. Для реализации поставленной цели разработаны две молекулярно-генетические системы детекции представителей паразитических простейших в пищеварительной системе рыб. Первая система позволяет исследовать широкий спектр представителей отряда Diplomonadida. Вторая система направлена на прямую детекцию *S. barkhanus*.

С помощью первой системы молекулярно-генетической детекции в лососевидных рыбах Восточной Сибири выявлен единственный вид отряда Diplomonadida – *S. barkhanus*. Вторая система позволила провести оценку зараженности *S. barkhanus* не только лососевидных, но и коттоидных рыб, и их кормовых объектов.

Обнаружен ярко выраженный тренд зараженности хариусов спиرونуклеусом в водосборном бассейне р. Ангара: от минимальной в оз. Хубсугул, средней – в озерах Восточных Саян, значительной – в р. Баргузин и оз. Байкал до максимальной в р. Ангара. В то же время реки Чечуй (водосборный бассейн р. Лена) и Непа (водосборный бассейн р. Нижняя Тунгуска) можно считать фоновыми с наименьшей зараженностью рыб.

Для байкальского омуля выявлена зависимость зараженности от морфофункциональных и экологических особенностей рыб различных МЭГ: 29% для прибрежно-пелагической морфо-экологической группы, 34% для придонно-глубоководной и 80% для пелагической.

Кроме того, видо-специфическая диагностическая система позволила идентифицировать у сиговых рыб Восточной Сибири наряду с космополитным генотипом *S. barkhanus* новый родоспецифичный генотип, достоверно отличающийся по последовательности гена малой субъединицы рРНК.

Поскольку проведенными ранее классическими методами паразитологического анализа исследованиями установлено наличие простейших в рыбах, занимающих различное систематическое положение, использование разработанных в данной работе двух диагностических систем молекулярно-генетической диагностики позволит уточнить список видов диплонад и их хозяев.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны молекулярно-генетические системы детекции в пищеварительной системе рыб представителей паразитических простейших отряда Diplomonadida (одностадийная с последующим клонированием) и вида *Spiroucleus barkhanus* (двухстадийная с прямой идентификацией).

2. С помощью разработанной методики молекулярно-генетической детекции представителей Diplomonadida в лососевидных рыбах Восточной Сибири выявлен единственный вид отряда – *S. barkhanus*.

3. Обнаружен ярко выраженный тренд зараженности хариусов спиرونуклеусом в водосборном бассейне р. Ангара: минимальная в оз. Хубсугул (38,5%), средняя в озерах Восточных Саян Аршантай-Нур, Тухурен-Нур и Загасатай-Нур (от 50,0 до 62,5%), значительная в р. Баргузин и оз. Байкал (80,0 и 85,2% соответственно) и максимальная в р. Ангара (100%). Наименьшая зараженность рыб отмечена в реках Чечуй (водосборный бассейн р. Лена) и Непа (водосборный бассейн р. Нижняя Тунгуска): 24 и 20% соответственно.

4. Определена зараженность байкальского омуля *S. barkhanus*, которая составляет 29% для прибрежно-пелагической морфо-экологической группы, 34% для придонно-глубоководной и 80% для пелагической, что может быть обусловлено морфофункциональными и экологическими особенностями рыб различных МЭГ.

5. У сиговых рыб Восточной Сибири наряду с космополитным генотипом *S. barkhanus* выявлен новый родоспецифичный генотип, достоверно отличающийся по последовательности гена малой субъединицы рРНК.

6. Зараженность *S. barkhanus* ленка, валька и байкалоленского хариуса р. Чечуй составила 41,5, 54,6, и 13,3%, соответственно, при степени их пищевого сходства от 32,5 до 80,9%. В кормовых объектах рыб ДНК *S. barkhanus* не обнаружена.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Деникина Н.Н., **Небесных И.А.**, Суханова Е.В., Белькова Н.Л., Русинек О.Т., Дзюба Е.В. Разработка и апробация метода детекции представителей отряда Diplomonadida для исследования зараженности рыб // Биологические науки Казахстана, 2011. – № 4. – С. 28–33.

2. Макаров М.М., Дегтев А.И., Кучер К.М., Мамонтов А.М., **Небесных И.А.**, Ханаев И.В., Дзюба Е.В. Оценка численности и биомассы байкальского омуля тралово-акустическим методом // Доклады Академии наук, 2012. – Т. 447, № 3. – С. 343–346.

3. Рожкова Н.А., **Небесных И.А.**, Дзюба Е.В. Ручейники (Trichoptera) р. Чечуй и их роль в питании рыб // Вода: химия и экология, 2015. – № 2. – С. 42–46.

4. Denikina N., **Nebesnykh I.**, Maikova O., Dzyuba E., Belkova N. Genetic diversity of Diplomonadida in fish of the genus *Coregonus* from south-eastern Siberia // Acta Parasitologica, 2016. – Vol. 61, № 2. – P. 299–306.

Прочие публикации

1. Мельник Н.Г., Дегтев А.И., Соколов А.В., Смирнова-Залуми Н.С., Дзюба Е.В., Варнавский А.В., Тягун М.Л., Ханаев И.В., Аношко П.Н., Дегтярев В.А., Макаров М.М., Кучер К.М., Смолин И.Н., **Небесных И.А.**, Коцарь О.В. Гидроакустическая оценка распределения омуля *Coregonus migratorius* в озере Байкал в мае-июне 2007 г. для определения его запаса // Состояние и проблемы искусственного воспроизводства рыбных запасов Байкальского региона. Сборник докладов научно-практической конференции. – Улан-Удэ: ООО «Издательский дом ЭКОС», 2008. – С. 68–72.

2. Суханова Е.В., **Небесных И.А.** Детекция представителей Diplomonadida (Hexamitidae) в лососевидных рыбах Байкальского региона молекулярно-генетическим методом // Материалы II научно-практической конференции «Перспективы развития инноваций в биологии» в рамках 3-го фестиваля науки в г. Москве и биотехнологической выставки-ярмарки «РосБиоТех-2008». – М.: Инноватика, 2008. – С. 101–103.

3. Дзюба Е.В., Смолин И.Н., **Небесных И.А.**, Купчинский А.Б., Слугина З.В., Рожкова Н.А., Кравцова Л.С. Питание сибирского сига *Coregonus lavaretus pidschian* (Gmelin, 1789) из притоков рек Лена и Вилюй // X Съезд Гидробиологического общества при РАН. – Владивосток: Дальнаука, 2009. – С. 121–122.

4. **Небесных И.А.**, Суханова Е.В., Деникина Н.Н., Белькова Н.Л., Черногор Л.И., Дзюба Е.В. Исследование зараженности лососевидных рыб простейшими рода *Spironucleus* // Пятая Верещагинская Байкальская конференция, Международная научная школа для молодежи «Экология крупных водоемов и их бассейнов». – Иркутск: Аспринт, 2010. – С. 146–147.

5. **Небесных И.А.**, Суханова Е.В., Белькова Н.Л., Русинек О.Т., Дзюба Е.В., Деникина Н.Н. Исследование зараженности рыб сем. Thymallidae представителями

отряда Diplomonadida // Материалы II Международной научно-практической конференции «Проблемы современной биологии». – М.: Спутник, 2011. – С. 197–202.

6. **Небесных И.А.**, Смолин И.Н., Рожкова Н.А., Дзюба Е.В. Пищевые взаимоотношения лососевидных рыб реки Чечуй // Материалы 1-ой Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию со дня рождения М.А. Козлова «Современные зоологические исследования в России и сопредельных странах». – Чебоксары, 2011. – С. 112–114.

7. **Небесных И.А.**, Суханова Е.В. Детекция представителей отряда Diplomonadida в рыбах семейства Thymalidae // Материалы Международной конференции молодых ученых «Биология от молекулы до биосферы». – Харьков, 2011. – С. 475–476.

8. **Небесных И.А.**, Деникина Н.Н., Дзюба Е.В. Генетическое разнообразие представителей Diplomonadida в пищеварительной системе байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) // Материалы V Всероссийского с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых. – Тверь, 2012. – С. 112–113.

9. Деникина Н.Н., **Небесных И.А.**, Белых М.П., Мамонтов А.М., Белькова Н.Л., Дзюба Е.В. Молекулярно-генетическая детекция Diplomonadida в пищеварительной системе байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) // Материалы VIII Международной научно-практической конференции «Наука и инновация – 2012». – Пржемысл: Наука и образование, 2012. – V. 16. – С. 50–54.

10. **Nebesnykh I.A.**, Denikina N.N., Belkova N.L., Dzyuba E.V. Genetic diversity of diplomonadida in fish of the genus *Coregonus* from East Siberia // XII International Symposium on the biology and management of Coregonid fishes. – Irkutsk, 2014. – P. 53.

11. **Небесных И.А.**, Деникина Н.Н., Кондратов И.Г., Ханаев И.В., Смолин И.Н., Белькова Н.Л., Дзюба Е.В. Анализ эукариотической микрофлоры, ассоциированной с пищеварительной системой желтокрылки *Cottocomephorus grewingkii* (Dybowski, 1874) (Cottidae) // Материалы Международной научно-практической конференции «Биологическое разнообразие – основа устойчивого развития». – Грозный, Махачкала, 2017. – С. 50–55.

12. Мельник Н.Г., Смирнова-Залуи Н.С., Смирнов В.В., Мамонтов А.М., Аношко П.Н., Агафонников В.А., Астафьев С.Э., Бондаренко В.М., Варнавский А.В., Гийар Ж., Гончаров С.М., Гранин Н.Г., Дзюба Е.В., Дегтев А.И., Дегтярев В.А., Кудрявцев В.И., Кучер К.М., Коцарь О.В., Макаров М.М., Мизюркин М.А., **Небесных И.А.**, Попов С.Б., Раскин А.С., Рудстам Л., Смирнова О.Г., Смолин И.Н., Соколов А.В., Сороковиков А.В., Теслер В.Л., Тягун М.Л., Толстикова Л.И., Ханаев И.В., Ченский А.Г., Шерстянкин П.П., Яхненко В.М., Якуп М.А. Гидроакустический учет ресурсов байкальского омуля / Ред. В.И. Кудрявцев, Е.В. Дзюба. – Новосибирск: Наука, 2009. – 244 с.

НЕБЕСНЫХ Иван Александрович

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ DIPLOMONADIDA В ЛОСОСЕВИДНЫХ РЫБАХ
ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ: ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТЫ

Автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Подписано к печати 02.10.2017 г.

Формат 60*84/16. Объем 1,4 п.л. Тираж 100 экз. Заказ № 780.

Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН.

664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1.

