

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДИПЛОСТОМОЗОВ МАССОВЫХ ВИДОВ РЫБ СИБИРИ МЕТОДОМ ДНК-БАРКОДИРОВАНИЯ

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

¹ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ, г. Новосибирск, Россия

²Институт Систематики и Экологии Животных СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва, Россия

Аннотация. Метацирকারии трематод рода *Diplostomum* локализуются в глазах и головном мозге пресноводных рыб и круглоротых и, в зависимости от вида, вызывают различные формы диплостомозов. Гиперинвазия паразитом ведёт к нарушению ориентации рыбы в пространстве, снижению качества её питания, угнетению темпа роста. Видовое определение метацирকারий *Diplostomum* spp. на основании морфологических признаков затруднительно и не всегда возможно из-за их слабой выраженности. Нами установлено видовое разнообразие метацирকারий рода *Diplostomum* в рыбах озера Чаны, Телецкое и Байнот на основании ДНК-баркодирования по участку митохондриального гена *cox1* длиной 595 нуклеотидов. Исследованные образцы паразитов из трех водоемов образовали 11 клад видового уровня. Наименьшее видовое разнообразие метацирকারий отмечено для эвтрофного озера Чаны – 3 вида, в олиготрофных озерах Телецкое и Байнот – по 8 видов.

Ключевые слова. *Diplostomum*, Чаны, Байнот, Телецкое, ДНК-баркодирование.

IDENTIFICATION OF DIPLOSTOMOSIS PATHOGENS OF PREDOMINATING FISH SPECIES OF SIBERIA USING DNA-BARCODING APPROACH

^{1,2,3}Izotova G. V., ^{2,3}Vlasenko P. G., ^{2,3}Kashinskaya E. N., ^{2,3}Solovyev M. M.

¹FSSFEI HE Novosibirsk SAU, Novosibirsk, Russia

²Institute of Systematics and Ecology of Animals, Novosibirsk, Russia

³A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia

Abstract. Metacercariae of the genus *Diplostomum* are localized in the eyes and the brain of freshwater fish and cyclostomata species causing different types of diplostomosis. Hyperinvasion by these parasites lead to spatial disorientation, changing in feeding activity, lowering the growth rate, etc. Species identification of *Diplostomum* spp. based on the morphological features is difficult due to the lack and severity of them. In present study, species diversity of the genus *Diplostomum* metacercariae parasitizing in fishes of Chany, Baunt and Teletskoye lakes is defined according to the DNA-barcoding approach based on mtDNA fragment *cox1* (595 bp). Parasite sequences from the fishes inhabited studied lakes formed 11 clades of the species level. The lowest diversity was noted for an eutrophic Lake Chany – 3 species, whereas for an oligotrophic lakes Teletskoye and Baunt – 8 species were found.

Keywords. *Diplostomum*, Chany, Baunt, Teletskoye, DNA-barcoding.

Введение. Трематоды рода *Diplostomum* – повсеместно распространенные паразиты, на стадии метацирকারии паразитирующие в глазах и головном мозге пресноводных рыб и некоторых видов круглоротых. Различные виды паразитов этого рода вызывают соответствующие формы диплостомозов, которые, в свою очередь, негативно влияют на пространственную ориентацию рыбы и особенности её питания. Гиперинвазия может привести к повреждению глаза и полной слепоте хозяина. Вместе с окончательными хозяевами, рыбацкими птицами, паразит распространяется в другие водоёмы [1, 9].

Диплостомозы наносят немалый ущерб рыбному хозяйству, снижая упитанность и темп роста поражённых рыб. Заражение происходит чаще всего в первые годы жизни на мелководье, где происходит эмиссия свободноплавающих церকারий из моллюсков семейства *Lymnaeidae*. Церকারии проникают в ткани рыбы, мигрируя в глаза и головной мозг. Согласно данным предыдущих исследований, в России выявлено 23 вида рода *Diplostomum* [8, 9].

В нашей работе мы рассматриваем три различных по своим характеристикам озера. Чаны – самое крупное озеро по площади водного зеркала на территории Западной Сибири. Максимальная глубина составляет около 10 м, высота над уровнем моря – 106 м. Озеро является эвтрофным. В настоящее время в озере обитает 14 видов рыб. В 1970-1980 в озере были зафиксированы некоторые

виды *Diplostomum* - *D. chromatophorum*, *D. spathaceum*, *D. mergi*, *D. rutili*, *D. baeri* и *D. helveticum*. Соусь С. М. и Ростовцев А. А. сообщали о тяжелой эпизоотической ситуации с диплостомозами рыб [1, 2, 6].

Телецкое озеро расположено на высоте 436 м. над уровнем моря. Наибольшая глубина озера составляет 325 м, с большими перепадами глубины. Имеет тектоническое происхождение и является ультраолиготрофным В озере обитают 13 видов рыб. В 1954 году было зафиксировано заражение глазными сосальщиками 95% исследованных ельцов, 85%-100% исследуемых подкаменщиков, но вид диплостомид установлен не был [4, 7].

Озеро Баунт входит в Ципо-Ципиканскую систему озер. Расположен водоем в долине реки Ципы. Озеро находится на высоте 1060 м, максимальная глубина – 33 м. В озере Баунт обитает около 20 видов рыб. Идентифицированы трематоды ранее были только у ерша (*D. volvens*) [5].

Ранее работы по определению видового состава трематод рода *Diplostomum* проводились на основе морфологического критерия. Морфологический подход в видовом определении, в данном случае, затрудняется недостаточностью и слабой выраженностью морфологических признаков метацеркарий [5, 6, 7, 8, 9]. В настоящей работе видовое определение метацеркарий рода *Diplostomum* выполнено на основании анализа фрагмента митохондриального гена первой субъединицы цитохромоксидазы длиной в 595 нуклеотидов (ДНК-баркодирование). Этот метод уже успешно применялся ранее для решения сходных задач [3, 12].

Материалы и методы. Материал для исследования был собран в 2019-2021 гг. в ходе экспедиций ИСиЭЖ СО РАН. После умерщвления глаза и мозг рыбы извлекались в чашки Петри и вскрывались под стереомикроскопом Zeiss Stemi DV4. Паразиты с хрусталика, ретины глаза, внутренней среды и мозга собирались отдельно. Тотальная ДНК выделялась с помощью 5%-го водного раствора ионообменной смолы Chelex (Bio Rad). Для полного растворения мягких тканей была использована протеиназа К. В ходе ПЦР были использованы праймеры и условия реакции, разработанные Steenkiste et al. [13]. Очистка ампликонов и дальнейшее секвенирование проводилось на базе ЦКП «Геномика» СО РАН. Все дальнейшие операции с полученными последовательностями проводились в программе MEGA 11. Для определения ближайших гомологичных последовательностей в GenBank использовался сервис NCBI BLAST [10, 11, 13].

Для озера Чаны было отобрано 77 метацеркарий от десяти различных видов рыб (золотой и серебряный караси, плотва, сазан, язь, елец, лещ, щука, судак), 34 метацеркарии от семи видов рыб (сиг, лещ, плотва, сибирский подкаменщик, налим, елец и голянь) для озера Телецкое и для озера Баунт – 42 метацеркарии от восьми видов (плотва, язь, елец, серебряный карась, ёрш, налим, окунь и сиг).

Результаты и обсуждение. В результате филогенетического анализа, последовательности из изученных озёр формируют 11 клад видового уровня. Референсные последовательности с высоким уровнем гомологичности (>99%) были найдены для 6 клад, и были определены такие виды, как: *D. pseudospathaceum*, *D. spathaceum*, *D. sp.* Lineage 4, *D. mergi* complex sp. *D. mergi* complex sp. 2. и *D. phoxini*. Также было установлено 5 неопределенных видов трематод. Таким образом, 3 вида метацеркарий рода *Diplostomum* были обнаружены в озере Чаны и 8 видов – в озерах Телецкое и Баунт

Наименьшее видовое разнообразие метацеркарий *Diplostomum* spp. отмечено для олиготрофного водоема с малым перепадом глубин и общей однородностью условий. Большое количество зарегистрированных видов рода *Diplostomum* у рыб горных олиготрофных озер может быть связано с большим разнообразием потенциальных хозяев на уровне семейств для реализации жизненных циклов.

Список использованных источников

1. Бочарова Т.А. Фауна и экология паразитов рыб бассейна озера Малые Чаны / Т.А. Бочарова, Г.И. Головкин, А.Н. Гундризер, С.М. Соусь. В кн. Экология озера Чаны, М. Новосибирск. / Б. Г. Иоганзен, Г. М. Кривошеков - Новосибирск: Наука, сиб. отд-ние, 1986.
2. Васильев О. Ф. Обзор экологического состояния озера Чаны / О. Ф. Васильев, Я. Вейн – Новосибирск: Академическое издательство «ГЕО», 2015. - 255с.
3. Воронова Н. В. Последовательность гена субъединицы I цитохромоксидазы С в молекулярной таксономии животных: принципы, результаты и проблемы использования. / Воронова Н. В., Буга С. В., Курченко В. П. // Труды БГУ, т. 7, ч. 1, 2012. – с. 22-42.
4. Гундризер А.Н. Рыбы Телецкого озера / А.Н. Гундризер, Б.Г. Иоганзен, В.В. Кафанова, Г.М. Кривошеков – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1981. - 160 с.
5. Дугаров Ж. Н. Паразитофауна обыкновенного ерша *Gymnoscephalus cernuus* (L.) в Ципо-Ципиканских (Баунтовских) озерах (Забайкалье) / Ж. Н. Дугаров, М. Д. Батуева, Т. Г. Бурдуковская [и др.] // Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии: Материалы IV Всероссийской конференции – Улан-Удэ: Бурятский научный центр Сибирского отделения РАН, 2021. – С. 141-143

6. Соусь С. М. Паразиты рыб новосибирской области (серия, 2т) / С. М. Соусь, А. А. Ростовцев – Тюмень, 2006. - 194 с.
7. Титова С. Д. Паразиты рыб Телецкого озера / Титова С. Д. // Труды проблемных и тематических совещаний ЗИН вып. IV 1954. / Томский Государственный университет 1954. – с. 70-84.
8. Фрезе В. И. Метацеркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов центральной России / В. И. Фрезе. – Москва: Наука, 2002. О.
9. Шигин А. А. Трематоды фауны России и сопредельных регионов. Род *Diplostomum* Мариты / А. А. Шигин. – Москва: Наука, 1993.– 208с.
10. Blast: Basic Logical Alignment Search Tool [Электронный ресурс] <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
11. Kumar S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. / Kumar S., Stetcher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 2018. - p. 1547-1549
12. Sean A. Locke. Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes / Sean A. Locke, Fatima S. Al-Nasiri, Monica Caffara. – *International Journal for Parasitology*, 2015. – p. 841-855.
13. Van Steenkiste N. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes) / Van Steenkiste N, Locke SA, Castelin M, et al. *Mol Ecol Resour*, 2015. – p. 945-952. doi: 10.1111/1755-0998.12358.

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