

УДК 576.89:597(282.256.341)

ПЕРВОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ENTEROCYTOZOONIDAE (FUNGI: MICROSPORIDIA) В РЫБАХ ОЗ. БАЙКАЛ**Небесных И.А., Деникина Н.Н., Кондратов И.Г., Ханаев И.В., Смолин И.Н.,
Белькова Н.Л., Дзюба Е.В.***ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск,
e-mail: canis-87@mail.ru*

Впервые в пищеварительной системе байкальских рыб (*Cottocomephorus grewingkii* (Dybowski, 1874): Cottidae) молекулярно-генетическими методами выявлены представители Enterocytozoonidae (Fungi: Microsporidia). Определены последовательности фрагментов гена малой субъединицы рибосомальной РНК. Выявленный генотип Enterocytozoonidae наиболее близок последовательностям Enterocytozoon hepatopenaei из гигантской тигровой креветки *Penaeus monodon* Fabricius, 1798, с гомологией 91% и *Enterospira nucleophila*, культивированной из интестинального эпителия дорады *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, с гомологией 88%. Ранее у рыб оз. Байкал были отмечены только микроспоридии семейства Glugeidae: *Glugea anomala* у горбатой широколобки *Cyphocottus megalops* и *Glugea fennica* у налима *Lota lota*. Учитывая полученные данные, необходимо применение комплекса морфологических, ультраструктурных и молекулярно-генетических методов для дальнейших исследований представителей отдела Microsporidia в других видах рыб озера Байкал и его бассейна.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, микрофлора, Microsporidia, Enterocytozoonidae, *Cottocomephorus grewingkii*, оз. Байкал

FIRST DESCRIPTION OF ENTEROCYTOZOONIDAE (FUNGI: MICROSPORIDIA) IN FISH FROM LAKE BAIKAL**Nebesnykh I.A., Denikina N.N., Kondratov I.G., Khanaev I.V., Smolin I.N.,
Belkova N.L., Dzyuba E.V.***Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk,
e-mail: canis-87@mail.ru*

For the first time in the digestive tract of baikalian fish (*Cottocomephorus grewingkii* (Dybowski, 1874): Cottidae) representatives of Enterocytozoonidae (Fungi: Microsporidia) were revealed by molecular methods. Sequences of fragments of the gene of a small subunit of ribosomal RNA were determined. Enterocytozoonidae genotype showed the highest homology to the sequences of Enterocytozoon hepatopenaei from giant tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 (91%), and *Enterospira nucleophila*, cultivated from the intestinal epithelium of bream *Sparus aurata* Linnaeus, 1758 (88%). Previously only microsporidia Glugeidae family were detected in the fish from Lake Baikal: *Glugea anomala* was found in humpbacked sculpin *Cyphocottus megalops* and *Glugea fennica* in burbot *Lota lota*. According to the data, complex approach including morphological, ultrastructural and molecular methods has to be used for further research of representatives Microsporidia order in other fish species from Lake Baikal and its basin.

Keywords: molecular-genetic methods, microflora, Microsporidia, Enterocytozoonidae, *Cottocomephorus grewingkii*, Lake Baikal

Микроспоридии – одноклеточные эукариоты, являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами многоклеточных животных. Различные виды микроспоридий обнаружены у широкого спектра хозяев, от беспозвоночных до людей, и могут вызывать серьезные патологии вплоть до летального исхода. Так, описаны эпизоотические вспышки микроспоридиозов, имевшие серьезные экономические последствия для аквакультуры рыб и беспозвоночных. Кроме того, некоторые из них считаются потенциальной угрозой для свободноживущих популяций рыб, например, в Красном море [9, 10, и др.].

Несмотря на сравнительно высокий уровень изученности животных озера Байкал, данные о видовом составе паразитических

простейших пищеварительной системы рыб до сих пор являются неполными [1, 4, 6]. Использование молекулярно-генетических методов, включающих секвенирование генов рибосомного оперона посредством выделения ДНК и амплификации, позволяет не только существенно расширить наши знания о паразитофауне рыб, но и скорректировать уже имеющиеся данные. Так, молекулярно-генетический анализ ассоциированной микрофлоры кишечника черного байкальского хариуса *Thymallus baicalensis* Dybowski, 1874 позволил выявить генотип *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida: Hexamitidae) [2], ранее описанный как *Hexamita* sp. [4].

Желтокрылка *Cottocomephorus grewingkii* (Dybowski, 1874) (Cottidae) являет-

ся одним из наиболее многочисленных представителей ихтиоценоза мелководной зоны Байкала. В пределах вида выделяют три одновременно нерестующих стада: мартовское, майское и августовское [5, 7]. В зависимости от сроков нереста и температурного режима у одновременно нерестующих стад желтокрылки инкубационный период развития кладок составляет от 20 до 80–90 суток [7]. С момента нереста до выхода из кладки личинок её оберегает самец: обмахивает кладку плавниками, улучшая аэрацию потоком воды, удаляет из неё погибшие икринки и охраняет кладку от хищников. В течение всего этого периода рыбы не питаются, что позволяет определять состав собственной микрофлоры их пищеварительной системы.

Целью исследования явился анализ эукариотической микрофлоры кишечника самцов желтокрылки в нерестовый период методом молекулярно-генетической детекции фрагментов генов малой субъединицы рРНК.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования стали самцы желтокрылки в период инкубации икры. Рыб собирали на кладках с помощью легкого водолазного снаряжения в Лиственничном заливе оз. Байкал 28–31 мая (6 экз.) и 18 августа (6 экз.) 2012 г. Фрагменты кишечника свежельвовленных рыб отбирали в асептических условиях. Выделение ДНК проводили с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Москва) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Полученные образцы нуклеиновых кислот анализировали методом ПЦР с использованием набора «Taq DNA Polymerase» (QIAGEN, Германия) и универсальных эукариотических праймеров DpFup 5'-GCCAGCAGCCGCGGTAATCC и DpRUn 5'-GAGCGACGGCGGTGTGTAC [8] в режиме 94°C/20 сек.; 68°C/20 сек.; 72°C/30 сек. (35 циклов). Продукты амплификации анализировали в 2% агарозном геле. Ампликоны длиной менее 1090 п.н. вырезали и клонировали в плазмидном векторе CloneJET™ PCR Cloning Kit (FERMENTAS, Литва). Плазмидную ДНК из выросших колоний секвенировали с использованием предлагаемых в наборе праймеров. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей с международной базой генетических данных GenBank проводили с помощью программы BLAST (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы Clustal W 2.0.10. Редактирование выровненных последовательностей проводили с использованием пакета программы BioEdit. Филогенетический анализ проводили с помощью пакета программ Mega v.6.06.

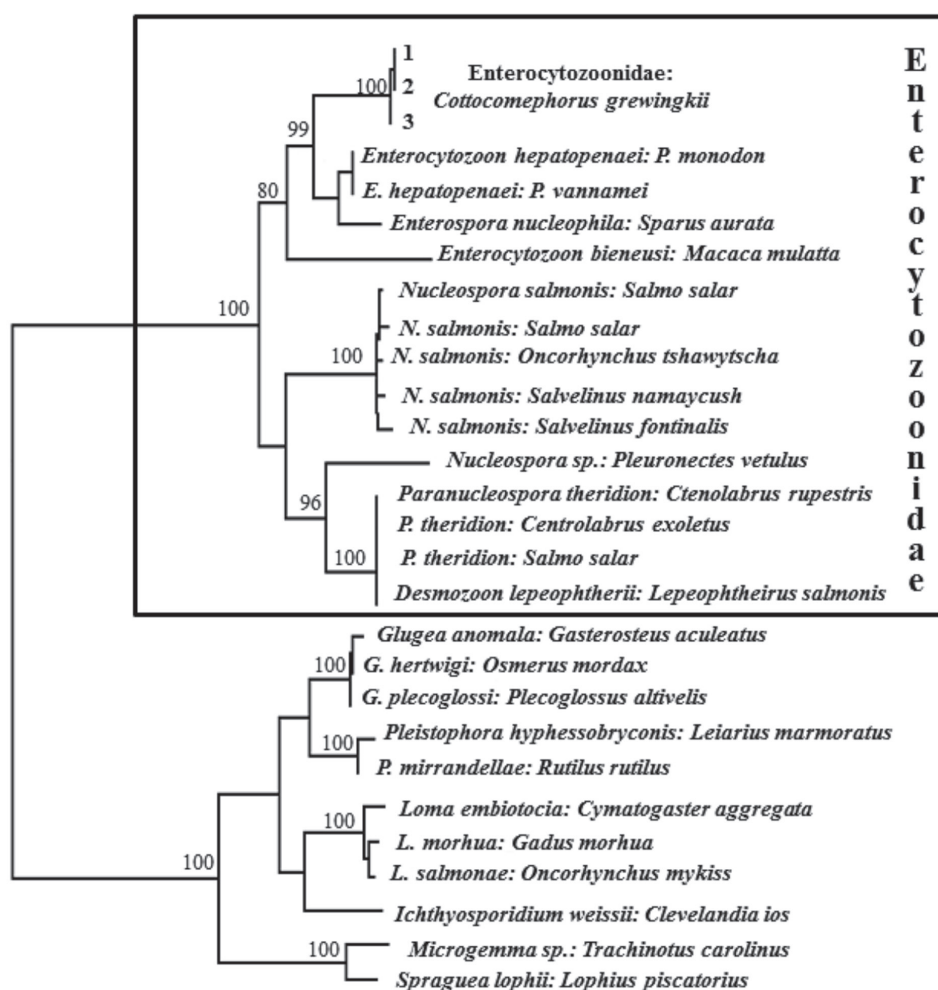
Результаты исследования и их обсуждение

К настоящему времени в составе эукариотической микрофлоры, ассоциированной с пищеварительной системой керчаковых рыб оз. Байкал, зарегистрированы

представители Diplomonadida, Coccidia и Microsporidia [1]. Используемые в работе праймеры позволяют амплифицировать фрагменты гена малой субъединицы рРНК всех эукариотических организмов. При этом разница в длине полученных ампликонов обеспечивает разделение фрагментов ДНК организма хозяина и кормовых объектов (около 1100 п.н.), диплоноад (около 880 п.н.) и микроспоридий (около 800 п.н.) в процессе электрофореза. В трех из проанализированных в работе образцов выявлены последовательности микроспоридий, других протистов не обнаружено. Ближайшими родственниками обнаруженных микроспоридий являются представители семейства Enterocytozoonidae: *Enterocytozoon hepatopenaei* из гигантской тигровой креветки *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 и из белоногой креветки *Penaeus vannamei* Boone, 1931 с гомологией 91%, и *Enterospora nucleophila*, культивированной из интестинального эпителия дорады *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, с гомологией 88% (рисунок). При этом в общую кладку с последовательностями Enterocytozoonidae из кишечника желтокрылки попали последовательности *Enterocytozoon bienewisi*, паразита, вызывающего системные микроспоридиозы у людей с угнетенным иммунитетом. Последовательности других представителей Enterocytozoonidae, инфицирующих рыб (*Nucleospora* и *Paranucleospora*) кластеризуются отдельно с поддержкой 100% (рисунок).

Необходимо отметить, что ранее у рыб оз. Байкал с использованием классических паразитологических методов были отмечены только микроспоридии семейства Glugeidae: *Glugea anomala* (Moniez, 1887) у горбатой широколобки *Cyphocottus megalops* (Gratzianov, 1902) (син. *Asprocottus megalops* (Gratzianov, 1902)) и *Glugea fennica* Lom et Weiser, 1969 у налима *Lota lota* (Linnaeus, 1758) [1, 4].

Кроме того, у амурской широколобки *Mesocottus haitei* (Dybowski, 1869) и амурского подкаменщика *Cottus szanaga* Dybowski, 1869 описана *Glugea mesocotti* sp. n. [3]. *G. anomala* локализована в клетках подкожной и мышечной соединительной ткани, а также мезентерия [4]. В то время как ксеномы *G. mesocotti* sp. n. локализованы на поверхности тела рыб, на плавниках, в ротовой полости, в почках, стенке кишечника, реже в гонадах и других внутренних органах [3]. Микроспоридий семейства Enterocytozoonidae детектировали в эпителии кишечника, жабр, кожи, во внутренних органах, включая центральную нервную систему; описано размножение *E. nucleophila* в макрофагах и энтероцитах [10].



Филогенетическое древо на основании последовательностей фрагмента гена малой субъединицы рРНК длиной 780 п.н. (neighbor-joining), демонстрирующее положение микроспоридии из желтокрылки среди микроспоридий – паразитов рыб

Представители Enterocytozoonidae биологически пластичны, способны как к цитоплазматическому, так и к внутриядерному размножению, причем иногда в конкретном организме хозяина показаны оба пути размножения паразита (например, для *E. nucleophila*). Кроме того, спектр хозяев Enterocytozoonidae чрезвычайно широк: от водных беспозвоночных и позвоночных животных до наземных позвоночных, включая человека (*Enterocytozoon bieneusi*). Для представителей Enterocytozoonidae (*Paranucleospora theridion*) описан трофический механизм смены хозяина между паразитическими раками *Lepeophtheirus salmonis* и рыбами, принадлежащими разным семействам (*Centrolabrus exoletus* (Linnaeus, 1758), *Ctenolabrus rupestris* (Linnaeus, 1758), *Salmo salar* Linnaeus,

1758). Принимая во внимание этот факт, сделано предположение, что способность к смене хозяина в трофической цепи (между беспозвоночными и позвоночными животными) является общей для представителей Enterocytozoonidae [10].

С учетом полученных данных и вероятности передачи микроспоридий в трофических цепях необходимо применение комплекса морфологических, ультраструктурных и молекулярно-генетических методов для дальнейших исследований представителей класса Microsporidea в других видах рыб и беспозвоночных животных озера Байкал и его бассейна.

Работа выполнена в рамках программы РАН: Проект 1.29.7. «Исследование микробиоты эндемичных керчаковых рыб (*Cottoidei*) озера Байкал».

Список литературы

1. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: в 2 т. – Новосибирск: Наука, 2001. – Т. 1: Озеро Байкал, кн. 1 / Ред.: О.А. Тимошкин, Т.Я. Ситникова, О.Т. Русинек и др. – Справочники и определители по фауне и флоре озера Байкал. – 832 с.
2. 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. Биол. – 2008. – Т. 35, № 2. – С. 253–256.
3. Воронин В.Н., Юхименко С.С. Описание нового вида микроспоридии *Glugea mesocotti* sp. n. (Microsporidia: Glugeidae) из *Mesocottus haitej* (Scorpaeniformes: Cottidae) // Паразитология. – 2010. – Вып. 44 (4). – С. 351–355.
4. Заика В.Е. Паразитофауна рыб оз. Байкал. – М.: Наука, 1965. – 106 с.
5. Коряков Е.А. Пелагические бычковые Байкала. – М., 1972. – 155 с.
6. Русинек О.Т. Паразиты рыб озера Байкал (фауна, сообщества, зоогеография, история формирования). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. – 571 с.
7. Талиев Д.Н. Бычки-подкаменщики Байкала (Cottoidei). – М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1955. – 603 с.
8. 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.
9. Frenette A.P., Eydal M., Hansen H., Burt D.B., Duffy M.S. Integrative approach for the reliable detection and specific identification of the Microsporidium *Loma morhua* in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) // Journal of Eukaryotic Microbiology. – 2017. – Vol. 64. – P. 67–77.
10. Palenzuela O., Redondo M.J., Cali A., Takvorian P.M., Alonso-Naveiro M., Alvarez-Pellitero P., Sitjà-Bobadilla A. A new intranuclear microsporidium, *Enterospora nucleophila* n. sp., causing an emaciative syndrome in a piscine host (*Sparus aurata*), prompts the redescription of the family Enterocytozoonidae // Int. J. Parasitol. – 2014. – Vol. 44. – P. 189–203.