

УДК 595.121(519.13)

**СРАВНИТЕЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ
И ГЕНОСИСТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
PROTEOCEPHALUS THYMALLI (CESTODA: PROTEOCEPHALIDAE) —
ПАРАЗИТА ХАРИУСОВ ИЗ ОЗЕР ХУБСУГУЛ И БАЙКАЛ**

© О. Т. Русинек, К. Д. Кузнецов

Впервые приведен сравнительно-морфологический и геносистематический анализ цестоды *Proteocephalus thymalli* по материалам от косокольского хариуса (*Thymallus arcticus nigrescens*) из оз. Хубсугул и байкальского хариуса (*Thymallus arcticus baicalensis*). Результаты свидетельствуют о том, что исследуемые протеоцефалюсы не могут быть отнесены к одному виду — *Proteocephalus thymalli*.

Proteocephalus thymalli Annenkowa-Chlopina, 1923 впервые был описан из кишечника сибирского хариуса из Чивыркуйского залива Байкала и Телецкого оз. (Анненкова-Хлопина, 1923). Впоследствии он был зарегистрирован по всему ареалу хариусов Палеарктики, и только в Северной Америке у хариуса указан (Margolis, Arthur, 1979) другой вид — *Proteocephalus tumidocollis*. В оз. Хубсугул *P. thymalli* впервые был отмечен Томиловым и Черепановым (1967) у сибирского (*Thymallus arcticus*) и косокольского (*Thymallus arcticus nigrescens*) хариусов. По их данным, сибирский хариус был заражен на 50% с интенсивностью инвазии от 1 до 24 экз., косокольский хариус — на 100% с интенсивностью от 2 до 61 экз. Позднее Пронин (1976), основываясь на том, что в оз. Хубсугул обитает один вид — сибирский хариус, который представлен двумя экологическими формами (прибрежно-пелагическая многотычинковая «хубсугульский» и придонная малотычинковая), также приводит данные о зараженности хариуса *Proteocephalus thymalli*. Процент заражения рыб этим паразитом составил 95.8%, индекс обилия — 39.16 экз. Данное исследование посвящено анализу результатов, полученных в ходе изучения морфологии и геносистематики цестоды *Proteocephalus thymalli* от косокольского (*Thymallus arcticus nigrescens*) и байкальского хариусов (*Thymallus arcticus baicalensis*). По последним ихтиологическим данным («Рыбы Монгольской Народной Республики», 1983), в оз. Хубсугул обитает эндемичный подвид сибирского хариуса *Thymallus arcticus nigrescens* Dorogostaisky — косокольский (хубсугульский) хариус. Систематический статус косокольского хариуса ранее установлен Дорогостайским (1923).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

До настоящего времени в литературе отсутствовали сведения о морфологии *Proteocephalus thymalli* из оз. Хубсугул.

В 1998—1999 гг. были проведены исследования протеоцефалюса косокольского хариуса. Были поставлены следующие задачи: во-первых, изучить морфологию протеоцефалюса; во-вторых, сравнить полученные данные с ранее опубликованными материалами; в-третьих, изучить геносистематику этого вида по гену 18S рибосомной РНК из озера Байкал и Хубсугул.

В качестве основного материала были использованы коллекционные сборы Н. М. Пронина и Т. Я. Ситниковой, любезно предоставленные нам для проведения морфологических и геносистематических исследований, за что мы выражаем им глубокую благодарность.

15 экз. половозрелых гельминтов были фиксированы 70° этиловым спиртом. Затем были приготовлены окрашенные квасцовым кармином препараты по общепринятой методике (Быховская-Павловская, 1985). В каждой стробиле были измерены сколекс, 5 половозрелых и 5 зрелых члеников, а также 25 семенников и 25 яиц.

Статистический анализ проведен с помощью пакетов программ Statistica и Excel for Windows.

Для изучения родственных отношений между хубсугульским и байкальским протеоцефалусом нуклеотидные последовательности фрагмента гена, кодирующего 5'-концевой домен 18S рибосомной РНК (Noller, Woese, 1981), были определены и использовались в сравнительном анализе с последовательностями других представителей типа Plathelminthes, зарегистрированными в EMBL банке.

Суммарную ДНК выделяли из фиксированных 96° этиловым спиртом гельминтов методом, использованным ранее (de Vos, Dick, 1989). ДНК выделяли из *Proteocephalus thumalli* (из оз. Хубсугул и Байкала).

ПЦР-амплификация. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли в 20—50 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ буфер Трис HCl (pH 8.9), 4 мМ MgCl₂, 40 мМ KCl, 0.1 мг/мл БСА, по 0.2 мМ dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 1 мкМ каждого праймера, 1—10 нг суммарной ДНК, 1—2 ед. акт. Taq-полимеразы. Амплификацию проводили 30-кратным повторением стадий в следующей последовательности: денатурация (94°, 60 с), отжиг (50—55°, 70 с) и полимеризация (72°, 120 с). Для амплификации выбранного фрагмента геномной ДНК использовали два праймера (Кузнецов, 1995): 5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3' (прямой), 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCACC-3' (обратный) с координатами 1—22 и 630—610 относительно нуклеотидной последовательности 18S рРНК человека (Accession Number X03205).

Определение нуклеотидных последовательностей. ПЦР-продукты очищали гель-электрофорезом и выделяли, как описано ранее (Gyllesten, 1989). Полученные ПЦР фрагменты ДНК подвергали прямому секвенированию (Murray, 1989). Для этого, кроме праймеров, использованных при ПЦР-амплификации, использовали внутренний праймер: 5'-GTTTCTCAGGCTCCCTCTC-3' (Kuznedelov, Timoshkin, 1993). Продукты секвенирующих реакций разделяли гель-электрофорезом в 8 %-ном полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины, и радиоавтографировали в течение 12—24 ч при комнатной температуре.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей. Для сравнительного анализа использовали последовательности представителей типа Plathelminthes, зарегистрированные в EMBL банке под номерами (accession number): L06567 — *Echinostoma caproni*, U27015 — *Echinococcus granulosus*, L06668 — *Fasciolopsis buski*, X55357 — *Opisthorchis viverrini*, M62652 — *Schistosoma mansoni*, а также последовательность *Armillia livanovi*, взятую из статьи Кузнецова и др. (1996). Сравнительный анализ проводили путем вычисления эволюционных расстояний (количества различий) между последовательностями, по методу Джукса и Кантора (Jukes, Cantor, 1969). Матрицу эволюционных расстояний, вычисленных при попарном сравнении, использовали для построения дендрограммы, по методу Сайтоу и Нея (Saitou, Nei, 1987), отражающей степень сходства между сравниваемыми последовательностями. Для выполнения сравнительного анализа использовали пакет компьютерных программ TREECON.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований впервые были получены данные по морфологии *Proteocephalus thumalli* от косоогольского хариуса (см. таблицу; рис. 1). Анализ морфологических признаков показал, что для *P. thumalli* из оз. Хубсугул

Размерные характеристики (мм) *Proteocephalus thymalli* (по разным авторам)
Size characters (mm) of *Proteocephalus thymalli* (after different authors)

Признаки	Фрезе, 1965	Русинек, 1987 (Байкал)	Наши данные (Хубсугул)
Длина стробилы	до 50	42.0—94.0 (57.8)	24.0—57.0 (40.0)
Количество члеников	—	102—276 (146)	63—134 (98)
Диаметр присосок:			
боковых	0.109—0.202 × 0.096—0.171	0.084—0.188 × 0.093—0.198 (0.1193 × 0.1301)	0.122—0.172 × 0.115—0.15 (0.133—0.149)
апикальной	0.052—0.096	0.0248—0.0528 × 0.055—0.07 (0.0581)	0.035—0.068
Длина сколекса	0.151—0.202	0.1528—0.466 (0.2578)	0.206—0.453 (0.354)
Ширина сколекса	0.232—0.404	0.144—0.538	0.289—0.586
Длина шейки	2—6	2—6.6 (3.7)	1.44—4.98 (3.32)
Отношение длины к ширине полово- зрелого членика	1 : 2—1 : 3	1 : 1—1 : 4.7 (1 : 2.2)	1 : 1.05—1 : 2.5 (1 : 1.4)
Отношение длины сумки цирруса к ширине членика	1 : 3	1 : 2—1 : 3.5 (1 : 3)	1 : 2.45—1 : 4.6 (1 : 3)
Число семенников	42—105 (67)	46—76 (58.6)	51—70 (59.4)
Диаметр семенников	0.05—0.105 × 0.05—0.065	(0.064 × 0.0687)	0.049—0.072
Диаметр яиц	0.025—0.029 × 0.022—0.026	(0.02406 × 0.02417)	0.021 × 0.032

Примечание. В скобках указаны средние значения признаков.

характерно определенное своеобразие. Эти цестоды по сравнению с байкальским протеоцефалюсом (Русинек, 1987) имеют меньшую (в 2 раза) длину стробилы и соответственно меньшее количество члеников. По длине и ширине сколекса этот вид также существенно отличается от вида из Байкала. Для протеоцефалюса из оз. Хубсугул характерна другая форма половозрелых члеников: у них, как правило, длина членика почти равна или немного больше ширины. Соотношение этих показателей в среднем составляет 1 : 1.4. У *P. thymalli* из Байкала ширина половозрелого членика в 2 раза больше его длины.

Такие показатели, как диаметр и количество семенников, диаметр яиц, отношение длины сумки цирруса к ширине членика, длина шейки достаточно близки.

Сравнение наших материалов с данными, приведенными в монографии Шольца и Ханзеловой (Scholz, Hanzelova, 1998), свидетельствуют о том, что авторы приводят смешанные материалы по *P. thymalli* (Байкал, оз. Хубсугул). И это неудивительно, поскольку авторы монографии ставили перед собой другие задачи.

Для выявления морфологического сходства между видами рода *Proteocephalus* из оз. Хубсугул и Байкала использован факторный анализ по 14 основным признакам и их соотношениям (рис. 2). Факторный анализ показал, что анализируемые виды достаточно разделены морфологически, что вполне может свидетельствовать об их самостоятельности.

Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов выявило 558 выравненных нуклеотидных позиций (рис. 3), идентифицированных с помощью известных последовательностей рДНК представителей типа Plathelminthes.

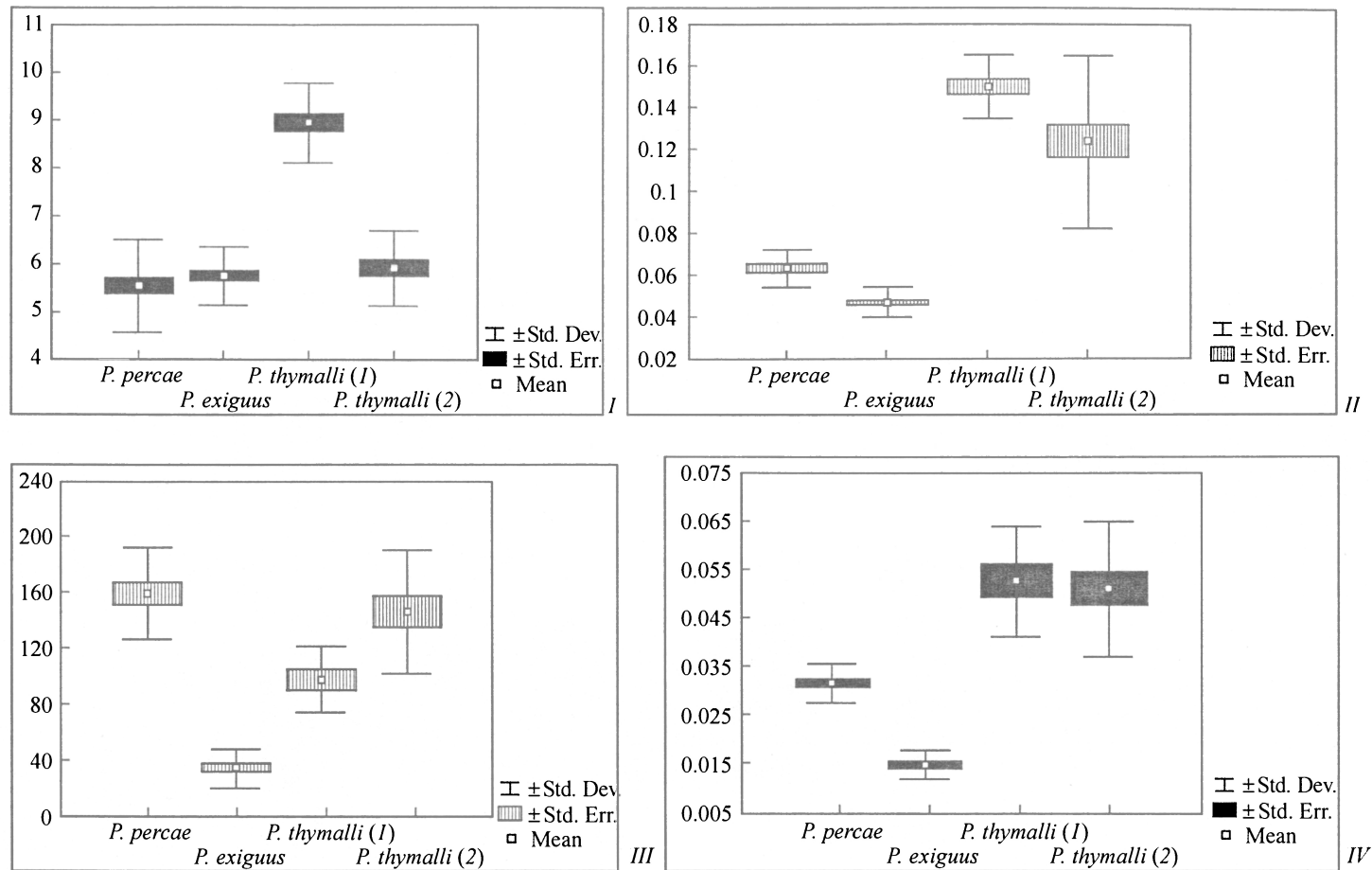


Рис. 1. Изменчивость некоторых признаков хубсугульского — *P. thymalli (1)* и байкальского *P. thymalli (2)* протеоцефалосов. Количество дивертикул в матке (*I*), диаметр боковых присосок (*II*), количество члеников в стробиле (*III*), диаметр апикальной присоски (*IV*).

Fig. 1. Variation of some characters in Lake Baikal and Lake Hovsgol (1) proteocephalids. Number of diverticula in uterus (*I*), diameter of lateral suckers (*II*), number of rosettes in strobila (*III*), diameter of apical sucker (*IV*).

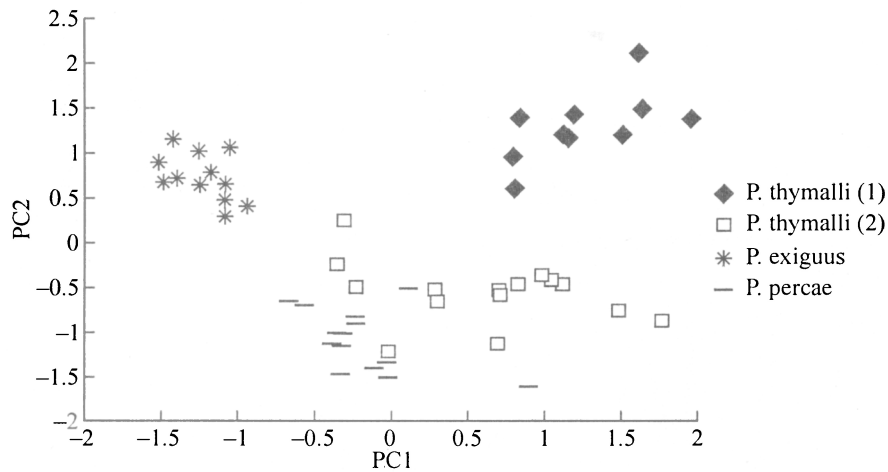


Рис. 2. Представление по 14 морфологическим признакам и их соотношению видов рода *Proteocephalus* из озер Хубсугул — *P. thymalli* (1) и Байкал — *P. percae*, *P. exiguus*, *P. thymalli* (2) в плоскости главных компонент (*PC1* и *PC2*).

Fig. 2. Representation of 14 morphological characters of species of the genus *Proteocephalus* in Lake Hovsgol, *P. thymalli* (1), and Lake Baikal, *P. percae*, *P. exiguus*, *P. thymalli* (2) in the plane of principal components (*PC1* and *PC2*).

```

P. thymalli-1 ATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTCAGTGCACGCCTTTATACGGTGAAA 60
P. thymalli-2 .....

P. thymalli-1 CCGCGAATGGCTCATTAATCAGCTATGGTTATTGGATCATACCCGTAAATGGATAAC 120
P. thymalli-2 .....

P. thymalli-1 TGTAATAACTCTAGAGCTAATACATGCCATTATGCCCTGACCCTCACGGGAATGGGTGCA 180
P. thymalli-2 .....

P. thymalli-1 CTTATTAGATCAGAAGCCAACCGTGTACFFCCFAAAFFCAGTGCATGTTGACCTTCTGGT 240
P. thymalli-2 .....

P. thymalli-1 GACTCTGGATAATTGTTACAGATCGCAGTCGGCCTCGAGTCGGCGACGGGTCTTCAAAT 300
P. thymalli-2 .....T.....

P. thymalli-1 GTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGTGACCTGCCTACCATGGTGATAACGGGTAACG 360
P. thymalli-2 .....

P. thymalli-1 GGGAAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACTTCCAAGGGAG 420
P. thymalli-2 .....

P. thymalli-1 GCAGCAGGCGCGCAAATTACCACTCCCAGTACGGGGAGGTGGTACGAAAAATACCGAT 480
P. thymalli-2 .....

P. thymalli-1 GCGGGACTCTTAACGAGGCTCCGTAATCGGAATGAGTGAACATAAAATCCTTTCACGAGG 540
P. thymalli-2 .....

P. thymalli-1 ATCAATTGGAGGGCAAGT 558
P. thymalli-2 .....

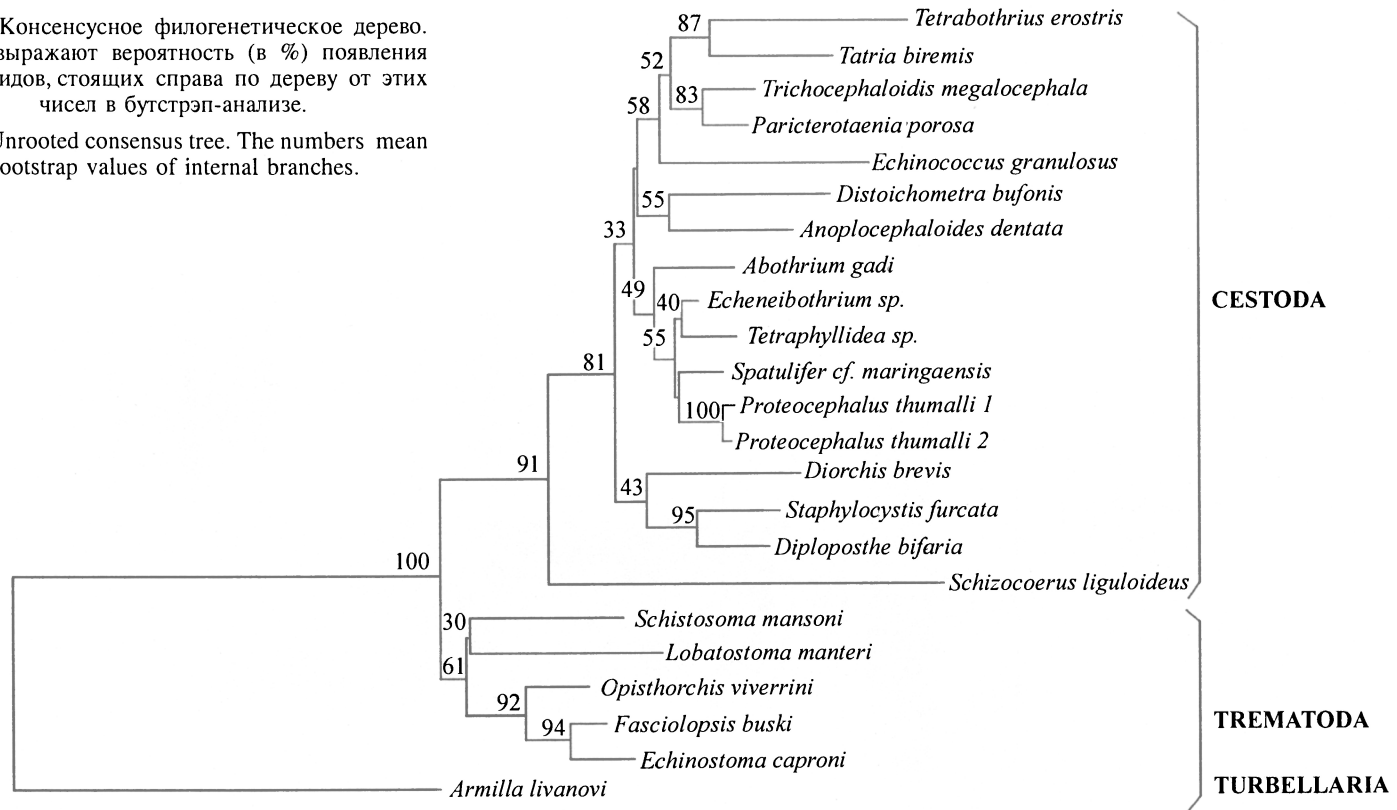
```

Рис. 3. Выравненный набор нуклеотидных последовательностей, кодирующих 5'-концевую область 18S рРНК *Proteocephalus thymalli* из озер Хубсугул (1) и Байкал (2).

Fig. 3. The nucleotide sequences of the 5'-end portion of 18S rRNA gene from representatives of *Proteocephalus thymalli* from lakes Hovsgol (1) and Baikal (2).

Рис. 4. Консенсусное филогенетическое дерево. Числа выражают вероятность (в %) появления групп видов, стоящих справа по дереву от этих чисел в бутстрэп-анализе.

Fig. 4. Unrooted consensus tree. The numbers mean bootstrap values of internal branches.



Выявлена одна вариабельная позиция: 276, по которой вид *P. thymalli* (1) из оз. Хубсугул отличается от *P. thymalli* (2) из Байкала.

Учитывая высокую эволюционную консервативность гена 18S рРНК и отсутствие полиморфизма по данному локусу, можно говорить о том, что мы имеем дело с представителями разных видов.

Результаты сравнительного анализа полученных последовательностей с известными последовательностями, взятыми из банка данных (EMBL), представлены на рис. 4. Из дендрограммы, изображенной на этом рисунке, видно, что полученные нуклеотидные последовательности группируются с последовательностью (*Echinococcus granulosus*), относящейся к классу Cestoda. Полученные данные по нуклеотидным последовательностям рДНК представителей рода *Proteocephalus* в дальнейшем могут быть использованы в филогенетическом анализе паразитических форм типа Plathelminthes на межродовом уровне и выше.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов ФЦП «Интеграция» 193 (K0998), РФФТ 98-04-49276.

Список литературы

- Анненкова-Хлопина Н. П. Гельминтологические заметки // Ежегод. Зоол. Музея Акад. Наук. 1923. Т. 24. С. 32—43.
- Быховская-Павловская И. Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Л.: Наука, 1985. 120 с.
- Дорогостайский В. Ч. К систематике хариусов Байкальского бассейна // Тр. Иркутского о-ва естествоиспытателей. 1923. Т. 1, вып. 1. С. 75—80.
- Кузнецов К. Д. Филогенетический анализ турбеллярий озера Байкал, основанный на сравнении 5'-концевых последовательностей гена 18S рибосомальной РНК. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. ИЦиГ. Новосибирск: Изд-во ИУиГ, 1995. 17 с.
- Кузнецов К. Д., Тимошкин О. А., Кумарев В. П. Молекулярная филогения планарий (Turbellaria, Tricladida, Paludicola) озера Байкал, установленная сравнительным анализом нуклеотидных последовательностей 18S рибосомной РНК // Молекулярная биология. 1996. Т. 30, вып. 6. С. 1316—1325.
- Пронин Н. М. Паразитофауна и болезни рыб // Природные условия и ресурсы Прихубсугулья в МНР. М.: Недра, 1976. С. 317—326.
- Русинек О. Т. О цестодах рода *Proteocephalus* — паразитах рыб озера Байкал // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 2. С. 127—133.
- Рыбы Монгольской Народной Республики. М.: Наука, 1983. С. 124—132.
- Томилов А. А., Черепанов В. В. Паразиты рыб озера Хубсугул (МНР) // Изв. Биолого-географического научно-исследовательского института при ИГУ. 1967. Т. 20. С. 143—149.
- Фрезе В. И. Протеоцефалы — ленточные гельминты рыб, амфибий и рептилий. М.: Наука, 1965. С. 166—169.
- de Vos T., Dick T. A. Differentiation between *Diphyllobotrium dendriticum* and *D. latum* using isozymes, restriction profiles and ribosomal gene probes // Syst. Parasitol. 1989. Vol. 13. P. 161—166.
- Gyllesten U. Direct sequencing of in vitro amplified DNA // PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. New-York: M. stockton press, 1989. P. 45—60.
- Jukes T. H., Cantor C. R. Evolution of protein molecules // Mammalian Protein Metabolism. New-York: Academic Press, 1969. P. 21—132.
- Kuznedelov K. D., Timoshkin O. A. Phylogenetic relationships of Baikalian species of Prorhynchidae turbellarian worms as inferred by partial 18S rRNA gene sequence comparisons // Mol. Marine Biol. and Biotechnol. 1993. Vol. 2. P. 300—307.
- Margolis L., Arthur J. B. Synopsis of the parasites of fishes of Canada // Bul. Fish Res. Bd. Canada, 1979. 270 pp.
- Murray V. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction // Nucleic Acids Res. 1989. Vol. 21. P. 88—89.
- Noller H. F., Woese C. R. Secondary structure of 16S ribosomal RNA // Science. 1981. 212. P. 403—411.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4. P. 406—425.

Scholz T., Ergens R. Cestodes of fish from Mongolia. Acta Soc. Zool. Bohemoslov. 1990. Vol. 54. P. 287—304.

Scholz T., Hanzelova V. Tapeworms of the genus *Proteocephalus* Weiland, 1858 (Cestoda: Proteocephalidae), parasites of fishes in Europe. Praha: Academia, 1998. P. 58—63.

Лимнологический институт, Иркутск

Поступила 9 III 2000

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL AND GENE SYSTEMATICS ANALYSIS
OF THE PROTEOCEPHALUS THYMALLI (CESTODA: PROTEOCEPHALIDAE),
A PARASITE OF GRAYLINGS IN LAKES HOVSOGOL AND BAIKAL

O. T. Rusinek, K. D. Kuznedelov

Key words: Cestoda, *Proteocephalus thymalli*, morphology, gene systematics analysis, grayling, *Thymallus arcticus*.

SUMMARY

Results of comparative morphological and gene analyses of the cestode *Proteocephalus thymalli*, an intestine parasite of the lakes Hovsogol (*Thymallus arcticus nigrescens*) and Lake Baikal graylings (*Thymallus arcticus baicalensis*) are presented for the first time. The results indicate that representatives of the *P. thymalli* from these fishes are really two different species.