



УДК 575.857:575.174.5

Разнообразие микроспоридий, паразитирующих на байкальских амфиподах *Gmelinoides fasciatus* из разных популяций

Ж. В. Кузьменкова¹, Д. Ю. Щербаков¹, Д. Э. Смит²

¹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск;

² Лидский Университет, Лидс

E-mail: kzhanna_84@mail.ru

Аннотация. Ареал *G. fasciatus* в озере Байкал образуют четыре популяции, между которыми, несмотря на отсутствие географических барьеров, наблюдается лишь незначительный обмен генами. Одной из основных преград может служить экологическая репродуктивная изоляция на основе различий в видовом составе и частоте встречаемости паразитирующих на *G. fasciatus* микроспоридий. Проведенное нами исследование показало, что между популяциями хозяина действительно существуют такие различия, следовательно, микроспоридии могут участвовать в изоляции популяций *G. fasciatus* и тем самым в процессе видообразования.

Ключевые слова: репродуктивная изоляция, байкальские эндемики, микроспоридии, байкальские амфиподы, коэволюция.

Введение

Микроспоридии – внутриклеточные облигатные эукариотические паразиты, близкородственные грибам [6; 10], с широким спектром поражаемых хозяев [16]. История их изучения насчитывает более 150 лет [7; 13; 16]. По сей день представители этой группы, живущие в Байкале, остаются слабо изученными. Наибольший интерес микроспоридии представляют в связи со своей способностью некоторых из них вызывать смещение полов в популяциях хозяина, что может приводить к формированию репродуктивных барьеров [9, 14]. Такие барьеры, возможно, обуславливают изоляцию между популяциями одного из видов байкальских амфипод *G. fasciatus*.

Ранее [2] было установлено внутривидовое подразделение вида *G. fasciatus* в Байкале на 4 популяции: Юго-Западную, Юго-Восточную, Северную и Центральную. Показан низкий уровень потока генов между установленными группами. Несмотря на то, что ареалы обитания географически не разделены, и особи *G. fasciatus* (учитывая их высокую миграционную активность [3] из разных клад могут скрещиваться между собой, потомство от таких скрещиваний скорее всего слабо, либо нежизнеспособно.

Одним из наиболее вероятных механизмов, объясняющих подразделенность на популяции, наблюдаемую у амфиподы *G. fasciatus*, а также, возможно, некоторых других видов байкаль-

ских амфипод, может служить их дифференциальная зараженность микроспоридиями.

Целью исследования стало выяснение вопроса о том, существует ли взаимосвязь между разнообразием видов микроспоридий и внутривидовым разнообразием хозяина *G. fasciatus* в Байкале.

Материалы и методы

Сбор материала и выделение ДНК. Образцы амфипод были собраны с 33 станций, расположенных в литоральной зоне по всему периметру Байкала (рис. 1). Отлов бокоплава производился сачком с берега на глубине 0–1,0 м. Экземпляры фиксировали в 96%-ном этаноле. После инкубации при 4 °С в течение двух-трех дней 96%-ный этанол заменяли на 70%-ный этанол и хранили при 4 °С. Принадлежность образцов к виду *G. fasciatus* определялась морфологическими методами, описанные в монографии А. Я. Базикаловой [1].

Препараты суммарной ДНК получали из фиксированных в 96%-ном этаноле амфипод с использованием СТАВ по модифицированному протоколу Дойла и Диксона [8].

ПЦР амплификация. Анализ проводился при помощи «nested» ПЦР (полимеразная цепная реакция) малой субъединицы рДНК с универсальными для микроспоридий праймерами V1f-1342r и внутренними праймерами 18sf-981r. ПЦР-реакция для V1f-1342r пары праймеров проводилась со следующим температурным профилем: 5 мин при 94 °С с последую-

щими 40 циклами, состоящими из 50 с при 94 °С, 1 мин при 50 °С, 1 мин 30 с при 72 °С. Процесс завершали 7 мин при 72 °С. Полученный ПЦР-продукт использовался в амплификации с 18sf-981r парой праймеров при следующих условиях: 5 мин при 94 °С с последующими 40 циклами, состоящими из 50 с при 94 °С, 1 мин при 48 °С, 1 мин при 72 °С. Процесс завершали 7 мин при 72 °С. Продукты ПЦР-реакций анализировали в 1%-ном агарозном геле в 1хТАЕ буфере.

Анализ данных. Первичную обработку расшифрованных последовательностей производили с помощью программы Bio Edit. Для анализа нуклеотидных последовательностей и построения филогенетического дерева использовали программу MrBayes v2.0 [11].

Результаты и обсуждение

Для 53 микроспоридий из 48 экземпляров *G. fasciatus* определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена малой субъединицы рДНК. Для полученных последовательностей и последовательностей, взятых из Генбанка, было построено филогенетическое дерево (рис. 2).

Анализ топологии дерева показал, что популяции хозяина заражены шестью видами микроспоридий, достаточно далеко отстоящими друг от друга на филогенетическом древе. Большая их часть, по-видимому, эндемична для Байкала. Интересно, что для паразитов вообще характерна формула: количество видов паразитов равно или превышает количество видов их хозяев [5; 12]. Для Байкала же до сих пор было характерно обратное соотношение [4]. В нашем исследовании подтверждается общераспространенная в мире ситуация, на один вид хозяина, *G. fasciatus*, приходится 6 видов паразитов. Видовой состав микроспоридий для каждой популяции показан на графике (рис. 3). Из этого графика видно, что вид *Dictyocoela duebenum* обнаружен во всех популяциях и является единственным для Северной и Центральной популяций. Относительно большая распространенность этого вида у *G. fasciatus* можно объяснить его космополитичностью и тем, что он паразитирует на *G. fasciatus* дольше, чем другие, обнаруженные в настоящем исследовании, виды микроспоридий.

В юго-западной популяции представлены все обнаруженные виды. Тот факт, что из 4 популяций *G. fasciatus* только юго-западная показывает все обилие видов паразитирующих на

них микроспоридий, можно объяснить тем, что во время массового вымирания популяции, или «бутылочного горлышка», амфиподы были наиболее подвержены инфицированию; некоторые из зараженных особей могли дать начало массовому инфицированию; а также стать толчком для образования новых видов этого паразита.



Рис. 1. Станции сбора проб

Интересным результатом оказалось обнаружение случаев двойного заражения только у представителей юго-западной популяции (рис. 4).

Присутствие большого количества видов паразитов приводит к их конкуренции и вытеснению в различные ниши. Присутствие нескольких видов паразитов в одном хозяине может говорить о наличии вертикального способа передачи микроспоридий в Байкале. Процент таких особей не велик (6,1 %).

Частота встречаемости микроспоридий не однородна в пределах вида и варьирует в зависимости от популяции от 1 % (для юго-восточной) до 49 % (для северной популяции) (рис. 5). Более того, юго-восточная популяция, по-видимому, является исходной для всех остальных популяций.

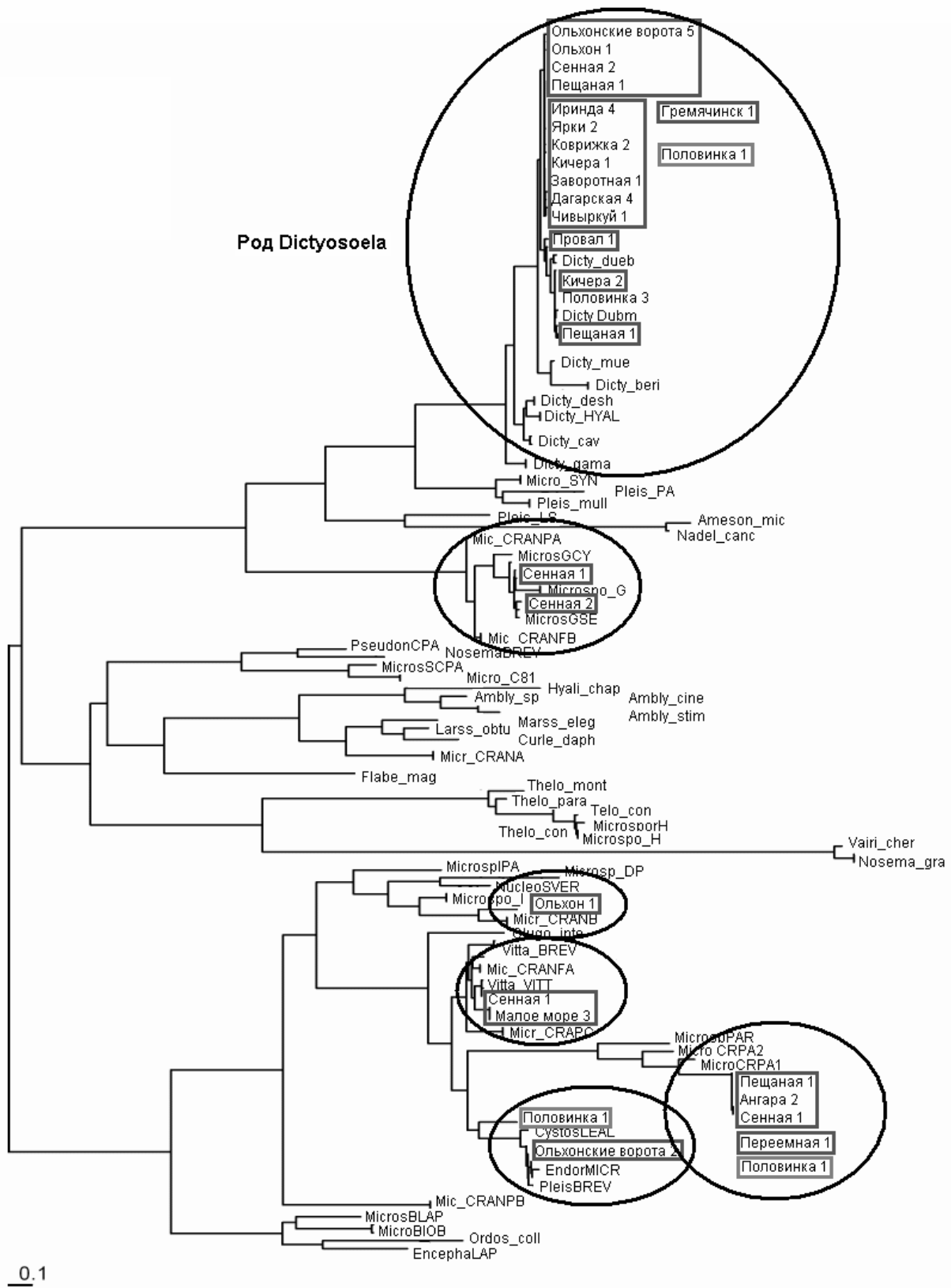


Рис. 2. Древо, построенное на основе последовательностей, полученных в ходе данного исследования, и последовательностей из Генбанка. Прямоугольниками выделены полученные нами последовательности. Овалами выделены отдельные виды микроспоридий

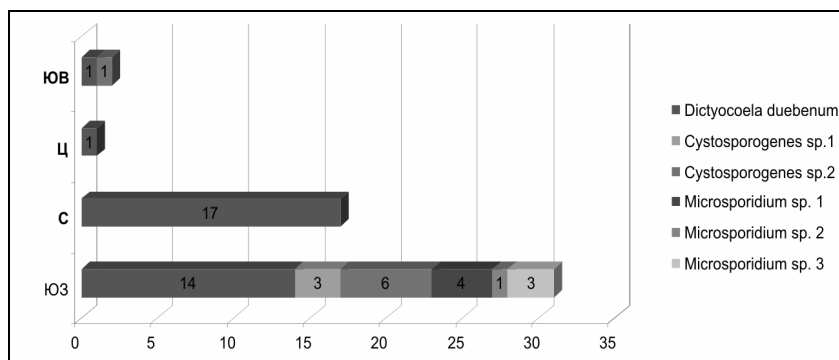


Рис. 3. Видовой состав микроспоридий в популяциях *Gmelinoides fasciatus*.

ЮВ – юго-восточная, Ц – центральная, С – северная, ЮЗ – юго-западная популяции. На оси абсцисс показано количество экземпляров микроспоридий для каждого из обнаруженных видов

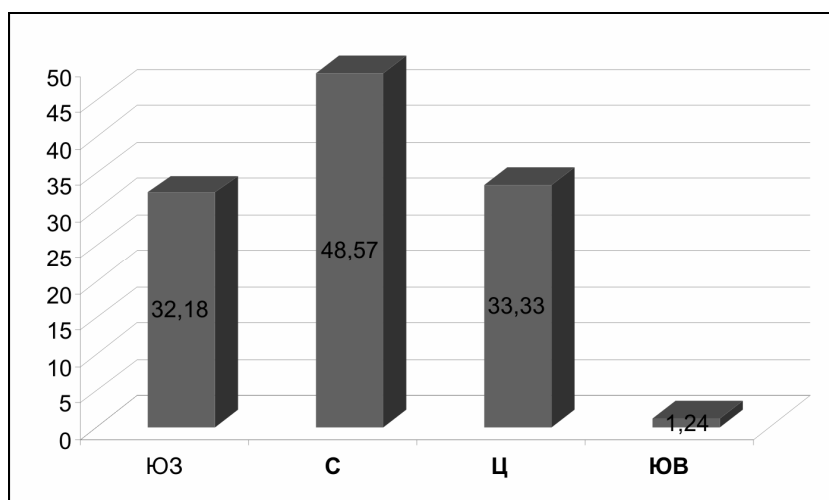


Рис. 4. Коинфекция представителей юго-западной популяции хозяина

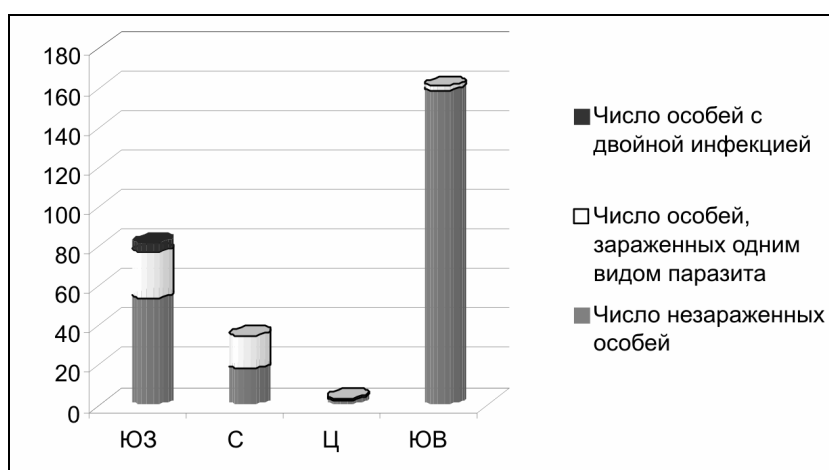


Рис. 5. Частота встречаемости (%) микроспоридий в популяциях *Gmelinoides fasciatus*

Заключение

В результате проведенных исследований выявлена зараженность популяций *G. fasciatus* шестью видами микроспоридий, которые, скорее всего, являются эндемичными для Байкала.

Один из обнаруженных видов *D. duebenum*, является космополитным (обнаружен во всех популяциях хозяина). Видовой состав этих паразитов, частота встречаемости и коинфицирование в четырех популяциях резко различаются. Именно эти различия могут служить причиной

формирования репродуктивных барьеров между существующими популяциями и тем самым поддерживать слабый межпопуляционный обмен генами, а также быть причиной, вызвавшей и/или поддерживающей относительные репродуктивные барьеры между популяциями. В случае если удастся продемонстрировать экспериментально репродуктивную изоляцию между представителями различных популяций, а также обнаружить диагностические морфологические различия, эти популяции можно описывать как самостоятельные виды. Не исключено, однако, что дифференциальное заражение микроспоридиями может быть и вторичным эффектом подразделенности вида. Для подтверждения или опровержения выдвинутого предположения требуются дополнительные исследования.

Литература

1. Базикалова А. Я. Амфиподы озера Байкал / А. Я. Базикалова // Тр./ Байкальск. Лимнол. Станции. – Иркутск, 1945. – Т. 11. – 440 с.
2. Популяционная структура байкальского бокоплова *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) / Г. В. Гоманенко [и др.] // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 8. – С. 1108–1114.
3. Камалтынов Р. М. Амфиподы (Amphipoda, Gammaroidea). Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна / Р. М. Камалтынов. – Новосибирск : Наука, 2001. – 252 с.
4. Русинек О. Т. Паразиты рыб озера Байкал / О. Т. Русинек. – М. : Товарищество научных изданий КМК, 2007. – 571 с.
5. Ann N. Y. Interactions between interactions: predator-prey, parasite-host, and mutualistic interactions / N. Y. Ann // Acad Sci. – 2008. – Vol. 1133. – P. 180.
6. Baldauf S. L. The deep roots of Eukaryotes / S. L. Baldauf // Science 300. – 2003. – P. 1703–1706.
7. Canning E. U. The Microsporidia of Vertebrates / E. U. Canning, J. Lom, I. Dykova. – New York : Academic, 1986. – 289 с.
8. Doyle J. J. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis / J. J. Doyle, E. Dickson // Taxon. – 1987. – Vol. 36. – P. 715–722.
9. The diversity of reproductive parasites among arthropods: Wolbachia do not walk alone / O. Duron [et al.] // BMC Biol. – 2008. – Vol. 6. – P. 27.
10. Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins / R. P. Hirt [et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA 96. – 1999. – C. 580–585.
11. Huelsenbeck J. P. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny / J. P. Huelsenbeck, F. R. Ronquist // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17. – P. 754–755.
12. Parasites in food webs: the ultimate missing links / K. D. Lafferty [et al.] // Arim M Ecol Lett. – 2008. – Vol. 11(6). – P. 533–546.
13. Sprague V. Systematics of the Microsporidia / V. Sprague, J. Vavra // Comparative Pathobiology. – New York : Plenum, – 1977. – 510 p.
14. Widespread vertical transmission and associated host sex-ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora / R. S. Terry [et al.] // Proc. R. Soc. Lond. 271. – 2004. – P. 1783–1789.
15. Are we underestimating the diversity and incidence of insect bacterial symbionts? A case study in ladybird beetles / L. A. Weinert [et al.] // Biol. Lett. – 2007. – Vol. 3 – C. 678–681.
16. Wittner M. The Microsporidia and Microsporidiosis / M. Wittner, L. M. Weiss // American Society of Microbiology. – Washington : DC, 1999. – 553 p.

Diversity of microsporidia, that parasitize on baikal amphipods *Gmelinoides fasciatus* from different populations

Zh. V. Kuz'menkova¹, D. U. Sherbakov¹, J. E. Smith²

¹ Institute of Limnology SB RAS, Irkutsk;

² University of Leeds, Leeds

Abstract. Areal of *G. fasciatus* in Baikal Lake is subdivided into four geographically continuous regions inhabited by four genetically distinct populations. Gene flow between the populations is impeded significantly. Geographic barriers between populations are absent. One of the potential reasons for that might be the ecological reproductive isolation caused by differential infection with microsporidia. We have found that indeed different populations differ dramatically both by species of microsporidian parasites and infection rate. This may point at the participation of the parasites in isolation of these populations and thereby in process of the speciation.

Key words: reproductive isolation, Baikal endemics, microsporidia, Baikal amphipods, coevolution.

Кузьменкова Жанна Владимировна
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278
аспирант, ведущий инженер
тел. (395 2) 42-29-23, факс (395 2) 42-54-05
E-mail: kzhanna_84@mail.ru

Щербаков Дмитрий Юрьевич
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278
доктор биологических наук
зав. лабораторией геносистематики
тел. (395 2) 42-29-23, факс (395 2) 42-54-05,
E-mail: sherb@lin.irk.ru

Смит Джудит
Лидский Университет
Lidс Miall 8.24, LS2 9JT, UK
профессор
тел. +44(0) 113 34 32892
E-mail: j.e.smith@leeds.ac.uk

Kuz'menkova Zhanna Vladimirovna
Institute of Limnology SB RAS
664033, Irkutsk, 3, Ulan-Batorskaya St.
doctoral student, leading engineer
phone (395 2) 49-29-23, fax: (395 2) 42-54-05
E-mail: kzhanna_84@mail.ru

Scherbakov Dmitriy Yurievitch
Institute of Limnology SB RAS
664033, Irkutsk, 3, Ulan-Batorskaya St.
D. Sc. in Biology, Head of Laboratory of Gene Systematics
phone: (395 2) 42-29-23, fax: (395 2) 42-54-05
E-mail: sherb@lin.irk.ru

Smith Judith
University of Leeds
Miall 8.24, Leeds, LS2 9JT, UK,
Prof., Head of the Smith J. Group, School of Biology
phone: +44(0) 113 34 32892
E-mail: j.e.smith@leeds.ac.uk