

Выявление возбудителя хитридиомикоза земноводных (*Batrachochytrium* spp.) в коллекциях и природных популяциях

Выпускная квалификационная
бакалаврская работа
студента 4 курса
Кейси А.Э.

Научные руководители:

ведущий научный сотрудник
кафедры микологии и альгологии,
д.б.н., Александрова Алина Витальевна

доцент
кафедры зоологии позвоночных,
к.б.н., Поярков Николай Андреевич

Введение

- ▶ Сокращение популяций земноводных, вплоть до полного вымирания отдельных видов, признано одной из глобальных проблем охраны природы, а сами земноводные считаются наиболее уязвимой группой позвоночных животных. Показано, что одной из основных причин гибели земноводных является хитридиомикоз – поражение грибами рода *Batrachochytrium* (Chytridiomycota, Chytridiomycetes, Rhizophydiales).
- ▶ В середине XX-го столетия в зоопарках США была зафиксирована гибель лягушек-древолазов (*Dendrobates*) по неизвестным на тот момент причинам.



Dendrobates auratus



Dendrobates azureus



Litoria caerulea

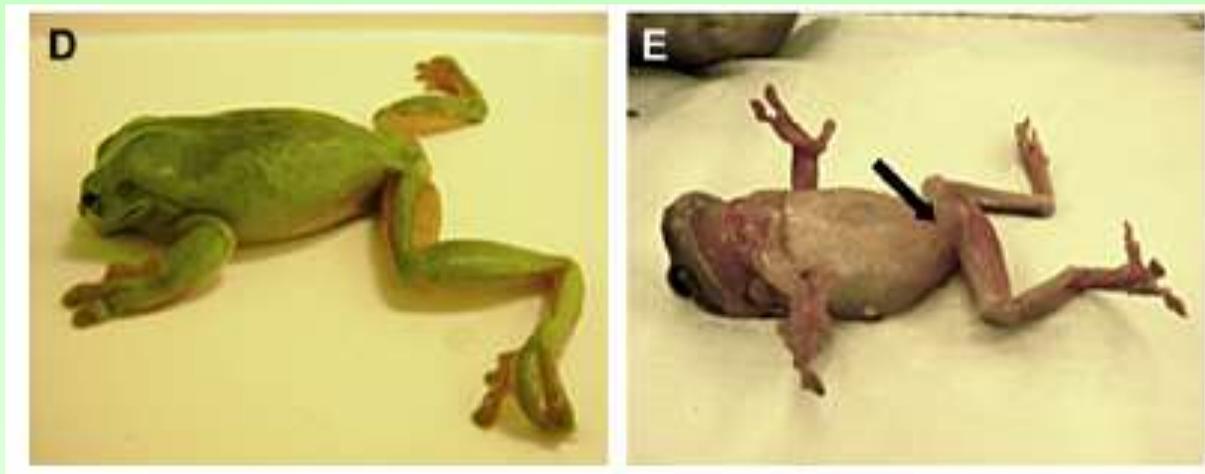
- ▶ 1998-1999 гг. – был выделен патоген с кожи умерших лягушек в культуру и описан как новый вид:

Batrachochytrium dendrobatidis Longcore, Pessier & D.K. Nichols

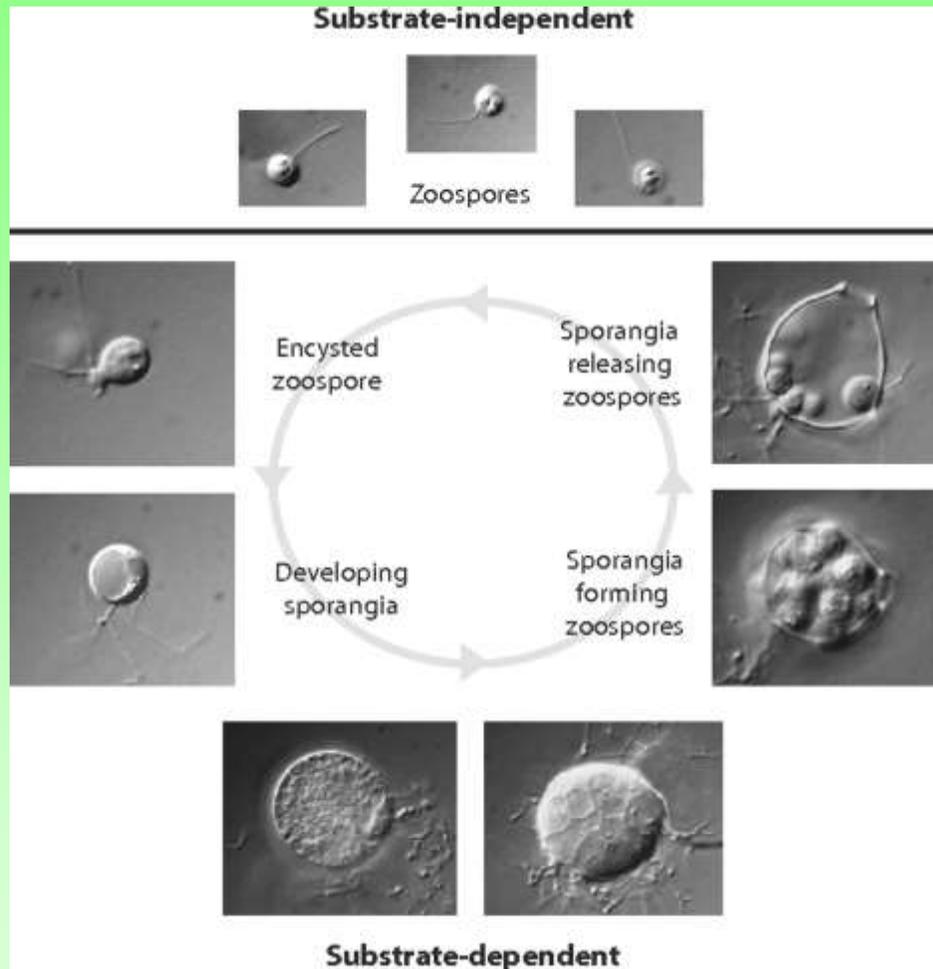
- ▶ 2013г. – на основе молекулярных данных выделен второй вид:

Batrachochytrium salamandrivorans A. Martel, Blooi, Bossuyt & Pasmans

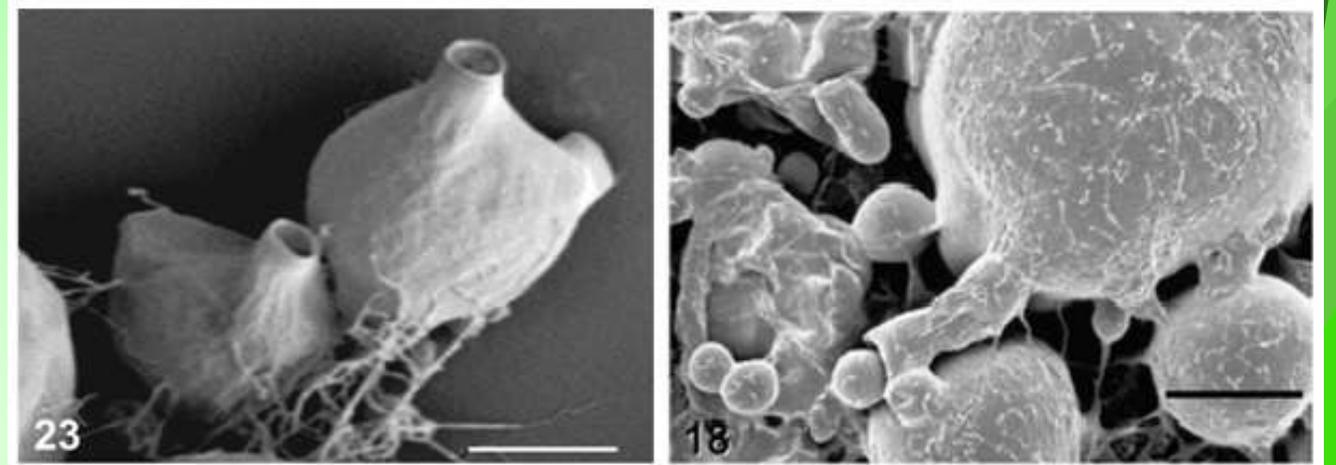
- ▶ На сегодняшний день этот возбудитель является одной из наиболее вероятных причиной вымирания диких популяций амфибий по всему земному шару.
- ▶ За последние годы грибы рода *Batrachochytrium* обнаружены по всему миру, однако существует только одна работа, сообщающая о его обнаружении в России (Reshetnikov et al. 2014).



Жизненный цикл и морфология



СЭМ. Выводные трубочки на зооспорангиях (по Berger et al., 2005) и зооспорангий с зооспорой в конце длинной выводной трубочки (по Boyle et al., 2003). Масштаб = 2 μ m и 10 μ m соответственно



Жизненный цикл
Batrachochytrium dendrobatidis
(по Rosenblum et al., 2008)

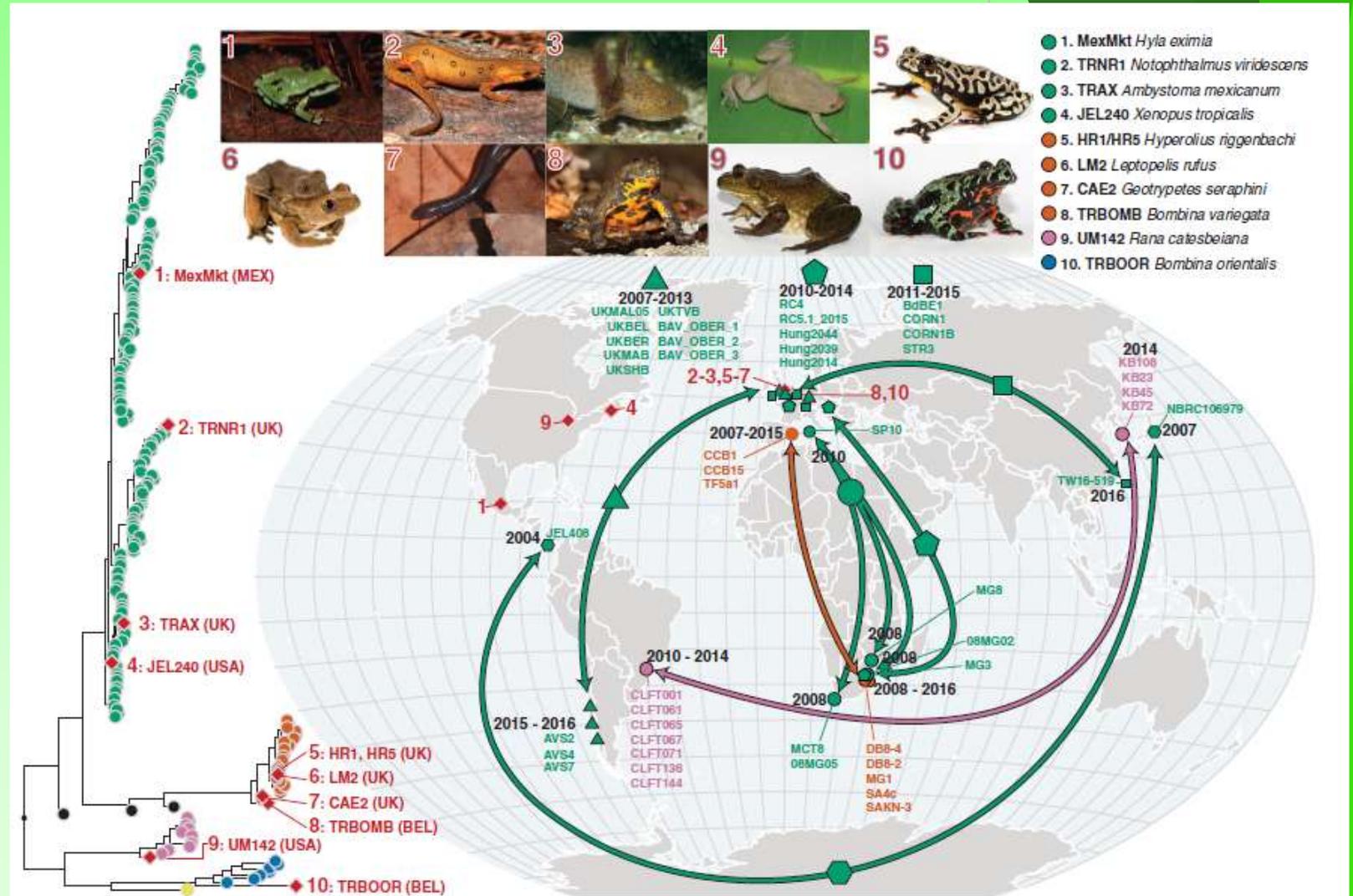
Географическое распространение

Существует множество разрозненных статей, сообщающих о находках *B. dendrobatidis* во всех странах мира, однако до мая 2018-го года не было единого мнения, где этот гриб возник и как расселялся.

Максимальное генетическое разнообразие показала линия изолятов ASIA-1 с Корейского полуострова. Это позволило предположить, что Восточная Азия является возможным местом происхождения *B. dendrobatidis*.

Предполагается, что распространение линии VdGPL в XX веке совпало с развитием широкой международной торговли амфибиями.

Трансконтинентальные инвазии новых линий *B. dendrobatidis* приводят к возникновению гибридных геномов, постоянно повышающих генетическое разнообразие.



Цель работы:

Отработать молекулярные методы выявления грибов рода *Batrachochytrium* в пробах, полученных от различных видов земноводных в природных популяциях и из коллекционного материала

Задачи:

- ▶ Получить биологический материал от различных видов земноводных
- ▶ Провести гистологическое исследование пораженных экземпляров
- ▶ Проверить его на наличие грибов рода *Batrachochytrium* молекулярными методами:
 - ▶ ПЦР со специфическими праймерами для *Batrachochytrium* (Bd1a и Bd2a; Annis et al., 2004),
 - ▶ ПЦР со специфическими для хитридиомицетов праймерами (ITS1-3 Chytr и 5.8S Chytr; Goka et al., 2009),
 - ▶ ПЦР с универсальными для грибов праймерами (ITS5 и ITS4) (White et al., 1990),
 - ▶ секвенирование полученных фрагментов ITS по Сенгеру,
 - ▶ метагеномный анализ с применением секвенирования нового поколения

Материалы и методы

Объём собранного и полученного материала



Вид и место сбора	Количество образцов
<i>Bufo bufo</i> (Московская обл, Рузский р–н окр.оз.Глубокое)	90
<i>Rana temporaria</i> (Московская обл, ЗБС, Ольховник)	36
<i>Bufo bufo</i> (Московская обл, ЗБС, Стерляжий пруд)	30
<i>Rana temporaria</i> (Московская обл, ЗБС, Костин пруд)	20
<i>Bufo bufo</i> (Московская обл, ЗБС, Вырубка)	20
<i>Rana arvalis</i> (Московская обл, ЗБС, Вырубка)	4
<i>Rana arvalis</i> (Брянская обл, заповедник Брянский лес)	30
<i>Hynobius kimurae</i> (Япония, преф. Саитама, Ураяма)	6

Гистологический метод

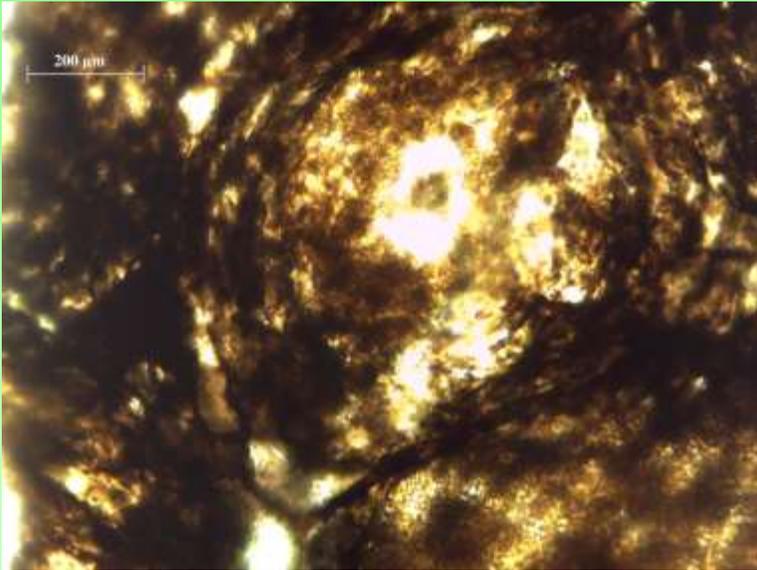
- ▶ Для гистологического изучения эпидермиса с явными признаками хитридиомикоза скальпелем сняли фрагменты поражённой кожи с фиксированных в спирте углубов, сделали толстые срезы, которые поместили на предметное стекло и смотрели в капле воды под покровным стеклом на микроскопе Leica D500 при увеличениях $\times 150$ и $\times 600$ раз.
- ▶ Изготовили на микротоме тонкие гистологические срезы (5 мкм) с обезвоживанием в смесях этанола и бутанола с повышающейся концентрацией бутанола и последующей фиксацией в парафине, прокраской гематоксилином и эозином.

Молекулярные методы

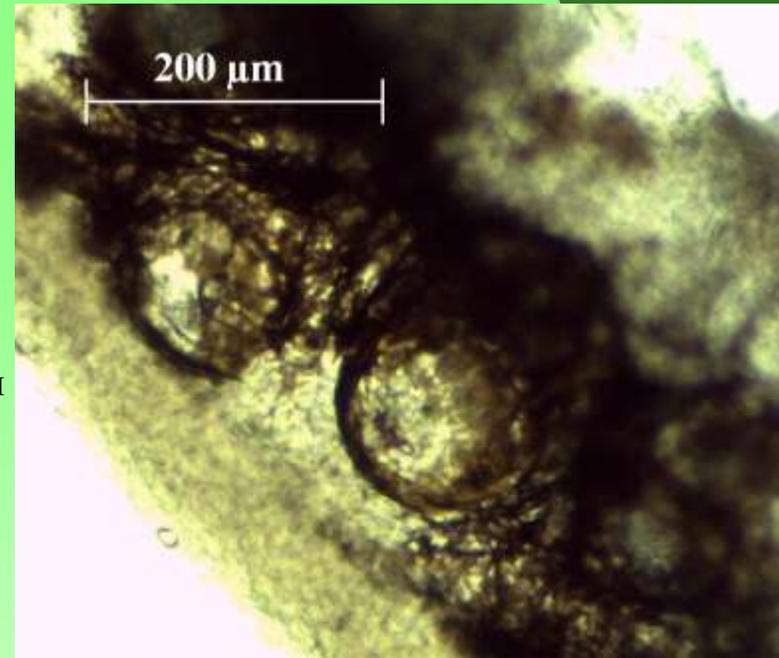
- ▶ Выделение ДНК из биоматериала проводили фенол-хлороформным методом по стандартной методике с использованием протеиназы К и последующим осаждением изопропанолом (на базе лаборатории молекулярной зоологии кафедры зоологии позвоночных).
- ▶ Амплификацию ДНК грибов проводили методом ПЦР фрагмента кластера рибосомальных генов ITS1–5,8S–ITS2 ядерной ДНК с праймерами:
 - 1) специфическими для *Batrachochytrium* (Bd1a и Bd2a; Annis et al., 2004),
было обработано 124 пробы
 - 2) специфическими для хитридиомицетов (ITS1-3 Chytr и 5.8S Chytr; Goka et al., 2009),
было обработано 14 проб
 - 3) универсальными для грибов праймерами (ITS5 и ITS4; White et al., 1990),
было обработано 34 пробы
- ▶ 10 проб ПЦР-продукта передали ни лабораторию ЕВРОГЕН для проведения метагеномного анализа методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения.
- ▶ 5 проб ПЦР-продукта передали на метагеномный анализ в ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Результаты

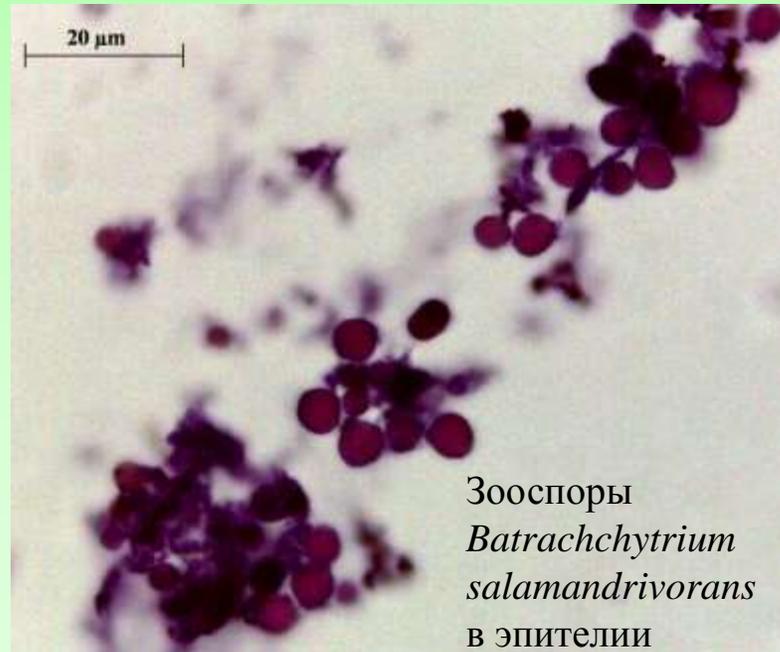
Гистологический метод



Внешний вид фокального утолщения со спорангием *Batrachchytrium salamandrivorans*.
(без окраски)



Фокальные утолщения в эпидермальном слое кожи углозуба, вызванные появлением спорангиев (без окраски)



Зооспоры *Batrachchytrium salamandrivorans* в эпителии

(окраска гематоксилин-эозин)

Результаты и обсуждение ПЦР-анализ с *Batrachochytrium*-специфическими праймерами

Результаты ПЦР-анализа образцов с углозубов (Япония)

Вид	Код пробы	Bd1a/Bd2a
<i>Hynobius kimurae</i> (сильное поражение)	U1	+
<i>Hynobius kimurae</i> (сильное поражение)	U2	+
<i>Hynobius kimurae</i> (среднее поражение)	U3	+
<i>Hynobius kimurae</i> (слабое поражение)	U4	+
<i>Hynobius kimurae</i> (нет видимого поражения)	U5	+
<i>Hynobius kimurae</i> (нет видимого поражения)	U6	+

Результаты ПЦР-анализа образцов головастиков *Rana arvalis* из Брянского леса.

Код пробы	Bd1a/Bd2a	Код пробы	Bd1a/Bd2a
1b	-	1c	-
2b	-	2c	-
3b	-	3c	-
4b	-	4c	-
5b	-	5c	-
6b	-	6c	-
7b	-	7c	-
8b	-	8c	-
9b	-	9c	-
10b	-	10c	-

Результаты ПЦР-анализа образцов, собранных в МО, ЗБС

Вид	Код пробы	Bd1a/Bd2a
<i>BufoBufo</i> (МО, ЗБС, Стерляжий пруд)	BST XIX	-
<i>BufoBufo</i> (МО, ЗБС, Стерляжий пруд)	BST XXIII	-
<i>Rana temporaria</i> (МО, ЗБС, Ольховник)	Q9	-
<i>Rana temporaria</i> (МО, ЗБС, Ольховник)	Q10	-
<i>Bufo bufo</i> (МО, ЗБС, Вырубка)	V12	-
<i>Bufo bufo</i> (МО, ЗБС, Вырубка)	V14	-
<i>Rana temporaria</i> (МО, ЗБС, Костин пруд)	19TC	-
<i>Rana temporaria</i> (МО, ЗБС, Костин пруд)	20TC	-

Результаты ПЦР-анализа образцов головастиков (А, В) и метаморфирующих (С) *Bufo bufo*, присланных Н.А.Решетниковым

Код пробы	Bd1a/Bd2a	Код пробы	Bd1a/Bd2a	Код пробы	Bd1a/Bd2a
A-1	-	B-1	-	C-1	-
28 строк с отрицательным результатом					
A-30	-	B-30	-	C-30	-

ПЦР-анализ с *Batrachochytrium*-специфическими праймерами (Bd1a/Bd2a)



Результаты ПЦР-анализа (Bd1a/Bd2a) из образцов головастика *Rana arvalis* из Брянского леса.

Буквами b и c обозначены серии животных из близко лежащих локальных водоёмов.

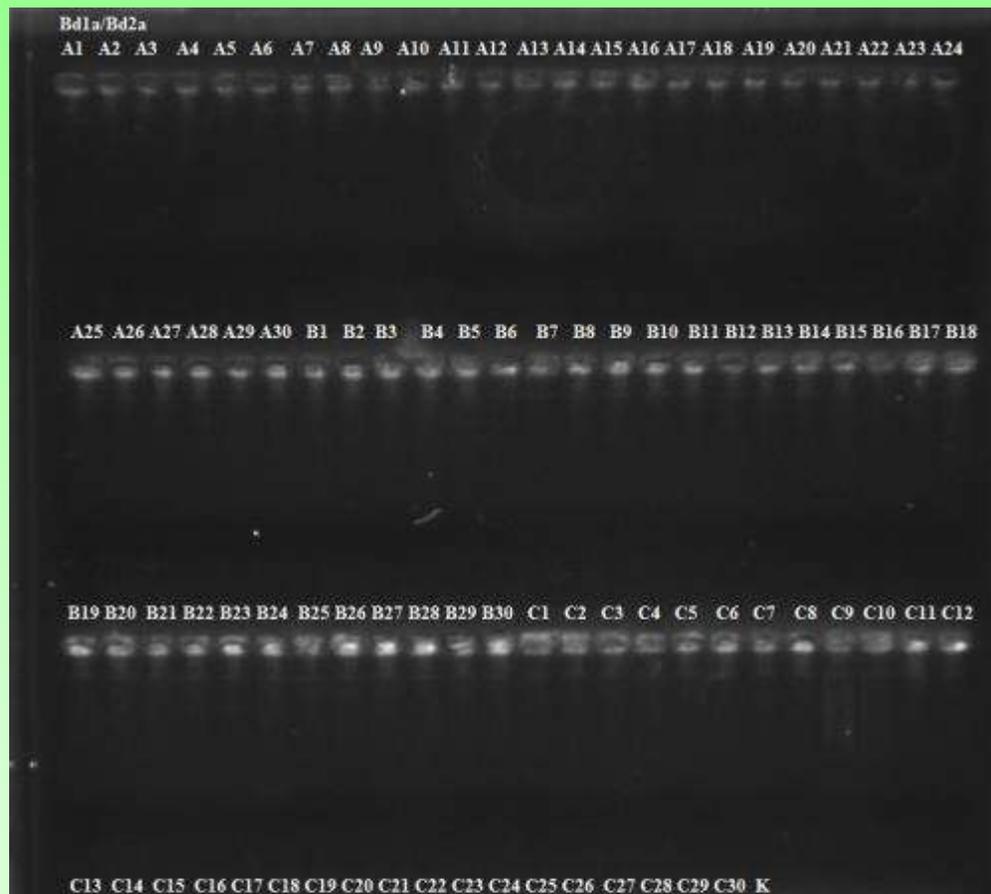
Bd1a/Bd2a

U1 U2 U3 U4 U5 U6 7 8 9 10 11 12 13 14 K



Результаты ПЦР-анализа (Bd1a/Bd2a) образцов *Hynobius kimurae* и 8 мазков, взятых с различных амфибий из окрестностей ЗБС. U1–U6 – пробы, полученные от *Hynobius kimurae* из коллекции Зоомузея (собраны в Японии); 7–8 *Bufo bufo* (ЗБС, Стерляжий пруд); 9–10 *Rana temporaria* (ЗБС, ольховник); 11–12 *Bufo bufo* (ЗБС, вырубка); 13–14 *Rana temporaria* (ЗБС, Костин пруд); K – контроль *Batrachochytrium*, присланный Др. Эн Мартел из университета Гент (Голландия)

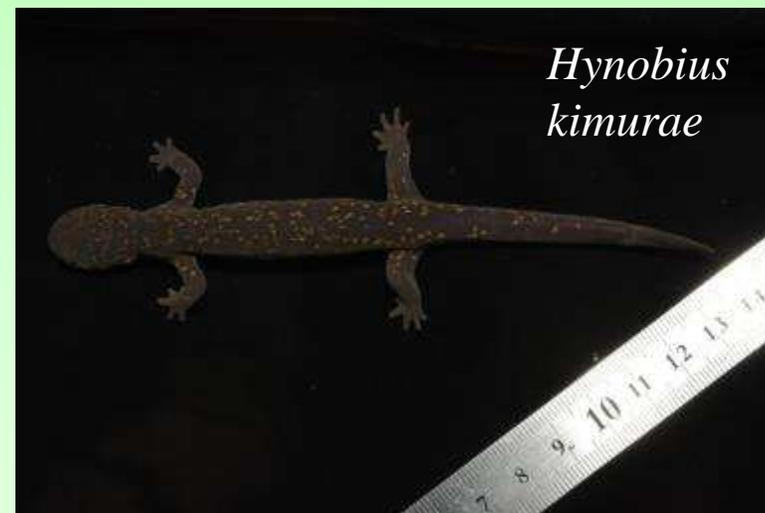
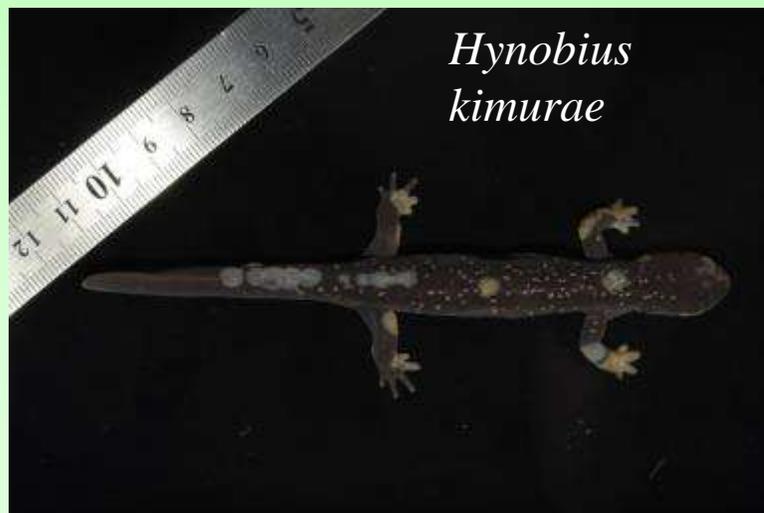
Результаты ПЦР-анализа образцов головастика (А, В) и метаморфирующих (С) *Bufo bufo*, присланных Н.А.Решетниковым (окр. оз. Глубокое, Рузский р-н М.О)



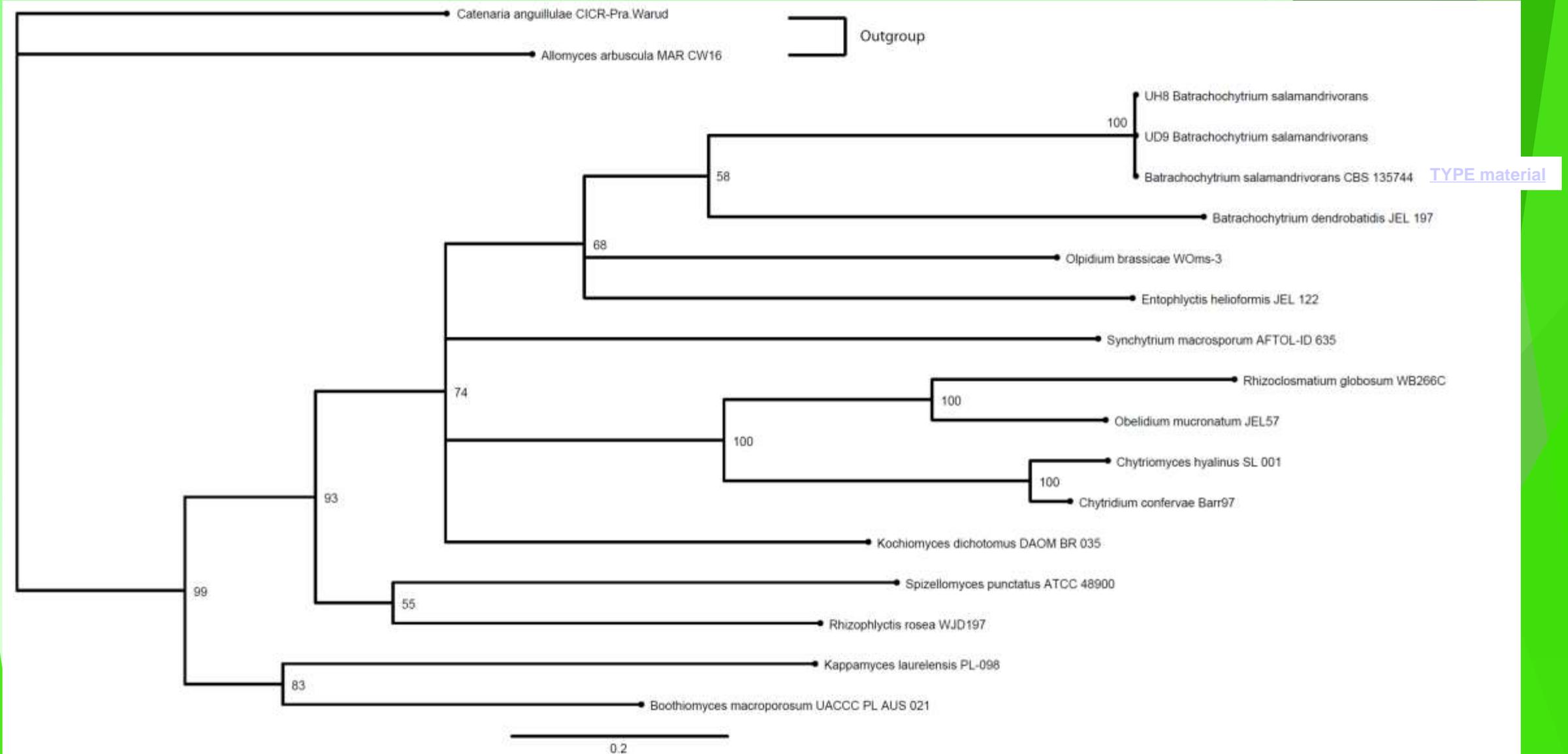
А – оз. Глубокое; В. С – пруд W-13; К – контроль *Batrachochytrium*, присланный Др. Эн Мартел из университета Гент (Голландия)

Результаты секвенирование полученных фрагментов ITS по Сенгеру

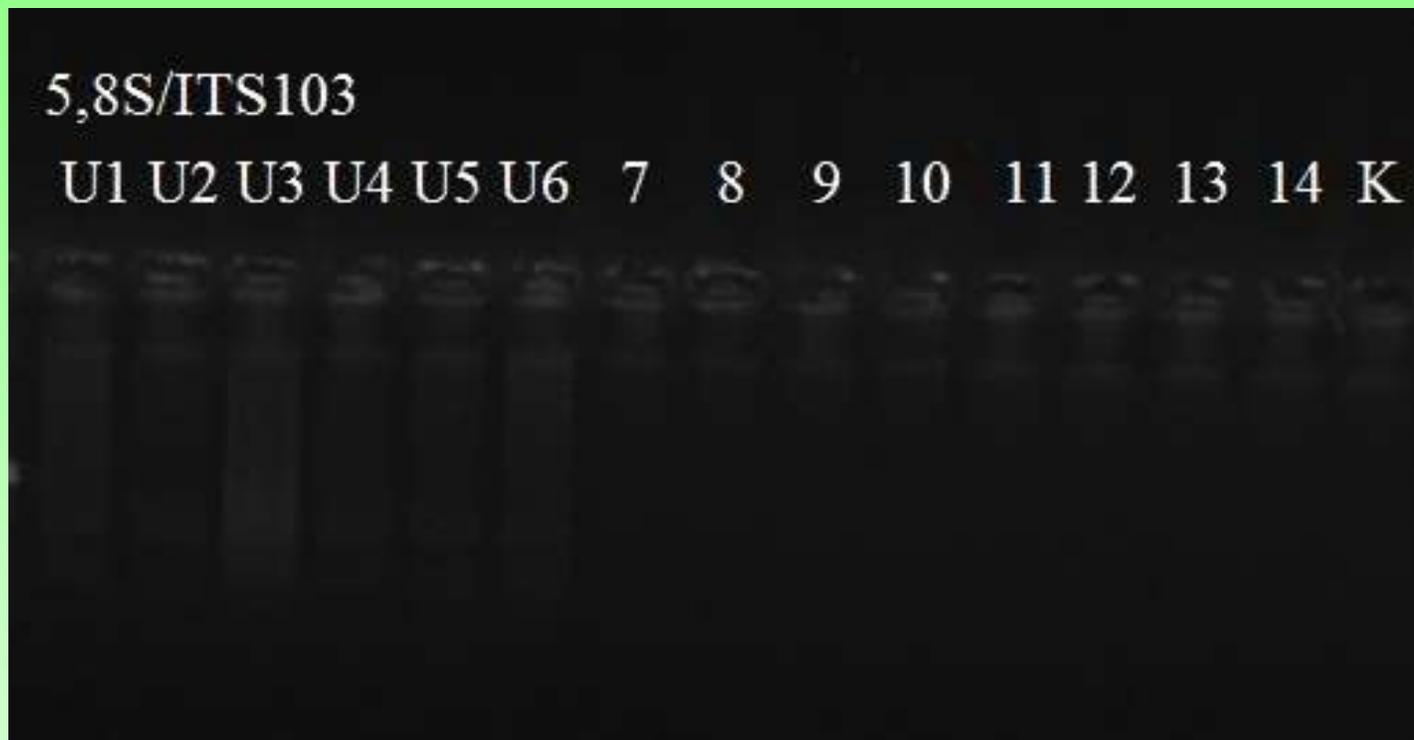
ПРОБА	РАСШИФРОВКА № ПРОБЫ	ГЕНБАНК №	СООТВЕТСТВУЮЩИЙ ВИД	ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ
U1_Bd1a_H8	<i>Hynobius kimurae</i> (Сильное поражение)	NR_111867.1 Query cover 100% Ident 100%	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> CBS 135744 ITS region; from TYPE material	Fungi; Chytridiomycota; Chytridiomycetes; Rhizophydiales; Rhizophydiales incertae sedis; Batrachochytrium.
U5_Bd1a_D9	<i>Hynobius kimurae</i> (незаметное поражение)	NR_111867.1 Query cover 98% Ident 99%	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> CBS 135744 ITS region; from TYPE material	Fungi; Chytridiomycota; Chytridiomycetes; Rhizophydiales; Rhizophydiales incertae sedis; Batrachochytrium.



Дерево, построенное по принципу максимальной правдивости, по последовательностям ITS; [bootstrap support = 100; Bayesian posterior probability (BPP) = 100]
Allomyces arbuscul и *Catenaria anguillulae* приняты в качестве аут-группы



ПЦР со специфическими праймерами для хитридиомицетов (ITS1-3 Chytr и 5.8S Chytr)



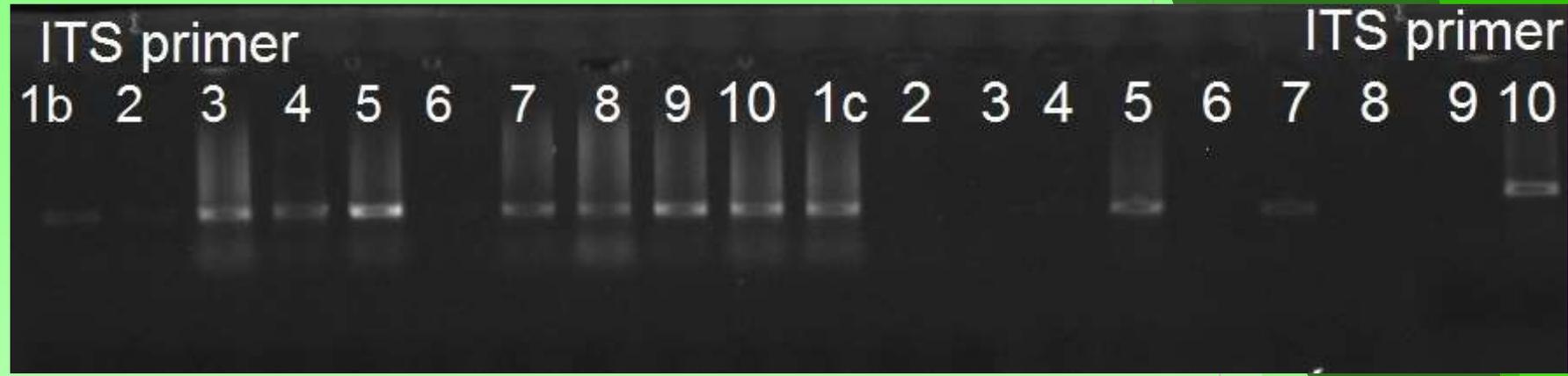
Результаты ПЦР-анализа (5,8S/ITS1-3) образцов *Hynobius kimurae* и 8 мазков, взятых с различных амфибий из окрестностей ЗБС.

U1-U6 – пробы, полученные от углозубов из коллекции Зоомузея (собраны в Японии); 7-8 *Bufo bufo* (ЗБС, Стерляжий пруд); 9-10 *Rana temporaria* (ЗБС, ольховник); 11-12 *Bufo bufo* (ЗБС, вырубка); 13-14 *Rana temporaria* (ЗБС, Костин пруд); К – контроль *Batrachochytrium*, присланный Др. Эн Мартел из университета Гент (Голландия)

ПЦР с универсальными для грибов праймерами (ITS5 и ITS4)

Результаты ПЦР-анализа (ITS1/ITS2) образцов головастиков *Rana arvalis* из Брянского леса.

Буквами b и c обозначены серии животных из близко лежащих локальных водоёмов.



Результаты ПЦР-анализа (ITS5r/ITS4f) образцов *Hynobius kimurae* и мазков, взятых с различных амфибий из окрестностей ЗБС



U1-U6 – пробы, полученные от углозубов из коллекции Зоомузея (собраны в Японии); 7-8 *Bufo bufo* (ЗБС, Стерляжий пруд); 9-10 *Rana temporaria* (ЗБС, ольховник); 11-12 *Bufo bufo* (ЗБС, вырубка); 13-14 *Rana temporaria* (ЗБС, Костин пруд); К – контроль *Batrachochytrium*, присланный Др. Эн Мартел из университета Гент (Голландия)

Результаты метагеномного анализа образцов головастиков (B22) и метаморфизирующих особей (C) из пруда W-13, Рузского р-на МО, предоставленных Н.А. Решетниковым

Вид	Таксономическое положение	В каких пробах найден
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Thermus thermophilus</i> <i>Pseudomonas sp</i>	Бактерии (Bacteria)	B22 B22 C3 C10
<i>Alaria spp.</i>	Беспозвоночные, черви-трематоды (Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda)	C15
<i>Vorticellides cf. infusionum</i> <i>Trichodina</i>	Простейшие, инфузории (Alveolata, Ciliophora)	B22 C3 C10 C15 B22 C3 C10 C15
<i>Cladosporium asperulatum</i> <i>Humicola fuscoatra</i> <i>Gnomonia gnomon</i> <i>Malassezia</i> <i>Penicillium bialowiezense</i> <i>Penicillium biourgeianum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium goetzii</i>	Грибы (Fungi, Dikarya; Ascomycota и Basidiomycota), Fungi; Dikarya;	B22 C10 B22 C3 C3 C3 B22 C3 C15 B22 C3 C15
<i>Camellia atrothea</i> <i>Mentha longifolia</i> <i>Chamerion angustifolium</i> <i>Cymbopogon citratus</i> <i>Eryngium glomeratum</i> <i>Hibiscus sabdariffa</i>	Высшие растения (Plantae, Angiospermae)	C10 C15 C10 C10 C12 C12
<i>Vibriophage JSF5</i>	Вирусы (Viruses; unclassified bacterial viruses)	B22 C15

Выводы

- ▶ Полученные гистологические препараты участков эпидермиса углозубов *Hynobius kimurae* из центральной Японии показали наличие хитридиомикоза.
- ▶ Исследование проб взятых с пораженных углозубов молекулярными методами подтвердило наличие *Batrachochytrium salamandrivorans*.
- ▶ Использование для выявления хитридиомикоза специфических праймеров для *Batrachochytrium* (Bd1a и Bd2a) показало, что данный метод работает и позволяет выявить заболевание у животных из зараженных популяций, как с видимыми признаками поражения кожи, так и без них.

Выводы

- ▶ Анализ проб, собранных в популяциях бесхвостых амфибий из Подмосковья (окрестности ЗБС и оз. Глубокое), а также Брянской области (н.п. Брянский лес), с использованием праймеров, специфических к возбудителям рода *Batrachochytrium*, присутствия патогена не показал.
- ▶ ПЦР–анализ со специфическими для большинства хитридиомицетов праймерами (ITS1–3 Chytr и 5.8S Chytr) в образцах из популяции пёстрого углозуба (Япония) и подмосковных амфибий положительной результата не дал.
- ▶ Анализ проб с использованием праймеров, универсальных для грибов (Fungi), выявил присутствие других грибов в 59% изученных проб.
- ▶ Метагеномный анализ показал наличие в пробах (из окр. оз. Глубокое) ряда грибов, не патогенных по отношению к животным, но способных к факультативному развитию на их покровах.

Спасибо за внимание!



Bufo boreas

Благодарности

Я хотела бы поблагодарить всех оказавших мне помощь и поддержку в этой работе.

В первую очередь моих научных руководителей: **Александрову Алину Витальевну** и **Пояркова Николая Андреевича**.

В сборе материала на Звенигородской биостанции существенную помощь оказал **Ляпков Сергей Марленович**. Кроме этого он предоставил образцы из других регионов России.

Особую признательность хочу выразить **Решетникову Николаю Александровичу**, предоставившему пробы из водоёма, где гриб был выявлен в прошлые годы.

В лабораторной работе очень помогли сотрудники, магистры и аспиранты каф. зоологии позвоночных, оказавшие поддержку и помощь в осуществлении молекулярной работы: **Артюшин Илья Витальевич**, : **Дубровская Анна Сергеевна**, **Горин Владислав Анатольевич**, **Зыонг Ван Танг**, а также, давшие своевременную критику: **Банникова Александра Андреевна** и **Лебедев Владимир Святославович**.

Так же хотелось бы выразить благодарность за помощь в гистологической работе: бакалавру каф. эмбриологии – **Фроловой Веронике Сергеевне**, и ведущему инженеру каф. эмбриологии **Великанову Александру Николаевичу**.

За предложенную помощь и осуществление метагеномного анализа: **Сперанской Анне Сергеевне**.

За дополнительную обработку молекулярных данных: **Антонову Евгению Андреевичу**.

А так же **Дьякову Максиму Юрьевичу**, **Артыковой Алёне Владимировне** и **Игнатиюк Василине Михайловне** за всестороннюю поддержку во время написания работы.