

УДК 576.895.122 : 576.316(235.33)

© 1990

**КАРИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРЕМАТОД СЕМЕЙСТВ
NOTOCOTYLIDAE, ECHINOSTOMATIDAE И STRIGEIDAE
ИЗ СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ЧУКОТКИ**

Я. В. Баршене, Р. Б. Пятквичюте, Г. Й. Станявичюте, О. М. Орловская

Хромосомные комплексы 6 видов трематод, эмбриональное развитие которых происходит в экстремальных условиях севера, состоят из 20 хромосом. В наборах преобладают одноплечие, активно эволюционирующие элементы геномов. У нотокотилид и стригейд были найдены дополнительные В-хромосомы, которые в условиях северо-западной Чукотки, очевидно, увеличивают комбинативную изменчивость, изменяют общий пулл генов и, вероятно, участвуют в регуляции дифференциальной активности генома и взаимоотношений в системах «паразит—хозяин».

Трематоды имеют сложные циклы развития и на некоторых стадиях онтогенеза не содержат четко выраженных межвидовых морфологических отличий. И наоборот, известны случаи, когда на определенных стадиях развития у генетически близкородственных видов морфологические различия бывают значительными. Следовательно, при изучении трематод гельминтологи часто сталкиваются с проблемой идентификации вида, для решения которой наряду с традиционными становятся необходимыми методы, позволяющие охарактеризовать цитогенетические параметры вида.

Особый интерес представляют исследования закономерностей преобразования структурной организации генома у организмов, эмбриональное развитие которых происходит в экстремальных условиях севера. Целью нашего исследования было изучение особенностей хромосомных комплексов в клетках различных видов партенит, которые были собраны в маленьких пресных водоемах, расположенных вблизи побережья Чаунской губы Восточно-Сибирского моря. Кариологический анализ был осуществлен у трематод из сем. *Notocotylidae*, *Echinostomatidae* и *Strigeidae*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал для кариологических исследований добывался летом 1986 г. Промежуточные хозяева трематод — моллюски — выдерживались 5—12 ч в 0.005%-ном растворе митостатика колхицина. Вода для раствора бралась из естественных водоемов. Видовая принадлежность гельминтов определялась по церкариям. Для изучения хромосомных наборов *Notocotylus* sp. было собрано 120 зараженных их партенитами моллюсков *Anisus acronicus*. С целью определения видового статуса *Notocotylus* sp. экспериментально были заражены домашние утята.

Кариотип *Echinoparyphium pseudorecurvatum* изучался у партенит, которые были найдены у 21 экз. моллюсков *A. acronicus*. От 10 экз. моллюсков *A. acronicus* и 2 экз. *Lymnaea zazurensis* были зафиксированы ткани со спороцистами

Cotylurus cornutus (Rudolphi, 1808; Szidat, 1928). Хромосомные комплексы *Ichthyocotylurus pileatus* (Rudolphi, 1802) Odening, 1969 изучались в клетках партенит, обнаруженных у 1 экз. *L. azurensis*, а *I. erraticus* (Rudolphi, 1809) Odening, 1969 — у 23 экз. *Valvata helicoidea*. Из 32 моллюсков *A. acronicus* были зафиксированы спороцисты *Apatemon fuligulae* (Yamaguti, 1933).

Для кариологического анализа брали ткани моллюсков вместе с партенитами. Гипотонию клеток осуществляли в течение 1 ч в дистиллированной воде, которую при этом меняли трижды. Фиксацию проб проводили в фиксаторе, в состав которого входили 3 части этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты. Препараты готовили из свежего материала (чаще всего на 2-й—3-й дни после фиксации) по модифицированной нами методике (Баршене, 1981). Классификация хромосом осуществлялась по методу Левана с соавторами (Levan e. a., 1964).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Большинство изученных нотокотилид в соматических клетках имели 20 хромосом (рис. 1). Первая пара хромосом субметацентрического типа, средние ее размеры 6.31 мкм, что составляет 18.57 % от длины всего гаплоидного набора. Хромосомы 2-й и 3-й пар имеют субтерминально расположенную центромеру. Элементы 4-й и 6-й пар относятся к субметацентрическим хромосомам. Хромосомы из 5-й пары являются типично метацентрическими, их центромерный индекс равен 49.02 (см. таблицу). Остальные 4 пары хромосомного комплекса нотокотилид из Чаунской низменности образованы одноплечими акроцентрическими элементами. Абсолютные размеры этих хромосом колеблются от 1.73 до

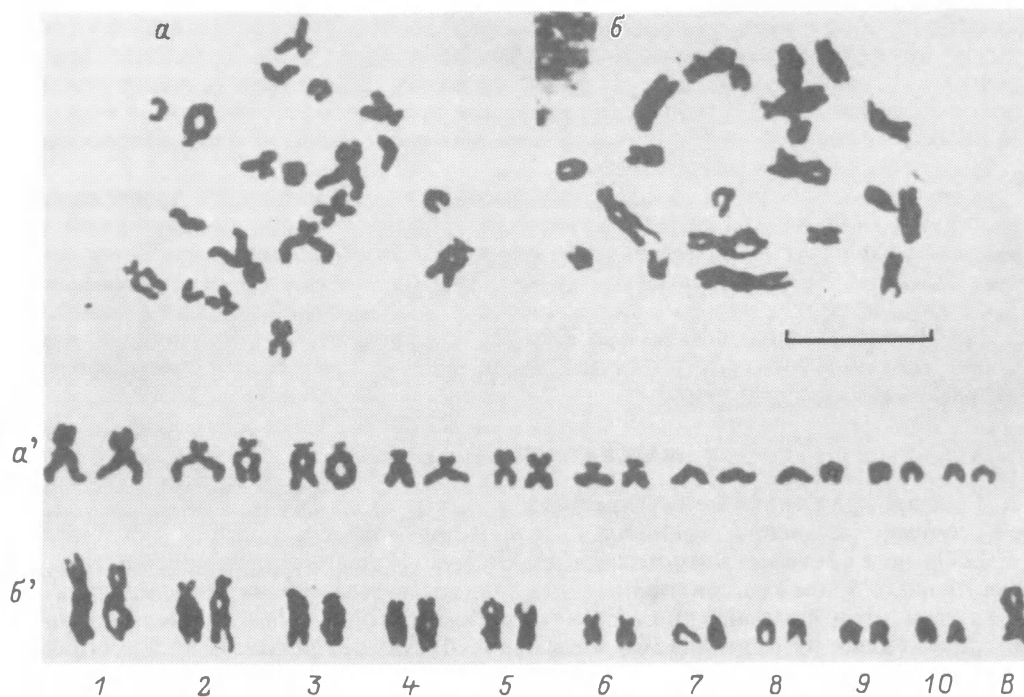


Рис. 1. Кариотипы *Notocotylus* sp.

a — кариоморфа $2n=20$, метафазная пластинка, *a'* — кариотип; *b* — кариоморфа $2n=21$, метафазная пластинка, *b'* — кариотип. Шкала — 10 мкм.

Измерения центромерного индекса хромосом

№ пар хромосом	<i>Notocotylus</i> sp.	<i>Echinoparyphium pseudorecurvatum</i>	<i>Cotylurus cornutus</i>	<i>Apatemon fuligulae</i>	<i>Ichthyocotylurus erraticus</i>	<i>Ichthyocotylurus pileatus</i>
1	34.05±0.69	35.47±0.99	9.49±0.87	22.95±0.41	43.44±0.84	9.34±0.96
2	23.51±0.90	9.29±0.67	7.46±0.68	20.69±0.64	9.05±0.74	10.44±0.87
3	17.09±0.62	10.03±0.51	9.22±0.52	26.08±0.53	8.92±0.84	11.02±1.38
4	29.17±0.60	11.71±0.65	9.60±0.39	8.21±0.42	10.50±0.74	13.40±2.02
5	49.02±0.13	16.46±1.32	9.29±0.86	11.18±0.47	8.72±0.47	18.67±0.89
6	35.42±1.18	16.29±1.01	16.29±1.01	29.63±0.77	28.26±0.63	23.67±3.32
7		24.84±1.78	12.38±1.15	28.61±1.28	29.16±0.51	17.84±2.44
8		11.37±0.88	21.52±1.86	30.56±0.76	33.21±1.50	43.02±1.13
9		23.89±2.82	22.37±0.89	42.84±0.75	44.99±0.71	39.28±2.86
10		14.03±1.87	47.01±0.23	46.26±0.52	47.51±0.52	45.80±0.61
B	48.73±0.46					

2.30 мкм и вносят весьма скромный вклад в общую длину гаплоидного набора (общая длина четырех последних пар составляет лишь 23.38 % от длины всего гаплоидного набора хромосом).

Помимо партенит с нормальными диплоидными числами хромосом, у двух промежуточных хозяев были найдены партениты, в эмбриональных клетках которых имелись дополнительные структурные элементы генома. У одного моллюска *Anisus acronicus* были обнаружены партениты *Notocotylus* sp., содержащие дополнительную метацентрическую хромосому (рис. 1). Абсолютная ее длина 3.53 мкм, что в среднем составляло 9.90 % от длины всего гаплоидного набора. Кроме того, впервые у гельминтов был описан необычайно интересный феномен — целая система дополнительных хромосом, которая была образована крупным метацентрическим элементом и от 3 до 9 мелких акроцентрических единиц генома. Встречались клетки, в ядрах которых дополнительными были только мелкие акроцентрические хромосомы (рис. 2). Таким образом, у данного моллюска были найдены партениты, содержащие переменное количество элементов: от 21 до 30 хромосом.

У изученных нами нотокотилид пока неизвестен жизненный цикл. Мы экспериментально заражали домашних утят и получили мариты, которые по морфологическим особенностям были весьма близки к виду *N. attenuatus* (Rudolphi, 1809). Однако их кариологические характеристики сильно отличались от тех, которые нами были описаны у *N. attenuatus* (Пятквичюте, Баршене, 1988). Хромосомные комплексы нотокотилид из Чаунской низменности были весьма похожи на кариотипы *N. noyeri* Joyeux, 1922. В дальнейшем следует подробно изучить жизненный цикл *Notocotylus* sp. при этом целесообразно проводить экспериментальное заражение диких птенцов северо-западной Чукотки. В Чаунской низменности встречаются мариты 6 видов рода *Notocotylus* (Орловская, Леонов, 1975).

Диплоидный набор хромосом *Echinoparyphium pseudorecurvatum* включает 20 единиц (рис. 3). В кариотипе выделяется первая пара хромосом, которая по локализации центромеры относится к субметацентрическому — метацентрическому типу. Данная пара элементов в среднем имеет 8.93 мкм и составляет 19.39 % от длины всего гаплоидного набора. Хромосомы 2—4-й, 8-й пар относятся к акроцентрическим, поскольку их центромерный индекс не достигает 12 (см. таблицу). Остальные элементы структурной организации генома имеют субтерминальную локализацию центромер. Абсолютная длина самых мелких хромосом комплекса 2.45 мкм, что составляет лишь 5.36 % от длины всего гаплоидного набора.

На основе абсолютных и относительных размеров хромосомы трематод сем. Strigeidae можно разделить на две группы. Первая включает 5 пар крупных

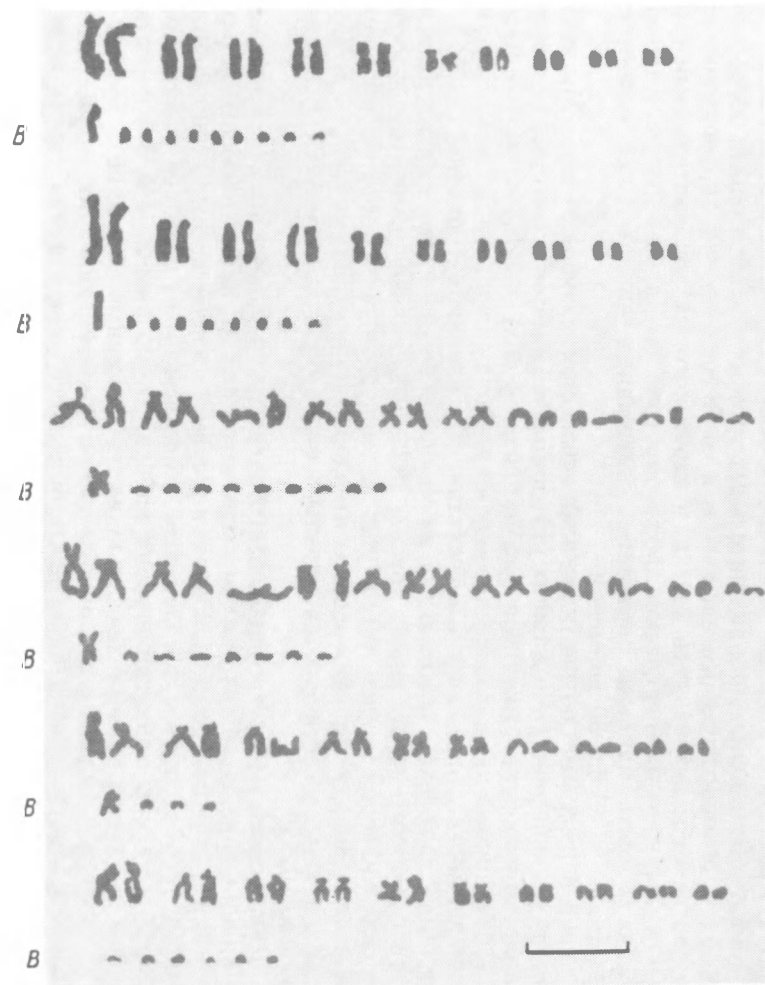


Рис. 3. Кариотип *Echinoparyphium pseudorecurvatum*, $2n=20$. Шкала 10 мкм.

←
Рис. 2. Кариотип *Notocotylus* sp. с дополнительными В-хромосомами. Шкала — 10 мкм.

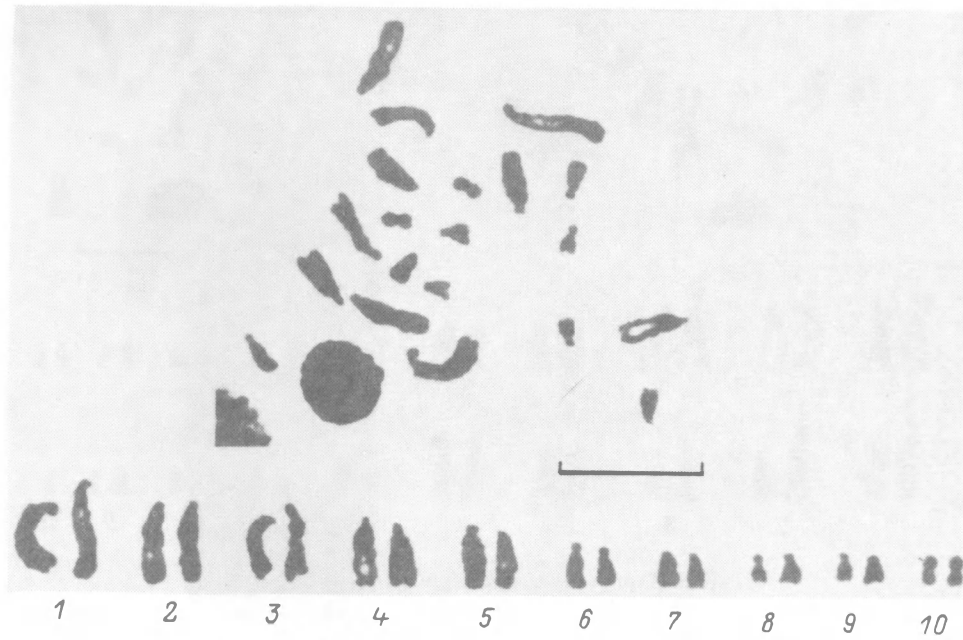


Рис. 4. Кариотип *Cotylurus cornutus*, $2n=20$. Шкала 10 мкм.



Рис. 5. Кариотипы *Apatemon fuligulae*.

а — кариоморфа $2n=20$; метафазная пластинка, а' — кариотип; б — кариоморфа $2n=21$, метафазная пластинка, б' — кариотип.

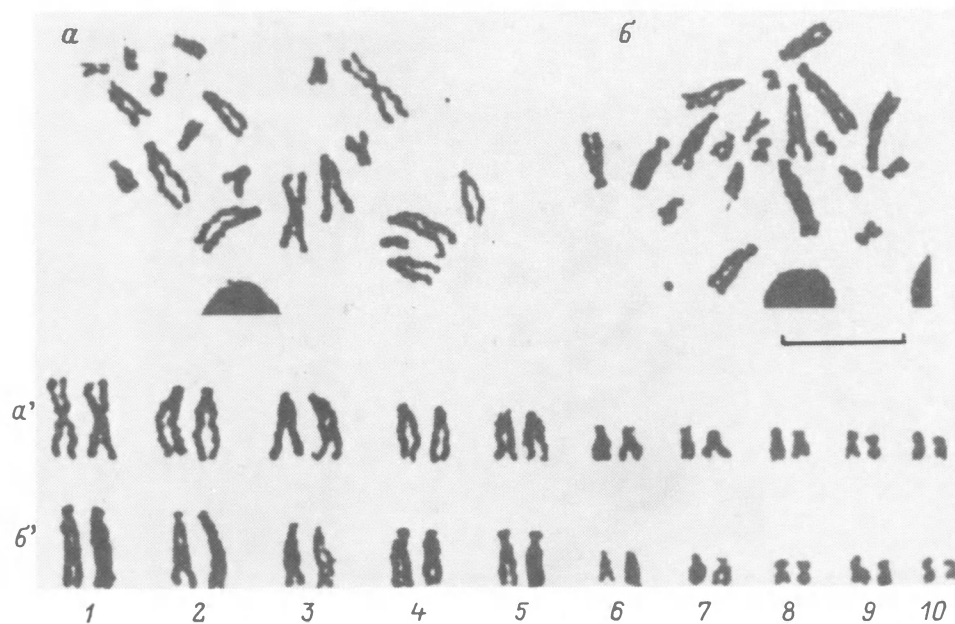


Рис. 6. Кариотип *Ichthyocotylurus erraticus*.

a — метафазная пластинка, *a'* — кариотип; *b* — метафазная пластинка *I. pileatus*, *b'* — кариотип. Шкала — 10 мкм.

структурных единиц, общая длина которых составляет около 70 % от длины всего гаплоидного набора. Во вторую группу входят 10 мелких элементов генома.

В диплоидном комплексе *Cotylurus cornutus* было описано 20 хромосом (рис. 4). Относительная длина первых 5 пар элементов составляет 71.6 % от длины всего гаплоидного набора. Абсолютные размеры хромосом из данной группы колеблются от 4.26 до 7.17 мкм. Интересным фактом является то, что хромосомы всех пяти самых крупных пар относятся к акроцентрическому типу, центромерный индекс которых ниже 10 (см. таблицу). В группе мелких хромосом выделяется 10-я пара, которая представлена метацентрическими элементами. Остальные мелкие хромосомы (из 6—9-й пар) имеют субтерминальную локализацию центромеры. Абсолютные размеры 5 пар мелких хромосом комплекса варьируют от 1.77 до 2.72 мкм.

Хромосомный комплекс *Apatemon fuligulae* включает также 20 элементов (рис. 5). 1-я и 2-я пары имеют субтерминальную локализацию центромер, 3-я, 6—8-я пары представлены субметацентрическими хромосомами. Две пары из группы крупных элементов (4-я и 5-я) относятся к одноплечим акроцентрическим хромосомам, а две пары самых мелких элементов набора образуют метацентрические элементы (см. табл.). Абсолютные размеры хромосом из первой группы колеблются от 4.57 до 6.77 мкм, а мелкие структурные единицы имеют размеры от 1.91 до 3.01 мкм и составляют около 30 % от длины всего гаплоидного набора.

У двух моллюсков *Anisus acronicus* были найдены партениты, в клетках которых имелась одна дополнительная мелкая акроцентрическая хромосома (рис. 5). По своим морфологическим особенностям она не была гомологичной какой-либо другой паре нормального диплоидного набора хромосом. Ее абсолютные размеры достигают лишь 1.6 мкм, что составляет 4.33 % от длины гаплоидного набора.

Кариотип *Ichthyocotylurus erraticus* состоит из 20 хромосом (рис. 6). В группе крупных элементов ярко выделяется 1-я пара хромосом, которая имеет медиальное расположение центромеры. Хромосомы 2—5-й пар относятся к одноплечим акроцентрическим элементам, центромерный индекс которых ниже 11 (см. табл.). Абсолютная длина хромосом первых 5 пар варьирует от 3.82 до 5.77 мкм, и в общем размере гаплоидного набора они составляют 68.3 %. В группе мелких элементов кариотипа абсолютная длина составляет от 1.78 до 2.85 мкм. Хромосомы 6—8-й пар имеют субмедиальное расположение центромер, две последние пары относятся к метацентрическим хромосомам.

У близкородственного вида стригеид *I. pileatus* структура кариотипа более характерна для сем. Strigeidae. Первые 5 пар набора составляют 70.7 % от длины всего гаплоидного комплекса. Хромосомы из 1—3-й пар — акроцентрические, 4-й — акроцентрические—субтелоцентрические, 5—7-й — субтелоцентрические, а остальные пары состоят из метацентрических элементов кариотипа (рис. 6). Абсолютные размеры крупных хромосом колеблются от 4.07 до 6.44 мкм, мелких единиц кариотипа — от 1.60 до 2.57 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе содержится лишь одна работа, посвященная изучению количества хромосом у трематод из сем. Notocotylidae. У *N. filamentis* из американской популяции в мейозе было описано 7 структурных единиц (Ciordia, 1950). Можно предположить, что эта цифра ошибочная, так как в те годы еще не существовало корректных кариологических методов исследования. У четырех видов нотокотилид — *N. ephemera*, *N. attenuatus*, *N. imbricatus* и *N. noyeri* — нами были определены 20 хромосом (Пяткявичюте, Баршене, 1988). Все эти виды достоверно отличались между собой по структуре кариотипов.

Нотокотилиды из северо-западной Чукотки также имеют 20 хромосом в комплексах, а по структуре кариотипа оказались наиболее родственными с видом *N. noyeri*. Их различия сводятся к незначительным изменениям локализации центромер хромосом четырех первых пар. Более крупная перичентрическая инверсия отмечена в 5-й паре хромосом. Следует подчеркнуть, что партениты *N. noyeri* и *Notocotylus sp.* паразитируют у близкородственных промежуточных хозяев, а дефинитивные хозяева (грызуны и птицы) относятся к разным классам животных. Такая же корреляция между особенностями структурной организации хромосомного аппарата и филогенетическими связями промежуточных хозяев была нами описана у других трех видов нотокотилид (Пяткявичюте, Баршене, 1988).

Трематоды сем. Echinostomatidae кариологическими методами изучены более подробно, и в литературе имеется 10 работ, посвященных изучению эхиностом из родов *Echinostoma*, *Neoacanthoparyphium*, *Hypoderaeum*, *Pegosomum*, *Echinoparyphium* и *Moliniella*. При этом было выявлено, что 5 видов рода *Echinostoma* содержат по 22 хромосомы (Churchill, 1950; Мутафова, Канев, 1983; 1986; Terasaki e. a., 1982; Баршене, Киселене, 1987). *E. hortense*, *Hypoderaeum conoideum*, *Pegosomum asper*, *P. saginatum*, *Echinoparyphium recurvatum*, *E. aconiatum* содержат по 20 хромосом (Александрова, Подгорнова, 1978; Terasaki e. a., 1982; Мутафова, Канев и др., 1986; Баршене, Киселене, 1987). В кариотипах эхиностом с 20 элементами 1-я пара представлена крупными двуплечими хромосомами, которые в процессе эволюции кариотипа возникли за счет Робертсоновских транслокаций. Размеры хромосом данной пары составляют 16—20 % от длины всего гаплоидного набора. Изученный нами вид *Echinoparyphium pseudorecurvatum* из водоемов Чукотки также имеет пару таких крупных маркерных элементов. Следовательно, этот вид является предста-

вителем более ранней (по сравнению с представителями рода *Echinostoma*) филогенетической группы эхиностом.

В литературе существует мнение, что эволюция хромосомного аппарата организмов сопровождалась увеличением доли двуплечих элементов в наборах (White, 1973). Исходя из этого, можно утверждать, что трематоды сем. Strigeidae составляют филогенетически совсем молодую и, по всей вероятности, активно эволюционирующую группу гельминтов. К сожалению, пока совсем не было проведено работ по изучению особенностей хромосомного аппарата стригеид. Нами было выявлено определенное сходство общих черт структуры кариотипов изученных видов, что указывает на тесные филогенетические связи в данном семействе трематод. Межвидовые различия в структурной организации генома возникли главным образом за счет перичентрических инверсий, а также транслокаций и дупликаций генетического материала.

Таким образом, общей чертой трематод из трех изученных семейств является то, что они относятся к сравнительно молодым и активно эволюционирующим группам гельминтов.

Особого внимания заслуживает факт существования кариотипических морф у северных нотокотилид и стригеид. Следует отметить, что дополнительные хромосомы, по всей вероятности, являются так называемыми В-хромосомами, которые у трематод были описаны нами впервые. В популяции марит *Notocotylus noyeri* хромосомы такого рода встречались у 34,6 % изученных особей. В мейозе у марит они образуют унивваленты, поскольку не имеют гомологии с другими элементами набора.

В-хромосомы были описаны у сотни видов различных растений и животных. Эти элементы в геномах у потомства встречаются с более высокой частотой, чем этого можно ожидать исходя из менделеевских законов наследственности (Jones, Rees, 1982). Частота и количество В-хромосом в популяциях некоторых организмов может быстро изменяться (Nur, Brett, 1985). Что касается их функциональной активности и значения в различных процессах адаптации, в литературе содержатся противоречивые мнения. Одни авторы считают, что В-хромосомы содержат генетически инертный материал. Другие придерживаются мнения, что данные элементы генома имеют адаптивное значение, так как принимают участие в эколого-физиологических механизмах приспособления популяции к определенным экологическим условиям (Белянина, 1986).

В экстремальных условиях севера, в биотопах, которые промерзают до дна, могут существовать холоднокровные организмы, в том числе и трематоды, содержащие своеобразные пакеты генетических программ. Кроме того, существование В-хромосом в кариотипах трематод, для которых характерно малое количество групп сцепления генов, во-первых, увеличивает комбинативную изменчивость, во-вторых, изменяет общий пулл генов. Не исключено, что в дополнительных хромосомах у трематод имеется своеобразная форма повторяющихся ДНК последовательностей, которые участвуют в регуляции активности генома и взаимоотношений между партенитами и моллюсками.

Список литературы

- Александрова О. В., Подгорнова Г. П. Таксономический анализ *Pegosomum asperum* и *P. saginatum* (Trematoda: Echinostomatidae) // Паразитология. 1978. Т. 12, вып. 5. С. 413—417.
- Баршене Я. В. Методические рекомендации по цитогенетическим исследованиям различных видов рыб в их ареалах // Типовые методики исследования продуктивности видов рыб в пределах их ареалов. Ч. 4. Вильнюс: Мокслас, 1981. С. 86—95.
- Баршене Я. В., Киселене В. К. Особенности хромосомного аппарата эхиностоматат // Резюме 5-й Национальной конф. по паразитологии. Болгария, Варна, 1—3 октября 1987. С. 199—200.
- Белянина С. А. Современное состояние кариофондов хирономид в водоемах СССР // Эволюция, видообразование и систематика хирономид. Новосибирск, 1986. С. 45—49.

- Мутафова Т., Канев И. Върху кариотипа на эхиностом с белезите на *Echinostoma barbosai* Lie et Basch, 1966 (Trematoda: Echinostomatidae) намерен в България // Хелминтология. 1983. Т. 16. Р. 42—45.
- Мутафова Т., Канев И. Върху кариотипа на *Echinostoma revolutum* (Frölich, 1802) и *Echinostoma echinatum* (Zeder, 1803) (Trematoda: Echinostomatidae) // Хелминтология. 1986. Т. 22. Р. 37—41.
- Мутафова Т., Канев И., Ангелова Р. Върху кариотипа на *Hypoderaeum conoideum* (Blanch, 1782) Dietz, 1909 (Trematoda: Echinostomatidae) // Хелминтология. 1986. Т. 22. Р. 33—36.
- Орловская О. М., Леонов С. А. Трематоды птиц Чаунской низменности // Паразитологические организмы северо-востока Азии. Владивосток, 1975. С. 27—43.
- Пятквичюте Р. Б., Баршене Я. В. Сравнительно-кариологический анализ трех видов трематод рода *Notocotylus* // Паразитология. 1988. Т. 22, вып. 1. С. 21—28.
- Churchill H. M. Germ cell cycle of *Echinostoma revolutum* (Frölich, 1802) // J. Parasitol. 1950. Vol. 30. P. 15.
- Ciordia H. The chromosomes of *Notocotylus filamentis* Barker, 1915, a monostome from the muskrat (*Fiber zibethicus*) // Trans. Amer. micr. Soc. 1950. Vol. 69. P. 64—65.
- Jones R. N., Rees H. B-chromosomes. N. Y.: Acad. Press, 1982. 266 p.
- Levan A., Fredgo K., Sandberg A. Nomenclature for centromere position on chromosomes // Hereditas. 1964. Vol. 52. P. 201—220.
- Nur U., Brett B. L. H. Genotypes suppressing meiotic drive of a B chromosome in the mealybug *Pseudococcus obscurus* // Genetics. 1985. Vol. 110. P. 73—92.
- Terasaki K., Moriyama N., Tani S., Ishida K. Comparative studies on the karyotypes of *Echinostoma cinetorchis* and *E. hortense* (Echinostomatidae: Trematoda) // Jap. J. Parasitol. 1982. Vol. 31. P. 569—574.
- White M. J. D. Animal cytology and evolution, 3d edit. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. P. 961.

Институт зоологии и паразитологии АН ЛитССР,
г. Вильнюс;

Поступила 4.04.1988

Институт биологических проблем севера, АН СССР,
г. Магадан

KARYOLOGICAL INVESTIGATION OF TREMATODES OF THE FAMILIES NOTOCOTYLIDAE ECHINOSTOMATIDAE AND STRIGEIDAE OF NORTH-WEST CHUKOTKA

Ya. V. Barshene, R. B. Petkevichute, G. J. Stanevichute, O. M. Orlovskaya

SUMMARY

Parthenites of 6 investigated species of trematodes in diploid sets contain 20 chromosomes. The karyotype structure of *Notocotylus* sp. (the intermediate host — *Anisus acronicus*) is $2m+6sm+4st+8a$; *Echinoparyphium recurvatum* — $2sm-m+10st+8a$; *Cotylurus cornutus* — $2m+6st+2a-st+10a$; *Apatemon fuligulae* — $4m+8sm+4st+4a$; *Ichthyocotylurus pileatus* — $6m-8st-6a$; *I. erraticus* — $6m+6sm+8a$ (m — metacentric, sm — submetacentric, st — subtelocentric and a — acrocentric chromosomes). In chromosome sets prevail one-armed, actively reorganizing elements. In *Notocotylus* sp. a large metacentric B-chromosome and up to 9 small additional acrocentric B-chromosomes were found out. The B-chromosomes in karyotype of *A. fuligulae* were presented by small acrocentric elements. We suppose that the genetic material of additional chromosomes in karyotype of trematodes increases the combinative variability and evidently takes part in the regulation of genome activity and interrelations in the «parasite-host» systems.