

УДК 576.895.122 : 575.3

СРАВНИТЕЛЬНО-КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРЕХ ВИДОВ ТРЕМАТОД РОДА NOTOCOTYLUS

Р. Б. Пятквичюте, Я. В. Баршене

Установлено, что кариотипы эмбриональных клеток *Notocotylus ephemera*, *N. attenuatus* и *N. imbricatus* состоят из одинакового числа хромосом ($2n=20$), однако эти виды хорошо отличаются по структуре хромосомного аппарата. Наиболее обособленным в кариологическом отношении является *N. imbricatus*. Выявлено наличие двух кариотипических морф у *N. ephemera* ($2n=20$ и $2n=21$).

Кариологические исследования гельминтов начаты в конце прошлого века, однако до настоящего времени эта группа организмов является весьма слабо изученной. В литературе представлены данные о числе хромосом отдельных видов гельминтов и лишь некоторые работы содержат сведения о структуре кариотипа и сравнительном анализе кариотипов различных видов трематод.

Целью данной работы было выявление особенностей организации хромосомных комплексов трех видов нотокотилид, определение сходства кариотипов и возможных путей эволюции хромосомного аппарата трематод этих видов. У представителей рода *Notocotylus* было известно число хромосом лишь одного вида — *Notocotylus filamentis* (Ciordia, 1950), диплоидный набор хромосом американской популяции которого представлен 14 хромосомами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для цитогенетических исследований послужили моллюски трех видов — *Planorbarius corneus*, *Lymnaea palustris*, *Bithynia tentaculata*, естественно зараженные партенитами *Notocotylus ephemera* (Nitzsch, 1807), *N. attenuatus* (Rud., 1809) и *N. imbricatus* (Looss, 1893) соответственно. Моллюски собраны летом 1984—1985 гг. в разных озерах Вильнюсского и Тракайского р-нов и в водоеме-охладителе Литовской ГРЭС. Изучены препараты нотокотилид от 90 экз. хозяев, митотические пластинки содержались в препаратах от 34 особей моллюсков.¹

Блокирование митозов (на стадии метафазы) гельминтов и моллюсков осуществляли 0.2—0.05 %-ным раствором алкалоида колхицина, в расчете 1 мл раствора на 100 г. массы моллюска. После инъекции моллюсков помещали в воду, которую брали из мест их обитания. Мелких битиний выдерживали 15—20 ч в 0.05—0.001 %-ном растворе колхицина (вместо инъекции колхицина), приготовленном на воде из водоема, в котором обитают моллюски.

¹ Паразитологические исследования проведены сотрудницей нашего института В. К. Киселене, за что авторы выражают ей глубокую благодарность.

Для кариологического анализа брали печень моллюсков с содержащимися в ней трематодами и для гипотонии помещали на 40—45 мин в дистиллированную воду, которую при этом меняли трижды. Фиксацию проб осуществляли в фиксаторе Карнуа. Препараты готовили из свежего материала по модифицированной нами методике (Баршене, 1981).

Классификация хромосом дана по Левану с соавт. (Levan e. a., 1964); при кариометрическом анализе использовали несколько параметров, характеризующих хромосомные комплексы (Short, Grossman, 1981; Thiriot-Quievreux, 1984). Кариометрические данные основаны на измерении 15 метафазных пластинок *N. ephemera*, 4 метафазных пластинок *N. attenuatus* и 6 — *N. imbricatus*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диплоидные наборы всех трех исследованных видов состоят из 20 хромосом (рис. 1). Модальное число хромосом содержалось более чем в 90 % изученных клеток (табл. 1). Такая высокая степень цитогенетической стабильности указывает на давно устоявшиеся взаимоотношения в данных системах паразит—хозяин.

Кариотип *N. ephemera* состоит из 14 метацентрических и субметацентрических и 6 акроцентрических хромосом. Среди них 6 пар крупных хромосом и 4 пары более мелких (табл. 2). Хорошо выделяется первая пара самых крупных хромосом, значение центромерного индекса которых является промежуточным между субметацентрическим и метацентрическим типами. 2-я пара — субметацентрическая, 3—4-я пары хромосом почти одинаковой длины, но их можно отличить по центромерному индексу, так как короткое плечо 4-й пары длиннее; 5-я пара по морфологии занимает промежуточное положение между метацентрической и субметацентрической; 6-я — метацентрическая; 7-я — относится уже к группе мелких хромосом, тип ее строения — субметацентрический-метацентрический. Последние три пары мелких хромосом являются акроцентрическими.

При изучении хромосомных наборов *N. ephemera* отмечен факт, заслуживающий особого внимания: 19.3 % исследованных моллюсков были заражены партенитами, содержащими в своих клетках 21 хромосому (всего изучены препараты от 29 зараженных особей). Эти моллюски были собраны в водоемоохладителе Литовской ГРЭС и в оз. Олаука Тракайского р-на, расположенных недалеко друг от друга. Непарной является крупная метацентрическая хромо-

Т а б л и ц а 1

Диплоидное число хромосом в клетках *Notocotylus ephemera*, *N. attenuatus*, *N. imbricatus*

Диплоидное число хромосом	Вид гельминтов							
	<i>N. ephemera</i> 2n=20		<i>N. ephemera</i> 2n=21		<i>N. attenuatus</i>		<i>N. imbricatus</i>	
	число изучен- ных клеток	%	число	%	число	%	число	%
16	1	0.13						
17	1	0.13						
18	4	0.53			1	1.79	1	1.14
19	44	5.85			2	3.57		
20	691	91.89	14	9.93	51	91.06	85	96.59
21	8	1.07	127	90.07	1	1.79	2	2.27
37	1	0.13						
39	1	0.13						
40	1	0.13			1	1.79		
Всего изучено клеток	752		141		56		88	



Рис. 1. Хромосомные наборы нотокотилид.

a — кариотипы отдельных видов; *б* — кариотипические морфы вида *N. ephemera*: *A* — метафазная пластинка, *B* — кариотип кариоморфы $2n=20$; *Б* — метафазная пластинка, *Г* — кариотип кариоморфы $2n=21$. Стрелкой отмечена непарная 21-я хромосома.

Т а б л и ц а 2
Измерения и классификация хромосом *Notocotylus ephemera*

№ пар хромосом	Абсолютная длина, в мкм	Относительная длина, в %	Центромерный индекс	Классификация
1	5.02±0.17	17.42±0.21	37.23±0.50	см—м
2	3.85±0.15	13.31±0.20	26.21±0.62	см
3	3.55±0.13	12.28±0.26	19.59±0.71	ст
4	3.50±0.10	12.15±0.19	28.78±0.68	см
5	3.23±0.09	11.23±0.21	36.80±1.15	см—м
6	2.72±0.09	9.43±0.20	43.49±0.83	м
7	1.98±0.07	6.87±0.15	36.51±1.04	см—м
8	1.93±0.06	6.72±0.12		а
9	1.69±0.05	5.86±0.10		а
10	1.36±0.04	4.74±0.07		а

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: м — метацентрическая, см — субметацентрическая, ст — субтелоцентрическая, а — акроцентрическая хромосома; данных нет — измерения не проводились.

Т а б л и ц а 3
Измерения и классификация хромосом *Notocotylus attenuatus*

№ пар хромосом	Абсолютная длина, в мкм	Относительная длина, в %	Центромерный индекс	Классификация
1	4.05±0.30	16.85±0.78	37.34±0.80	см—м
2	3.32±0.14	13.87±0.27	26.72±1.18	см
3	3.17±0.14	13.19±0.24	28.68±2.47	см
4	2.86±0.23	11.87±0.24	33.85±0.99	см
5	2.50±0.18	11.42±0.07	39.69±1.60	м
6	2.41±0.14	10.02±0.38	44.18±1.61	м
7	1.66±0.14	6.94±0.66		а
8	1.36±0.12	5.68±0.29		а
9	1.29±0.12	5.38±0.39		а
10	1.16±0.14	4.78±0.32		а

Т а б л и ц а 4
Измерения и классификация хромосом *Notocotylus imbricatus*

№ пар хромосом	Абсолютная длина, в мкм	Относительная длина, в %	Центромерный индекс	Классификация
1	3.69±0.15	18.51±0.33	26.96±0.83	см
2	2.70±0.15	13.48±0.35	19.86±1.93	ст
3	2.48±0.05	13.10±0.35	32.01±1.89	см
4	2.12±0.07	10.66±0.29	40.14±1.21	м
5	1.99±0.08	9.97±0.16	7.62±1.00	а
6	1.58±0.10	7.92±0.38	7.42±1.31	а
7	1.47±0.07	7.38±0.17	7.05±0.87	а
8	1.31±0.03	6.57±0.17	29.63±1.58	см
9	1.28±0.05	6.46±0.25	30.31±2.42	см
10	1.19±0.05	5.96±0.24	27.41±2.22	см

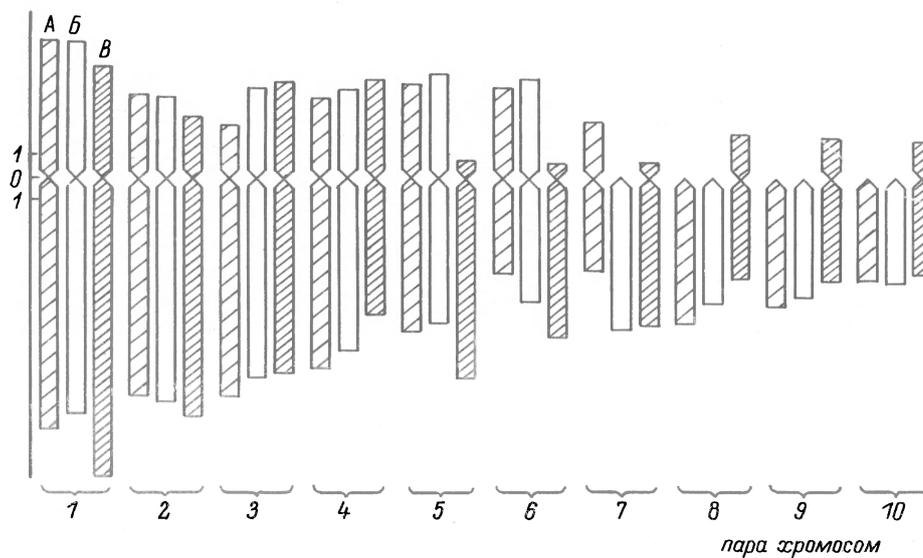


Рис. 2. Идиограммы хромосом *N. ephemera* (A), *N. attenuatus* (B) и *N. imbricatus* (B). Идиограммы построены по данным измерения центромерных индексов и относительных длин, представленных в табл. 2—4.

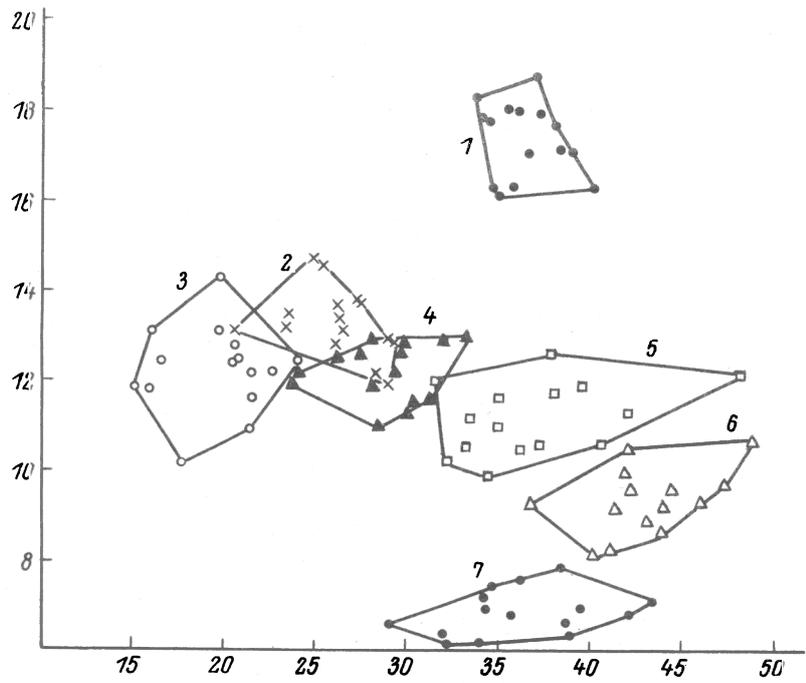


Рис. 3. Кариограмма 1—7 пар хромосом *N. ephemera*.
 По оси абсцисс — центромерный индекс, по оси ординат — относительная длина хромосом.

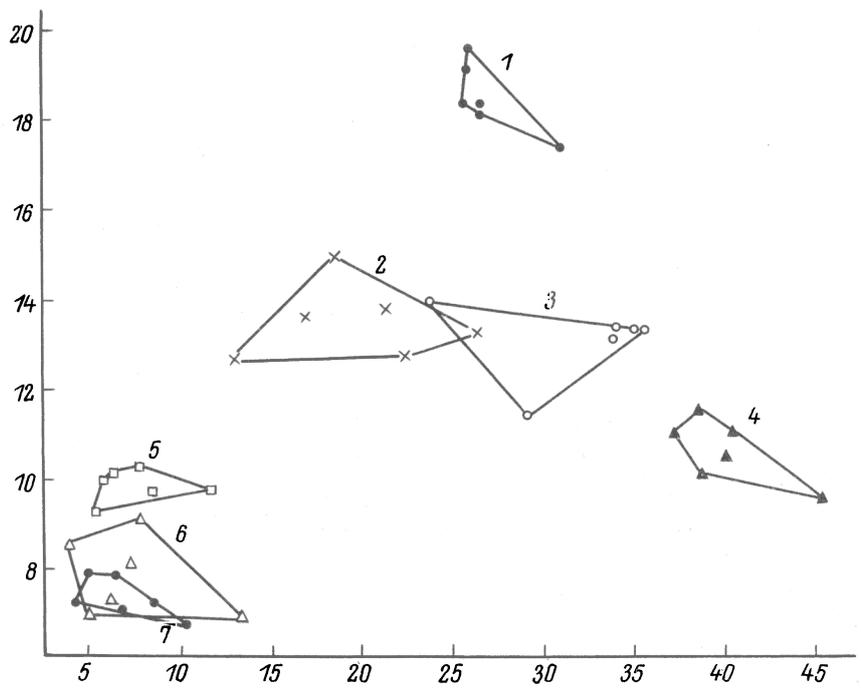


Рис. 4. Кариограмма 1—7 пар хромосом *N. imbricatus*.
 Обозначения те же, как и на рис. 3.

сома (центромерный индекс 44.63 ± 0.89), составляющая 10.72 ± 0.52 % длины гаплоидного набора (рис. 1). Все остальные хромосомы не отличаются от обычного 20-хромосомного набора. В препаратах от одной особи моллюска примерно половину клеток паразита составляли клетки с 20 хромосомами, а другую половину — с 21 хромосомой. Скорее всего этот моллюск был заражен двумя разными мирацидиями.

Хромосомный набор *N. attenuatus* содержит 12 метацентрических и субметацентрических и 8 акроцентрических хромосом. В целом кариотип *N. attenuatus* по длине хромосом и их морфологии похож на кариотип *N. ephemera*. Существенное различие в структуре кариотипов, позволяющее надежно отличить эти два вида, заключается в морфологии 7-й пары хромосом. У *N. attenuatus* эта пара является акроцентрической, между тем у *N. ephemera* она промежуточного субметацентрического-метацентрического типа (рис. 1; табл. 2, 3).

Хромосомы *N. imbricatus* мельче, чем у первых двух видов (табл. 4). Кариотип состоит из 14 двухплечих и 6 одноплечих хромосом. 1-я самая крупная пара является субметацентрической. 2-я и 3-я пары отличаются по центромерному индексу, который у 3-й пары значительно выше. 4-я пара — метацентрическая; 5—7-я пары — акроцентрические, кроме того, 6—7-я пары трудно отличимы и по длине хромосом. Последние три самые мелкие пары — субметацентрические.

Кариотип *N. imbricatus* наиболее ярко отличается от двух выше описанных кариотипов и по длине хромосом, и по их морфологии. Для более показательного сравнения хромосомных пар нотокотилид были построены идиограммы по данным относительной длины и центромерного индекса хромосом (рис. 2). Кариологические различия в строении первых 7 пар хромосом *N. ephemera* и *N. imbricatus* хорошо видны из кариограммных полигонов (рис. 3, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Изученные нами виды нотокотилид друг от друга существенно отличаются по структуре кариотипа и морфологии отдельных хромосом. Самая значительная кариологическая дистанция отмечена между *N. imbricatus* и двумя другими видами. Весьма схожими по организации хромосомного материала оказались *N. ephemera* и *N. attenuatus*.

Считается, что примитивные кариотипы состоят из акроцентрических хромосом небольшого размера (White, 1973). Следовательно, более прогрессивным кариотипом среди изученных нотокотилид обладают *N. ephemera* и *N. attenuatus*. Хромосомный комплекс *N. imbricatus* можно считать относительно примитивным. В процессах видообразования и эволюции нотокотилид дифференциация хромосомных комплексов происходила за счет структурных перестроек хромосом — перицентрических и парацентрических инверсий, возможно, имели место и реципрокные транслокации, дубликации и другие внутригеномные изменения. Изменения размеров элементов хромосомных комплексов возникли, по-видимому, за счет дубликаций и транслокаций определенных единиц геномов *N. ephemera* и *N. attenuatus*. Перицентрические инверсии несомненно играли главную роль в перестройке геномов этих видов, так как в основном отмечается изменение мест локализации центромер. Перицентрические инверсии обычно затрагивают небольшой участок групп сцепления генов, тем самым незначительно нарушают процессы кроссинговера при половом размножении нотокотилид. Партениты трематод размножаются неполовым способом, и фиксация перестроек геномов осуществляется с большей вероятностью, чем у полностью бисексуальных форм.

Исследованных три вида нотокотилид достоверно отличаются и по данным электрофоретического исследования общего белка (Vassilev e. a., 1975). Наи-

большие различия отмечены в белковом спектре вида *N. imbricatus*. Таким образом, реорганизация хромосомного аппарата, безусловно, затронула гены, кодирующие белковые системы гельминтов.

Все три вида нотокотилид близки по своей биологии и экологии. Однако изменения их кариотипов и фиксация хромосомных перестроек, по-видимому, в большей мере были обусловлены коэволюционными взаимоотношениями с промежуточными хозяевами, так как взаимоотношения в системах трематоды—моллюски являются более древними, чем связь трематод с дефинитивными хозяевами, и носит филогенетический характер (Odening, 1964; Гинецинская, 1968; Naas, 1984). Онтогенетическое развитие партенит *N. ephemera* и *N. attenuatus* происходит в организме филогенетически родственных видов хозяев, принадлежащих к подклассу Pulmonata. Партеногенетическая стадия *N. imbricatus* паразитирует у брюхоногих моллюсков подкласса Pectinobranchia, и в коэволюционных процессах преобразования геномов возник весьма обособленный набор хромосомных элементов.

Особого внимания заслуживает феномен кариотипических морф у *N. ephemera* ($2n=20$ и $2n=21$). Дополнительная 21-я хромосома составляет большую долю генома — 10.72 % длины гаплоидного набора. По поводу данной хромосомы можно высказать следующие предположения. Во-первых, метацентрическая хромосома такого рода могла возникнуть в результате трисомии самых крупных хромосом набора и последующей делеции сегмента длинного плеча. Формирование 21-й хромосомы возможно и за счет Робертсоновской транслокации 8—9-й пар. Во-вторых, не исключена возможность появления такой хромосомы в результате гибридизации *N. ephemera* и другого близкородственного вида нотокотилид. Однако самым вероятным является то, что 21-я хромосома набора представляет собой В-хромосому, так как она более интенсивно окрашивается и, очевидно, содержит более плотно упакованные хромонемы ДНК. Морфы с 21 хромосомой были найдены в наиболее загрязненных зонах. Не исключено, что в измененных экологических условиях для успешного паразитирования *N. ephemera* нужны изменения в общем пуле генов. В этих же биотопах отмечен и наиболее высокий уровень нарушений хромосомного аппарата моллюсков.

Л и т е р а т у р а

- Баршене Я. В. Методические рекомендации по цитогенетическим исследованиям различных видов рыб в их ареалах. — В кн.: Типовые методики исследования продуктивности видов рыб в пределах их ареалов. Ч. 4. Вильнюс, 1981, с. 86—95.
- Гинецинская Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. Л., Наука, 1968. 411 с.
- 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.
- Naas W. Adaptations in the reproduction of digenetic trematodes to the snail intermediate host. — Adv. Invertebrate Reprod. 3. Amsterdam e. a., 1984, p. 279—290.
- Levan A., Fredgo K., Sandberg A. Nomenclature for centromere position on chromosomes. — Hereditas, 1964, vol. 52, p. 201—220.
- Odening K. Zur Rolle der Mollusken bei Artbildung und Phylogenese der Trematoden. — Angew. Parasitol., 1964, Jg. 5, S. 71—75.
- Short R. B., Grossman A. I. Conventional Giemsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. — J. Parasitol., 1981, vol. 67, p. 661—671.
- Thiriot-Quievreux C. Chromosome analysis of three species of *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). — Marine Biol. Let., 1984, vol. 72, p. 265—273.
- Vassilev I., Komandarev S., Mihov L. Comparative electroforetic studies of certain species of the *Notocotylus* genus. — Докл. Болг. АН, 1975, vol. 28, p. 1543—1545.
- White M. J. D. Animal cytology and evolution, 3rd edn. Cambridge Univer. Press, London, 1973. 961 p.

Институт зоологии и паразитологии
АН ЛитССР, Вильнюс

Поступила 17.03.1986

THE COMPARATIVE KARYOLOGICAL ANALYSIS OF THREE SPECIES OF TREMATODES
OF THE GENUS NOTOCOTYLUS

R. B. Petkevičiute, J. V. Barsiene

S U M M A R Y

The comparative analysis of karyotype of *Notocotylus ephemera*, *N. attenuatus* and *N. imbricatus* was carried out. The karyotypes of the embryonic cells of the above species consist of 20 chromosomes: most of them are biarmed. Studied species exhibit distinct differences in chromosome morphology. The greatest karyological distance between *N. imbricatus* and two other species was revealed. During the processes of speciation and evolution of *Notocotylus* species the reorganisation of the chromosomal material was going on, in general, by means of pericentric inversions duplications and deletions. Two karyotypical morphs of *N. ephemera* ($2n=20$ and $2n=21$) were detected.
