

УДК 595.122

**КЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ЦЕРКАРИЙ
HIMASTHLA ELONGATA (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE)**

© И. А. Левакин,^{1,2} Е. А. Лосев,¹ Я. В. Завирский,³
К. В. Галактионов^{1,2}

¹ Зоологический институт РАН
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034
E-mail: levakin2@gmail.com

² Санкт-Петербургский государственный университет,
биолого-почвенный факультет, кафедра зоологии беспозвоночных
Университетская наб., 7/9, С.-Петербург, 199034

³ Псковский государственный педагогический университет им. С. М. Кирова
пл. Ленина, 2, Псков, 180760
Поступила 18.04.2013

У церкарий *Himasthla elongata* исследована вариабельность показателя LT₅₀ (время гибели половины церкарий в экспериментальном сосуде) среди личинок, эмитированных из одной особи (внутриклоновая изменчивость) и разных особей (межклоновая изменчивость) моллюска-хозяина (морская литоральная гастропода *Littorina littorea*). Показан существенный размах межклоновой изменчивости по исследуемому параметру. Среди клонов церкарий выявлены 2 группы, различающиеся по дисперсии средних значений LT₅₀. Высказано предположение о генетической обусловленности выявленной гетерогенности.

Ключевые слова: трематоды, церкария, клон, время жизни, полиморфизм, изменчивость, адаптация, жизненный цикл.

В сложном жизненном цикле трематод основная функциональная задача фазы церкарии (личинки мариты) состоит в расселении и обеспечении заражения последующего хозяина, второго промежуточного или окончательного (Галактионов, Добровольский, 1998). Церкарии производятся партенитами (спороцистами или редиями), паразитирующими в первом промежуточном хозяине — моллюске. Формирование группировки партенит в моллюске-хозяине начинается с момента проникновения в них мирацидия. Поэтому если не происходит повторных заражений моллюска другими мирацидиями того же вида, то все партениты, паразитирующие в данном моллюске-хозяине, а соответственно и все производимые ими церкарии, несут один генотип. Таким образом, они составляют один клон, все входящие в состав которого особи должны обладать сходным фенотипом.

Церкарии — эндотрофные личинки и срок их жизни ограничен запасом питательных веществ (в первую очередь гликогена), аккумулированных в их тканях (Palm, 1962; Cheng, 1963; Гинецинская, 1968). Очевидно, что время жизни, наряду с поведенческими особенностями церкарий, является одним из важнейших свойств личинки, определяющим вероятность ее встречи с потенциальным хозяином, — чем дольше проживет церкария, тем выше вероятность такой встречи. Как правило, продолжительность жизни церкарий невелика и составляет несколько часов. Однако этот параметр сильно варьирует у личинок разных видов и определяется их морфобиологическими особенностями и реализуемой стратегией заражения последующего в жизненном цикле хозяина (Галактионов, Добровольский, 1998; Прокофьев, Галактионов, 2009). Так церкарии группы *Xiphidiocercaria*, использующие, согласно классификации Прокофьева и Галактионова (2009), стратегию активного поиска хозяина, находятся в непрерывном движении и живут всего 7—9 ч (Гинецинская, 1968). В то же время сроки жизни личинок, для которых характерна стратегия активного или пассивного ожидания, могут достигать нескольких суток. Например, церкарии рода *Trichobilharzia*, которые прикрепляются к поверхностной пленке воды и в неподвижности поджидают хозяина (водоплавающих птиц), могут жить до 6 сут (Гинецинская 1968).

Долгое время в паразитологической литературе бытовало мнение, что все церкарии данного вида трематод обладают сходным набором морфобиологических характеристик, включая морфометрические параметры, поведенческие реакции, продолжительность жизни и инвазионную способность. Однако в ходе изучения биологии церкарий трематод, циркулирующих в экосистемах северных морей, было показано, что среди церкарий одного вида примерно 5—30 % особей демонстрируют нетипичное для данного вида поведение (Прокофьев, 1997, 2001, 2002, 2003; Галактионов, Добровольский, 1998). Такие особи получили название «уклонисты». Дальнейшие исследования показали, что по характеру проявления ряда фенотипических признаков существуют различия как между церкариями, выделенными из разных особей зараженных моллюсков (межклональная изменчивость), так и из одной особи (внутриклональная изменчивость). Работы подобной направленности пока что выполнены только на двух модельных видах — *Maritrema novaezealandensis* (Koehler et al., 2011; Koehler, Poulin, 2012) и *Himasthla elongata* (Прокофьев и др., 2011; Levakin et al., 2013). В том числе на исследованных нами личинках *H. elongata* показано значительное межклональное и менее выраженное внутриклональное варьирование по проявлению фото- и геореакций (Прокофьев и др., 2011) и по инвазионной способности церкарий (Levakin et al., 2013). В настоящем исследовании тестируется варьирование в продолжительности жизни церкарий того же модельного вида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Источником церкарий *H. elongata* послужили особи *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758) (Prosobranchia: Littorinidae). Литорин собирали на морской литорали в июле—августе 2010 г. в окрестностях Беломорской био-

логической станции (ББС) Зоологического института РАН (губа Чупа Кандалакшского залива Белого моря). Зараженных редиями *H. elongata* литорин выявляли по эмиссии церкарий. На раковины зараженных этим паразитом моллюсков наносили индивидуальные метки. Церкарий *H. elongata*, полученных из одной инвазированной особи *L. littorea*, считали потомками одного мирацидия (одномирацидийное заражение) и рассматривали как принадлежащих одному клону (клон церкарий при дальнейшем изложении). Это допущение обосновывается в предыдущей статье (Прокофьев и др., 2011), в которой также подробно описана методика получения церкарий. Всего в эксперименте было использовано 29 клонов *H. elongata*.

Церкарий каждого клона переносили в 3 чистые емкости (10 мл), заполненные свежей фильтрованной морской водой с температурой 18 °С. В каждую емкость помещали 70—200 церкарий. Емкости с церкариями затем содержали в термостатированном (18 °С) помещении при освещенности 10—16 тыс. Лк. Через 9, 12, 17, 20, 23, 26, 29, 32 и 35 ч после помещения церкарий в эти емкости подсчитывали количество церкарий, неподвижно лежащих на дне. Неподвижных церкарий считали погибшими и удаляли при подсчете.

Для оценки продолжительности жизни церкарий использовали время гибели половины церкарий (LT_{50} , «время полужизни»). Значение LT_{50} определяли для каждой емкости с церкариями линейной интерполяцией интервала, содержащего 50 % погибших церкарий

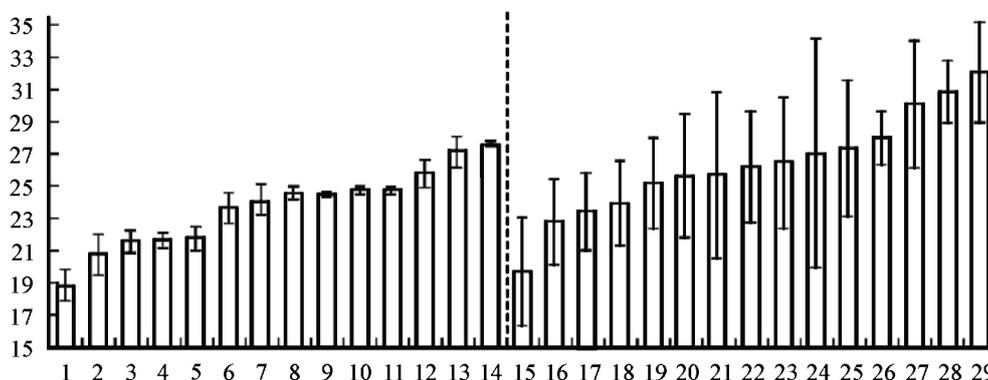
$$LT_{50} = t_i + \frac{(N/2 - n_i)(t_{i+1} - t_i)}{(n_{i+1} - n_i)}$$

где N — общее число церкарий, n_i и n_{i+1} — суммарное количество погибших церкарий к моменту t_i и t_{i+1} соответственно, причем $n_i < \frac{N}{2} < n_{i+1}$, т. е. момент времени, к которому погибла половина церкарий, находится между t_i и t_{i+1} .

Статистическую обработку данных выполняли в соответствии со стандартными рекомендациями (Лакин, 1990, Животовский, 1991). Достоверность межклоновой изменчивости оценивали при помощи медианного теста и критерия Крускала—Уоллиса, а также однофакторного дисперсионного анализа. При проведении дисперсионного анализа условие гомогенности групповых дисперсий проверяли критериями Бартлетта и Кокрана, а условие отсутствия связи между средними и дисперсиями — оценивая достоверность корреляции Пирсона между ними. Силу влияния фактора (вклад факторной дисперсии в варьирование признака) оценивали по Плохинскому. Достоверность межгрупповых различий средних (Post-hoc) оценивали по критерию Тьюки (Tukey's HSD-test). Все доверительные интервалы вычисляли для 95 % уровня значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатель LT_{50} церкарий *H. elongata*, зарегистрированный в эксперименте, варьировал от 18.4 до 33.2 ч, составляя в среднем 25.1 ± 0.7 ч. Церкарии разных клонов *H. elongata* значительно отличались по LT_{50} ($P << 0.01$). Среднее «время полужизни» церкарий разных клонов *H. elongata* варьировало от 18.8 ± 1 до 31.7 ± 3.3 ч. Разные клоны *H. elongata* также отличались по внутриклоновой дисперсии «времени полужизни» ($P << 0.01$). Исследованные 29 клонов церкарий *H. elongata* были сгруппированы по значению внутриклоновой дисперсии LT_{50} в две группы (см. рисунок): группа низкой внутриклоновой дисперсии (ГНВД) — 14 клонов и группа высокой внутриклоновой дисперсии (ГВВД) — 15 клонов. Внутри каждой из этих двух групп внутриклоновые дисперсии LT_{50} были гомогенны ($P > 0.05$) и не обнаруживали связи со средними значениями LT_{50} клона ($P > 0.05$). Дисперсионный анализ каждой из выделенных групп клонов демонстрировал определяющее ($P << 0.01$) влияние межклоновой изменчивости на «время полужизни» церкарий *H. elongata*: вклад межклоновых различий превышал 84.7 % ($P << 0.01$) для клонов ГВВД и 99 % ($P << 0.01$) для клонов ГНВД. Низкая внутриклоновая дисперсия приводила к достоверным различиям между большинством клонов ГНВД (см. рисунок). Недостоверны были только различия между клонами 2 и 3, с 3 по 5, 6 и 7, с 7 по 11, а также между 13 и 14 (см. рисунок). Во всех остальных комбинациях различия по среднему «времени полужизни» церкарий между клонами *H. elongata* с низкой внутриклоновой изменчивостью LT_{50} были значимы ($P < 0.05$). Высокая внутриклоновая дисперсия приводила к снижению числа достоверных межклоновых различий по «времени полужизни» церкарий (Рисунок). Значимые различия по среднему «времени полужизни» церкарий *H. elongata* в ГВВД отсутствовали между клонами с 15 по 18, с 16 по 25, с 17 по 26, с 20 по 27, с 22 по 28 и с 25 по 29 (см. рисунок). Различия по исследуемому параметру в оставшихся комбинациях клонов были достоверны ($P < 0.05$).



Среднее «время полужизни» (LT_{50}) церкарий 29 изученных клонов *Himasthla elongata*. Пунктирная линия разделяет группы клонов с низкой (ГНВД) (слева) и высокой (ГВВД) (справа) внутриклоновой изменчивостью. Доверительные интервалы приведены для 95 % уровня значимости. Пояснения в тексте. По оси абсцисс — номера клонов, по оси ординат — среднее LT_{50} (ч) церкарий.

Average «half-longevity» (LT_{50}) of cercariae *Himasthla elongata* in 29 clones studied.

LT₅₀ церкарий у клонов ГВВД достоверно превышало значение этого параметра у клонов ГНВД ($P < 0.01$, t-критерий, медианный тест). Среднее «время полужизни» у клонов ГВВД составляло 26.4 ± 1 ч, медианное — 26.1 (24.9 — 27.5) ч, а у клонов ГНВД — 23.7 ± 0.8 и 24.5 (21.9 — 24.7) ч соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Зарегистрированное в наших экспериментах среднее значение LT₅₀ церкарий *H. elongata* (25.1 ± 0.7 ч) хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными по продолжительности жизни личинок этого вида (Прокофьев, 2006). Вместе с тем обнаруженные межклоновые различия в LT₅₀ церкарий оказались весьма велики (ср., например, клоны 1 и 29 на рисунке). Ранее было показано, что церкарии различных клонов *H. elongata* различаются и по другим существенным для заражения второго промежуточного хозяина характеристикам, таким как ориентировочные реакции (Прокофьев и др., 2011) и инвазионная способность (Levakin et al, 2013). Таким образом, состав группировки церкарий (локальной гемипопуляции), выделенных из зараженных моллюсков в определенном участке водоема, оказывается гетерогенным по характеру проявления черт биологии разными особями. Такая гетерогенность, по-видимому, способствует заражению церкариями второго промежуточного хозяина в изменчивой внешней среде. Особенно в литоральной зоне северных морей, где реализуется жизненный цикл *H. elongata*.

Представляет интерес и обнаруженный нами значительный разброс клонов церкарий *H. elongata* по внутриклоновой дисперсии «времени полужизни» (см. рисунок). Для объяснения значительного разброса можно было бы предположить, что группы церкарий с высокой дисперсией LT₅₀ (ГВВД) представлены генетически разнородными потомками нескольких разных мирацидиев. Однако высокую дисперсию обнаруживает примерно половина изученных клонов, что при низкой экстенсивности инвазии партенитами *H. elongata* в районе сбора материала (менее 5 %) делает крайне маловероятным многомирацидийное заражение (т. е. инвазирование одного моллюска несколькими мирацидиями с последующим развитием из каждого из них партенит, производящих церкарий) половины случайно отобранных зараженных литорин. Кроме того, генетический анализ методом AFLP (Amplification Fragments Length Polymorphism) показал, что в популяции литорин, откуда были взяты моллюски для наших экспериментов, уровень AFLP изменчивости церкарий из одной зараженной редиями *H. elongata* литорины (внутриклоновая изменчивость) существенно ниже, чем между церкариями, выделенными из разных особей хозяина (межклоновая изменчивость) (Galaktionov et al., submitted). Это также свидетельствует в пользу одномирацидийного заражения, по крайней мере большинства исследованных литорин.

Полученные в ходе настоящего исследования данные, как и накопившиеся в последние годы в литературе материалы по внутриклоновой фенотипической изменчивости церкарий (Прокофьев и др., 2011; Koehler et al., 2011; Koehler, Poulin, 2012; Levakin et al., 2013), заставляют в определенной степени пересмотреть представления об эндогенной агломерации

партенит трематод в первом промежуточном хозяине, как о простом тиражировании копий генотипа мирацидия (Галактионов, Добровольский, 1998). Использование методов ДНК фингерпринтинга ряда видов трематод, включая *H. elongata*, позволило выявить, что как дочерние партениты, так и церкарии, принадлежащие одному клону, не являются генетически эквивалентными (Grevelding 1999; Халтурин и др., 2000; Bayne, Grevelding, 2003; Семенова и др., 2005, 2007; Galaktionov et al., 2010, submitted). Механизм появления этих генетических различий связывают с митотическими рекомбинациями при партеногенетическом размножении (Bayne, Grevelding, 2003; Galaktionov et al., submitted). Пока что не выявлена еще связь обнаруживаемых внутри- и межклоновых фенотипических различий в чертах биологии церкарий с генетической изменчивостью того же уровня, хотя наличие такой связи представляется весьма вероятным (Прокофьев и др., 2011; Levakin et al., 2013). По-видимому, уровень митотических рекомбинаций при формировании разных клонов церкарий различен, о чем косвенно свидетельствует наличие клонов церкарий *H. elongata* с высокой и низкой дисперсией показателя LT_{50} .

В настоящее время мы затрудняемся трактовать выявленные различия в продолжительности жизни клонов с высокой и низкой дисперсией LT_{50} . Для объяснения этого феномена требуются дальнейшие исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 13-04-00875) и СПбГУ (№ 1.37.80.2011).

Список литературы

- Галактионов К. В., Добровольский А. А. 1998. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. СПб.: Наука. 404 с.
- Гинецинская Т. А. 1968. Трематоде — их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука. 411 с.
- Животовский Л. А. 1991. Популяционная биометрия. М.: Наука. 269 с.
- Лакин Г. Ф. 1990. Биометрия. М.: Высшая школа. 352 с.
- Прокофьев В. В. 1997. Реакции на свет церкарий морских литоральных трематод *Cryptocotyle* sp. (Heterophyidae) и *Maritrema subdolum* (Microphallidae). Зоол. журн. 76 (3): 275—280.
- Прокофьев В. В. 2001. Реакции на свет церкарий морской литоральной трематоды *Renicola thaidus* (Trematoda; Rencolidae). Паразитология. 35 (3): 429—435.
- Прокофьев В. В. 2002. Особенности вертикальной дисперсии в толще воды церкарий морской литоральной трематоды *Renicola thaidus* (Trematoda: Rencolidae). Паразитология. 36 (4): 316—323.
- Прокофьев В. В. 2003. Характер вертикального распределения в толще воды церкарий трематод *Cryptocotyle concavum* (Heterophyidae) и *Maritrema subdolum* (Microphallidae). Паразитология. 37 (3): 207—215.
- Прокофьев В. В. 2006. Стратегии заражения животных—хозяев церкариями трематод: опыт анализа в экосистемах побережья морей и озер северо-запада России: дис. д-ра биол. наук. СПб.: Зоол. ин-т РАН. 545 с.
- Прокофьев В. В., Галактионов К. В. 2009. Стратегии поискового поведения церкарий трематод. Тр. Зоол. ин-та РАН. 313 (3): 308—318.

- Прокофьев В. В., Левакин И. А., Лосев Е. А., Завирский Я. В., Галактионов К. В. 2011. Клональная изменчивость в проявлении гео- и фотореакций у церкарий *Himasthla elongata* (Trematoda: Echinostomatidae). Паразитология. 45 (5): 345—357.
- Семенова С. К., Хрисанфова Г. Г., Филиппова Е. К., Беэр С. А., Воронин М. В., Рысков А. П. 2005. Индивидуальная и популяционная изменчивость церкарий шистосоматид группы *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda, Schistosomatidae), выявляемая с помощью полимеразной цепной реакции. Генетика. 41 (1): 17—22.
- Семенова С. К., Хрисанфова Г. Г., Корсуненко А. В., Воронин М. В., Беэр С. А., Водяницкая С. В., Сербина Е. А., Юрлова Н. П., Рысков А. П. 2007. Мультилокусная изменчивость партеногенетического потомства — церкарий трематод разных видов (класс Trematoda). Докл. РАН. 414 (4): 570—573.
- Халтурин К. В., Михайлова Н. А., Гранович А. И. 2000. Генетическая неоднородность природных популяций партенит *Microphallus piriformes* и *M. pygmaeus* (Trematoda: Microphallidae). Паразитология. 34 (6): 486—500.
- Ваупе С. J., Grevelding C. G. 2003. Cloning of *Schistosoma mansoni* sporocysts *in vitro* and detection of genetic heterogeneity among individuals within clones. Journ. of Parasitol. 89 (5): 1056—1060.
- Cheng T. C. 1963. Biochemical requirements of larval trematodes. Annales of the New York Academy of Sciences. 113: 289—321.
- Galaktionov N. K., Solovieva A. I., Fedorov A. V., Podgornaya O. I. 2010. DNA transposon marker involvement in *Himasthla elongata* clonal variation. In: 14th Evolutionary Biology Meeting in Marseille. September 21—24, Conference Abstract Book: 24—25.
- Galaktionov N. K., Fedorov A. V., Galaktionov K. V., Podgornaya O. I. Analysis of inter- and intracolonial genomic diversity of *Himasthla elongata* (Trematoda; Echinostomatidae) cercariae by AFLP. Parasitology Research, submitted.
- Grevelding C. G. 1999. Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology. 101: 207—216.
- Koehler A. V., Poulin R. 2012. Clone-specific immune reactions in a trematode-crustacean system. Parasitology. 139: 128—136.
- Koehler A. V., Springer Y. P., Keeney D. B., Poulin R. 2011. Intra- and interclonal phenotypic and genetic variability of the trematode *Maritrema novaezealandensis*. Biological Journal of the Linnean Society. 103: 106—116.
- Levakin I. A., Losev E. A., Nikolaev K. E., Galaktionov K. V. 2013. *In vitro* encystment of *Himasthla elongata* cercariae (Digenea, Echinostomatidae) in the hemolymph of blue mussels *Mytilus edulis* as a tool for assessing cercarial infectivity and molluscan susceptibility. Journ. of Helminthol. 87: 180—188.
- Palm V. 1962. Glicogen und Fettstoffwechsel bei *Cercaria limnaeae ovata*. Zeitschrift für Parasitenkunde. 22: 261—266.

CLONAL VARIABILITY IN LONGEVITY OF THE CERCARIAE OF HIMASTHLA ELONGATA (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE)

I. A. Levakin, E. V. Losev, Ya. V. Zavrisky, K. V. Galaktionov

Key words: trematode, cercaria, clone, longevity, polymorphism, variability, adaptation, life cycle

SUMMARY

The study was carried out on *Himasthla elongata* cercariae shed by infected *Littorina littorea* snails. The infected periwinkles were collected from the settlement with the

low prevalence of *H. elongata*. As shown earlier with the use of AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) method, rediae groups in all the infected periwinkles of this settlement arise from the infection of a mollusc with a single miracidium. Therefore, the cercariae shed by an infected mollusc have the same genotype or, in other words, represent a clone. The LT_{50} (the time during which 50 % of cercariae perish in the experimental dish) were measured experimentally for cercariae *Himasthla elongata* belong to different clones. The investigated parameter demonstrated a high level of interclonal variability. Two groups of cercarial clones were identified; one of them was characterized by the high level of intraclonal variability in LT_{50} and the second, by the low one. It is assumed that the observed heterogeneity may be stipulated by different degrees of mitotic recombinations during formation of different cercarial clones.
