

УДК 574.224:594.381

РОЛЬ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗМНОЖЕНИЯ *LYMNAEA STAGNALIS* В СОХРАНЕНИИ ОЧАГОВ ЦЕРКАРИОЗА

© 2011 С.В. Ризевский¹, О.А. Бодилова², А.П. Голубев², В.П. Курченко¹

¹Белорусский государственный университет, г. Минск

²Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, г. Минск

Поступила 15.07.2011

С помощью метода полимеразной цепной реакции выявлены молекулярно-генетические особенности моллюсков *Lymnaea stagnalis*, размножающихся перекрестным оплодотворением и самооплодотворением в лабораторных условиях. Показано, что среди особей природной популяции самооплодотворенные моллюски более чувствительны к инвазии трематодами.

Ключевые слова: *Lymnaea stagnalis*, самооплодотворение, трематоды, церкариоз.

Санаторно-курортная зона Национального парка «Нарочанский» является основной здравницей Республики Беларусь. Здесь ежегодно отдыхают более 80 000 жителей республики и иностранных туристов. Центром рекреационного региона является озеро Нарочь – самый крупный и один из живописнейших водоемов Беларуси. Фауна озера Нарочь характеризуется наличием нескольких десятков видов плоских червей класса трематоды. Представители семейств Echinostomatidae, Notocotylidae, Plagiorchiidae, Diplostomidae, Strigeidae и Schistosomatidae являются паразитами водоплавающих птиц, рыб, моллюсков и членистоногих [1]. В результате антропогенной нагрузки произошло нарушение экологического равновесия в экосистеме водоема, что привело к увеличению численности окончательных и промежуточных хозяев трематод, в том числе и семейства Schistosomatidae – возбудителей церкариоза. Данное заболевание вызывается внедрением в кожу человека водных личинок (церкарий) трематод родов *Trichobilharzia* и *Bilharziella* [2, 3]. Существующий в регионе очаг церкариоза представляет собой экономическую, социальную и медицинскую проблему и требует скорейшей ликвидации.

Принимая во внимание специфику биологии шистосоматид, применяемые в мире методы борьбы с церкариозом направлены на уничтожение отдельных звеньев жизненного цикла паразита. На практике наиболее апробирован и широко применяется сбор и уничтожение промежуточных хозяев трематод – легочных моллюсков [4]. Считается, что снижение численности популяции промежуточного хозяина приведет к нормализации паразитарной обстановки на водоеме и ликвидации очага церкариоза. Однако долговременная эффективность подобных мероприятий вызывает обоснованные сомнения по причине наличия у легочных моллюсков альтернативных способов размножения перекрестного оплодотворения (ПО) и самооплодотворения (СО). Поэтому даже немногие оставшиеся после отлова особи, размножаясь посред-

ством самооплодотворения, способны быстро восстановить численность популяции. Более того, в ряде работ показано влияние гомозиготизации моллюсков на их инвазированность [5-7]. Однако воздействие продолжительного самооплодотворения в течение нескольких последовательных поколений на чувствительность к инвазии трематодами не изучено.

Целью работы являлось выяснение влияния способа оплодотворения моллюсков на их восприимчивость к инвазии трематодами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В ходе работы исследовались моллюски *L. stagnalis* из лабораторных линий и из популяции озера Нарочь. Лабораторные моллюски происходили от особей из популяции оз. Персток (Гомельская обл.). Часть лабораторных моллюсков содержалась группами, где прудовики размножались посредством перекрестного оплодотворения. Моллюски из второй части содержались поодиночке и размножались самооплодотворением в течении 8 последующих поколений. Методика получения потомства от ПО и разных поколений от СО описана ранее [8].

Моллюски, собранные на озере Нарочь, были разделены на 2 группы: зараженные церкариями трематод семейств Echinostomatidae, Diplostomidae, Strigeidae и Schistosomatidae и незараженные. О заражении судили по наличию в гепатопанкреасе моллюска личиночных стадий трематод (спороцист, редий и церкарий).

Выделение ДНК ДНК выделяли из фрагмента мышечной ткани ноги моллюска методом фенольной экстракции. Для этого фрагмент ноги размером около 1 мм² гомогенизировали в пробирке эппендорф, лизировали буфером 50мМ Трис-НСl рН 7,4; 100мМ EDTA; 100мМ NaCl; 1% SDS; 100 мкг/мл протеиназы К. Белки отделяли фенолом. ДНК осаждали этанолом и ресуспендировали в ТЕ буфере.

Полимеразная цепная реакция. Для исследования церкарий нами был применен RAPD-ПЦР с праймерами OpB-01 (5'-GTTTCGCTCC-3'), OpE-06 (5'-AAGACCCCTC-3'), OpF-05 (5'-CCGAATCC-3'). ПЦР проводили в смеси, объемом 20 мкл. Смесь содержала (указаны конечные концентрации в смеси): 180 мкМ dNTP, 750 мкМ праймера, 3,0 мМ MgCl₂, 1x Taq Buffer (10мМ Tris-HCl, 50мМ KCl, 0,8% Nonidet P40), 1 ед. Taq-polimerase, 2 мкл р-ра ДНК. ПЦР про-

Ризевский Станислав Викторович, e-mail: rizevsky@gmail.com; Бодилова Ольга Александровна, e-mail: _olga_iseu@tut.by; Голубев Александр Петрович, докт. биол. наук, проф., e-mail: algiv@rambler.ru; Курченко Владимир Петрович, канд. биол. наук, e-mail: kurchenko@tut.by

водили в режиме: 94°C 4 мин, 40 циклов (94°C 1 мин, 38°C 1 мин, 72°C 2 мин).

Полученные в результате ПЦР продукты разделяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. В качестве стандарта масс использовали 1Kbp DNA Ladder (Fermentas). Гель окрашивали бромистым этидием. Визуализацию результатов проводили на геле-сканере VDS-CL (Amersham Biosciences). Размер и относительное содержание ампликонов определяли с помощью программы FragmeNT Analisis Aplicacion v 1.1a (Molecular Dynamics).

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных использовали пакет Statistika 7.0 (StatSoft Inc). Для определения различий между двумя выборками пользовались U-тестом Манна – Уитни. Для определения характера распределения данных применяли W-тест Шапиро-Уилка. В работе представлены данные, полученные в результате проведения трех независимых измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы исследованы 4 группы моллюсков: лабораторные особи, размножающиеся самооплодотворением в течение нескольких (четырёх и более) поколений; лабораторные особи, размножающиеся перекрестным оплодотворением; особи из популяции озера Нарочь, незараженные трематодам; особи из популяции озера Нарочь, зараженные трематодам. Для выявления молекулярных маркеров способа оплодотворения сначала проанализированы моллюски из двух лабораторных групп. Выделенная из тканей ноги моллюска ДНК была амплифицирована и продукты ПЦР разделены в агарозном геле. При анализе полученных ПЦР-паттернов с праймером OpB-01 были выявлены продукты, уровень амплификации которых зависел от способа оплодотворения моллюска. У всех перекрестнооплодотворяющихся моллюсков среди продуктов ПЦР преобладал фрагмент размером около 1000 пар нуклеотидов. В то же время при амплификации ДНК, выделенной из самооплодотворяющихся особей, в большей мере синтезировался продукт размером около 850 пар нуклеотидов (рис. 1).

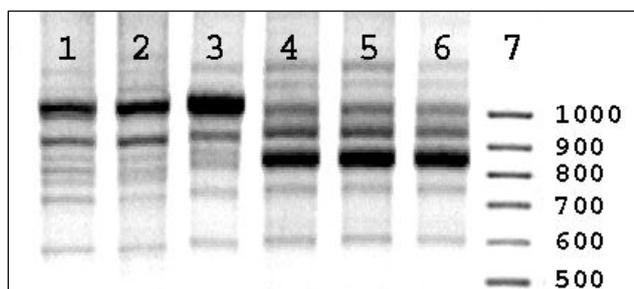


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК моллюсков с праймером OpB-01. Дорожки: 1,2,3 – перекрестнооплодотворяющиеся моллюски; 4,5,6 – самооплодотворяющиеся моллюски; 7 – маркер молекулярных масс.

Для статистической обработки данных электрофореграммы отсканировали и перевели в цифровой формат. Для каждого образца определили содержание продуктов ПЦР размером 850 п.н. и 1000 п.н.

Далее вычислили долю фрагмента размером 850 п.н. от суммы фрагментов размерами 850 п.н. и 1000

п.н. и обозначили полученную величину как R. В результате все перекрестнооплодотворяющиеся лабораторные моллюски имели значение $R < 0,55$; тогда как у всех самооплодотворяющихся лабораторных особей данный показатель составил $R > 0,55$ (рис. 2). Данные две группы достоверно различались друг от друга. Значение U-критерия Манна – Уитни составило 0, при $U_{кр} = 24$ и уровне значимости $P > 0,95$.

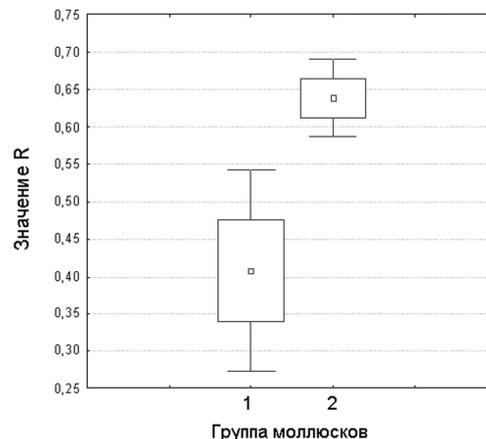


Рис. 2. Значения величины R для двух групп лабораторных моллюсков. 1 – моллюски, размножающиеся ПО, 2 – моллюски, длительно размножающиеся СО.

Таким образом, выявлены достоверные различия в ПЦР-паттернах лабораторных моллюсков *L. stagnalis*, размножающихся СО и ПО. Это позволяет использовать получаемые в ходе амплификации фрагменты размерами 850 п.н. и 1000 п.н. в качестве маркеров способа оплодотворения и определять этот способ у моллюсков из природной популяции.

Для определения влияния способа оплодотворения на чувствительность моллюсков к инвазии трематодами были проанализированы две группы прудовиков из озера Нарочь. С помощью вышеописанного подхода была определена величина R для 13 зараженных трематодами особей и для 19 незараженных моллюсков. В качестве образцов сравнения были использованы моллюски из лабораторных линий, размножающиеся посредством ПО (10 особей) и СО в четвертом и выше поколениях (10 особей).

Группа инфицированных моллюсков достоверно отличалась от неинфицированных ($U = 72$, $U_{кр} = 80$, $p < 0,05$). Все неинфицированные моллюски образовали группу величиной $R < 0,55$, как и лабораторные особи, полученные от перекрестно-оплодотворенных родителей. Это указывает на то, что все неинфицированные моллюски из озера Нарочь также имеют происхождение от особей, размножавшихся перекрестным оплодотворением.

Важно отметить, что значения величины R в выборках для групп моллюсков ПО, СО и неинфицированных из природной популяции оказались распределены нормально (по данным W-теста Шапиро-Уилка). Значения критерия W составили 0,92; 0,94; 0,91, соответственно, при вероятности справедливости гипотезы о нормальном распределении $p > 0,05$. Распределение значений этого признака в группе инфицированных моллюсков было бимодальным ($W = 0,83$ при $p < 0,02$). На рис. 3 видно, что инфицированные особи

разбились на две части. Из них 4 прудовика (показано рамкой) среди продуктов амплификации имели значение $R > 0,55$, как особи от СО из лабораторных линий. Остальные особи имели $R < 0,55$. Это свидетельствует о том, что часть инфицированных моллюсков произошла от особей, самооплодотворяющихся в течение нескольких поколений.

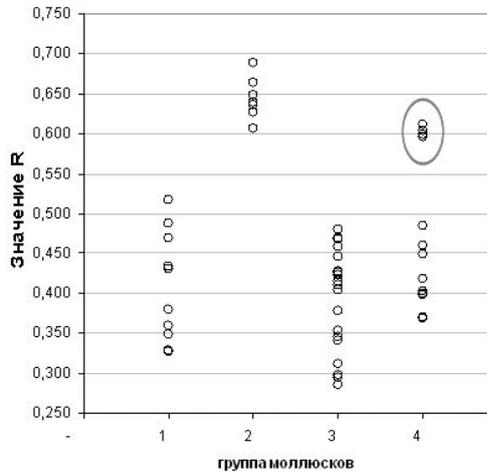


Рис. 3. Распределение групп моллюсков в зависимости от значения R. Группа 1 – перекрестно-оплодотворяющиеся лабораторные моллюски; 2 – лабораторные моллюски длительно размножающиеся самооплодотворением; 3 – неинфицированные моллюски из озера Нарочь; 4 – моллюски из озера Нарочь, инфицированные трематодами. Рамкой обозначены инфицированные моллюски, происходящие от СО.

Результаты анализа паттернов ПЦР с праймером ОрВ-01 свидетельствуют о достоверных различиях между группами моллюсков, произошедших от различных форм оплодотворения. Выявлено, что среди особей из природной популяции около трети моллюсков размножались посредством СО, в то время как среди неинфицированных прудовиков таких особей не найдено. Полученные данные говорят в пользу того, что моллюски *L. stagnalis* при различных способах оплодотворения имеют различную восприимчи-

вость к заражению трематодами. Более того, длительное самооплодотворение приводит к повышению чувствительности к инфекции. Это заставляет усомниться в целесообразности борьбы с церкариозом методом сбора и уничтожения моллюсков – промежуточных хозяев патогенных для человека трематод. При искусственном снижении численности популяции моллюска, часть особей не способна найти партнера для размножения. Прудовики переходят к вынужденному самооплодотворению, и, как следствие, становятся более чувствительными к заражению трематодами. Очаг церкариоза сохраняется, несмотря на то, что плотность популяции промежуточного хозяина снижена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимова Л.Н., Ризевский С.В., Дунец Т.Г., Курченко В.П. Морфологическая и молекулярно-генетическая идентификация личинок трематод. Морфологические особенности строения личинок трематод (Сообщение 1) // Труды Белорус. гос. ун-та. 2007. Т. 2. С. 225-247.
2. Haas W. Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion // Zoology. 2003. V. 106. P. 349-364.
3. Rizevsky S.V., Cherviakovsky E.M., Kurchenko V.P. Molecular taxonomic identification of Schistosomatidae from Naroch Lake and Polonevichi Lake in Belarus // Biochem. System. Ecology. 2011. № 39. P. 14-21.
4. Беэр С.А., Воронин М.В. Церкариозы в урбанизированных экосистемах. М.: Наука, 2007. 239 с.
5. Richards C.S., Shade P.C. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* // J. Parasitol. 1987. V. 73. № 6. P. 1146-1451.
6. Yousif F., Ibrahim A., Bardicy S.N. Compatibility of *Biomphalaria alexandrina*, *Biomphalaria glabrata* and a hybrid of both to seven strains of *Schistosoma mansoni* from Egypt // J. Egypt. Soc. Parasitol. 1998. V. 28. № 3. P. 863-881.
7. Grassi L., Jordá M.D., Andrale Z., Cappa S.M.G. Short report: *Schistosoma mansoni* miracidia are killed by defense system of an Argentine strain of *Biomphalaria straminea* // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2001. V. 65. № 4. P. 290-292.
8. Голубев А.П., Бодилевская О.А., Слесарева Л.Е. Воздействие длительного самооплодотворения на рост и размножение большого прудовика *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) – промежуточного хозяина возбудителей гельминтозных заболеваний // Доклады НАН Беларуси. 2010. Т. 54. № 1. С. 90-93.

THE ROLE OF REPRODUCTION FEATURES OF *LYMNAEA STAGNALIS* IN CERCARIOSIS FOCI MAINTENANCE

© 2011 S.V. Rizevsky¹, O.A. Bodilovskaya², A.P. Golubev², V.P. Kurchenko¹

¹Belarusian State University, Minsk

²International Sakharov Environmental University, Minsk

Molecular-genetic features of laboratory *Lymnaea stagnalis* mollusks with different types of fertilization were revealed. It was shown, that specimens from self-fertilization were more sensitive to trematode invasion than cross-fertilized ones.

Key words: *Lymnaea stagnalis*, self-fertilization, trematoda, cercariosis.

Rizevsky Stanislav Viktorovich, e-mail.: rizevsky@gmail.com;
Bodilovskaya Olga Alexandrovna, e-mail.: _olga_iseu@tut.by;
Golubev Alexandr Petrovich, Doctor of Biology, Professor,
e-mail.: algiv@rambler.ru; Kurchenko Vladimir Petrovich, Candidate of Biology, e-mail.: kurchenko@tut.by