

УДК 595.132:597.6

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПЛОДОВИТОСТИ
САМОК *COSMOCERCA ORNATA*
(NEMATODA: COSMOCERCIDAE)**

© 2017 Н.Ю. Кириллова, А.А. Кириллов

Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти (Россия)

Поступила 07.12.2016

Экспериментально изучена плодовитость самок *Cosmocerca ornata* (Dujardin, 1845) и период продукции ими личинок *in vitro*. Выявлена достоверная зависимость продукции личинок самками нематод от их размеров и температуры окружающей среды. Чем крупнее самки *C. ornata*, тем выше их плодовитость и продолжительнее период продукции личинок. При температуре 12 °С и ниже отрождение личинок самками *C. ornata* не происходит. Оптимальная температура для развития и отрождения личинок 24-28 °С.

Ключевые слова: нематоды, самка *Cosmocerca ornata*, плодовитость *in vitro*, точная продукция личинок, озерная лягушка.

Kirillova N.Yu., Kirillov A.A. Experimental studying of fecundity of the *Cosmocerca ornata* (Nematoda: Cosmocercidae) females. – Experimentally studied female fertility *Cosmocerca ornata* (Dujardin, 1845) and the period of production of larvae *in vitro*. In the experiment, female *C. ornata* remained viable up to 8 days, and the larvae produced up to 7 days. All nematode females marked downward tendency in the daily production of larvae with each later day. The significant dependence larvae production of nematode females of their size and environmental (ambient) temperature. The larger *C. ornata* females have the higher fecundity and longer period of larvae production. At a temperature of 12 °С and below the larvae hatching *C. ornata* females occurs. The optimum temperature for the larvae development and hatching of 24-28 °С.

Key words: nematodes, *Cosmocerca ornata* females, fecundity *in vitro*, daily larvae production, marsh frogs.

Определение численности яиц или личинок, отрождаемых паразитом во внешнюю среду является первым этапом при изучении популяций паразитов (Пронин и др., 1989). В научной литературе имеются данные о плодовитости нематод (Цейтлин, 1987; Crompton et al., 1988; Tompkins, Hudson 1999; Rossin et al., 2005; Rowea et al., 2008; Chylinski et al., 2009; Биттиров и др., 2010; Кириллова и др., 2011; Байсарова, 2014; Das, Gauly, 2014; и др.). Сведения о плодовитости паразитических нематод амфибий отсутствуют. Поэтому целью исследования стало изучение плодовитости и периода продукции личинок самками нематод *Cosmocerca ornata* (Dujardin, 1845) *in vitro*.

С мая по август 2010 г. на базе стационара «Кольцовский» ИЭВБ РАН (53°10'С–49°26'В) проведено экспериментальное исследование плодовитости самок

Кириллова Надежда Юрьевна, кандидат биологических наук, parasitolog@yandex.ru; *Кириллов Александр Александрович*, кандидат биологических наук

C. ornata из 2, 3-летних озерных лягушек *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Anura: Ranidae). Возраст амфибий определяли по Дубининой (1950).

Всего в серии экспериментов использовали 323 самки *C. ornata* III стадии зрелости (по Кириллову, Кирилловой, 2016): у 155 самок паразитов прослежена продукция личинок в зависимости от размеров нематод (при 24-28 °С); у 148 нематод – в зависимости от температуры окружающей среды; на 20 самках изучено влияние низких температур на продукцию личинок. В самках нематод отмечены личинки на разной стадии развития (от несформированных личинок в яйцах до уже свободных от яичевых оболочек личинок в матке). Отрождение личинок самками *C. ornata* происходит порционно.

Самок нематод, полученных от озерных лягушек, помещали в воду в отдельные чашки Петри (4,0 см). Каждую самку *C. ornata* предварительно измеряли в капле воды на предметном стекле. Наблюдения за отрождением личинок проводили каждые 1-2 часа с помощью микроскопа МБС-10. При этом каждую самку нематод пересаживали в новую чашку Петри с водой, и проводили визуальный подсчет отрожденных личинок в оставшейся чашке Петри. Эксперимент продолжался до гибели самки.

В период май-июль в протоке, где отлавливались лягушки, ежедневно измеряли температуру воды термометром в оправе ТМ-10. В природных условиях температура воды изменялась: 12,8-16,0 °С в мае, 17,5-20,5 °С в июне, 22,0-24,7 °С в июле. В лабораторном помещении стационара температура воздуха за весь период исследований изменялась: 11-23 °С в мае, 15-26 °С в июне, 24-28 °С в июле. Температура фиксировалась 4 раза в сутки лабораторным термометром ЛТ-2.

Статистическая обработка материала проведена общепринятыми методами с использованием следующих параметров: \bar{X} – средняя арифметическая, m_x – ошибка средней, достоверность различий (t) определялась по Стьюденту (Лакин, 1990). Для оценки зависимости плодовитости *C. ornata* от размеров тела нематод применяли корреляционный анализ. При анализе влияния температуры окружающей среды на плодовитость самок *C. ornata* использовали дисперсионный анализ (Лакин, 1990).

В условиях нашего эксперимента самки *C. ornata* сохраняли жизнеспособность в воде в течение 1-8 суток. Причем, продолжительность их жизни зависела от размеров нематод. С увеличением длины тела *C. ornata* продолжительность их жизни *in vitro* возрастала: самки длиной 3,50-4,50 мм жили до 6 суток, а нематоды размером > 7,51 мм – до 8 суток (табл. 2).

Самки начинали отрождать личинок в первые сутки после их помещения в чашки Петри. Продукция личинок происходила от 1 до 7 суток. Дольше всего этот процесс продолжался у самых крупных нематод (табл. 2). Так, самки длиной 3,50-4,50 мм отрождали личинок 5 суток, а нематоды размером > 7,51 мм – 7 (табл. 2).

После отрождения всех личинок самки погибали через 1, 2 дня. Матка этих самок пустая, спермии в семяприемниках не отмечены.

Как суточная продукция личинок, так и общее число отрожденных личинок самками *C. ornata* зависит от размеров нематод (табл. 1, 2). С увеличением длины тела паразитов возрастает их продуктивность. Так, максимальное число отрожденных личинок (204 шт.) отмечено у самой крупной самки *C. ornata* длиной 8,20 мм; минимальное (16 шт.) – у самой маленькой нематоды длиной 3,50 мм (табл. 1). Наибольшая среднесуточная продукция личинок зарегистрирована у размерной

группы длиной > 7,51 мм, наименьшая – у нематод размерами 3,50-4,50 мм (табл. 2).

За весь период наблюдения самки паразитов (в зависимости от размеров тела) отродили в среднем от 36,7 до 129,3 личинок (табл. 1). Корреляционный анализ выявил сильную положительную связь между сопряженными признаками ($r = 0,710$). Корреляция между длиной тела самок *C. ornata* и их продуктивностью достоверна ($P < 0,001$).

Таблица 1. Изменчивость продукции личинок самками *Cosmocerca ornata* в зависимости от размеров паразитов

Длина тела, мм	n, экз.	Количество личинок, шт.	
		$X \pm m_x$	min-max
3,50–4,50	26	36,7±2,8	16–66
4,51–5,50	48	59,3±2,7	22–96
5,51–6,50	45	67,3±3,1	28–107
6,51–7,50	20	91,7±6,2	37–130
> 7,51	16	129,3±9,2	74–204

Примечание: Здесь и в таблице 3 n — количество самок *C. ornata*.

Таблица 2. Динамика суточной продукции личинок самками *Cosmocerca ornata* разного размера

Дли- на тела, мм	I сутки	II сутки	III сутки	IV сутки	V сутки	VI сутки	VII сутки	VIII сутки	IX сутки
3,50–4,50	$\frac{22,8 \pm 1,5(26)}{9-41}$	$\frac{11,5 \pm 1,5(26)}{0-29}$	$\frac{3,8 \pm 0,9(24)}{0-11}$	$\frac{1,8 \pm 0,7(21)}{0-10}$	$\frac{0,2 \pm 0,2(10)}{0-2}$	$\frac{0(1)}{0}$	-	-	-
4,51–5,50	$\frac{28,2 \pm 1,1(48)}{13-48}$	$\frac{17,0 \pm 1,2(45)}{0-37}$	$\frac{7,0 \pm 0,9(45)}{0-21}$	$\frac{4,9 \pm 0,9(40)}{0-16}$	$\frac{2,2 \pm 1,0(26)}{0-17}$	$\frac{0,2 \pm 0,2(13)}{0-3}$	$\frac{0(1)}{0}$	-	-
5,51–6,50	$\frac{33,9 \pm 1,4(45)}{14-64}$	$\frac{22,7 \pm 1,8(44)}{0-63}$	$\frac{8,1 \pm 1,2(41)}{0-24}$	$\frac{4,5 \pm 1,0(32)}{0-18}$	$\frac{2,2 \pm 0,9(25)}{0-17}$	$\frac{0,2 \pm 0,2(14)}{0-3}$	$\frac{0(4)}{0}$	-	-
6,51–7,50	$\frac{39,9 \pm 2,9(20)}{24-86}$	$\frac{25,8 \pm 1,7(20)}{9-38}$	$\frac{13,0 \pm 1,4(20)}{2-24}$	$\frac{9,7 \pm 1,9(19)}{0-28}$	$\frac{5,8 \pm 1,9(16)}{0-14}$	$\frac{1,3 \pm 0,9(9)}{0-7}$	$\frac{0(3)}{0}$	-	-

> 7,51	$\frac{51,4 \pm 3,3(16)}{35-83}$	$\frac{37,2 \pm 3,0(15)}{22-58}$	$\frac{19,2 \pm 1,9(14)}{7-31}$	$\frac{19,0 \pm 1,5(14)}{7-37}$	$\frac{7,6 \pm 2,0(13)}{0-19}$	$\frac{1,8 \pm 1,2(11)}{0-11}$	$\frac{1,4 \pm 1,4(5)}{0-7}$	$\frac{0(2)}{0}$	-
--------	----------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	------------------------------	------------------	---

Данные таблицы 2 показывают, что среднее число личинок, отрожденных одной самкой в сутки, изменяется по дням, как между нематодами разной длины, так и внутри одной размерной группы паразитов. Во всех размерных группах самок *C. ornata* отмечена тенденция снижения продукции личинок с каждым последующими сутками (табл. 2).

Максимальное число отрожденных личинок во всех размерных группах *C. ornata* зафиксировано в первые сутки; минимальное – в последние дни отрождения личинок (табл. 2).

В нашем эксперименте при температуре лаборатории 11-12 °С отрождение личинок самками *C. ornata* не происходило (табл. 3). Процесс отрождения личинок начинался при температуре 13-14 °С, при которой отмечена единичная продукция личинок. С повышением температуры происходит постепенное увеличение числа отрожденных личинок (табл. 3). Так, при температуре лаборатории 13-16 °С средняя продукция личинок одной самкой за сутки составила 4,5 шт., а при температуре ≥ 25 °С – 34,7 шт. (табл. 3).

Таблица 3. Динамика продукции личинок самками *Cosmocerca ornata* в зависимости от температуры окружающей среды

t, °С	n, экз.	Плодовитость, шт.	
		$X \pm m_x$	min-max
≤ 12	27	0	0
13-16	25	$4,6 \pm 0,5$	1-9
17-20	28	$15,0 \pm 1,0$	9-25
21-24	31	$23,2 \pm 1,7$	11-50
≥ 25	37	$35,2 \pm 2,9$	15-86

Для выяснения роли температуры окружающей среды на продукцию личинок самками *C. ornata* in vitro нами проведен дисперсионный анализ, который показал, что температура статистически достоверно ($P > 0,99$) влияет на развитие личинок и отрождение их самками ($F_{\phi} = 67,64 > F_{ст} = 3,45$ при $P < 0,01$).

У части самок *C. ornata* нами зафиксированы перерывы (до суток) в отрождении личинок даже при оптимальной температуре 24-28 °С (табл. 2). Паразиты сохраняли жизнеспособность и активность, но личинок в течение этих суток не отрождали. В матке таких самок личинки свободные от яичевых оболочек не отмечены.

Нами проведен эксперимент по изучению влияния низких температур на продукцию личинок самками *C. ornata*. Для этого самок нематод (20 экз.), отрождающих личинок, в чашках Петри помещали в холодильник при температуре 2, 3 °С и содержали до 2 недель. Контроль проводили ежедневно. Резкое понижение температуры (условия холодильника – 2, 3 °С) при текущем процессе отрождения личинок приводило к снижению подвижности паразитов (как самок, так и личинок внутри них) и к полной остановке продуцирования, несмотря на наличие личинок в

матке, свободных от яйцевых оболочек. При повышении температуры (условия лаборатории – > 13 °С) самки *C. ornata* в течение 1-2 ч начинали отрождать личинок.

Длительное содержание самок (более 7 дней) при низкой температуре (2, 3 °С – условия холодильника) приводило к их гибели. Личинки внутри погибших самок *C. ornata* сохраняли жизнеспособность и, при повышении температуры (> 13 °С), прорывали покровы нематод и выходили во внешнюю среду.

Анализ продолжительности жизни и продукции личинок, а также влияния размеров тела нематод на количество отрожденных ими личинок показал, что самые крупные самки *C. ornata* жили дольше, отрождали большее число личинок и более продолжительное время, чем мелкие нематоды. Ранее установлено, что более крупным нематодам требуется больше времени для роста (Gemill et al., 1999), и, соответственно, они больше накапливают энергетических ресурсов для своей жизнедеятельности.

Зависимость плодовитости самок паразитов от их размеров показана рядом авторов для многих видов нематод. С увеличением размеров тела самок повышается их плодовитость (Anderson, May 1978; Цейтлин, 1987; Harvey, Keymer, 1991; Skorping et al., 1991; Morand 1996; Trouve, Morand, 1998; Tompkins, Hudson 1999; Rossin et al., 2005; Rowea et al., 2008; Кириллова и др., 2011 и др.).

Отрождение личинок самками *C. ornata* в первые сутки после их помещения в чашки Петри может свидетельствовать о том, что, с одной стороны, процесс отрождения личинок мог уже идти какое-то время в лягушках (на что указывает наличие сформированных личинок в яйцах и свободных от яйцевых оболочек в матке самок), и фактическая продукция личинок самками нематод может быть продолжительнее зафиксированного нами периода (до 7 суток). С другой стороны, интенсивный процесс отрождения личинок самками *C. ornata* в первые сутки мог быть вызван сменой температурного режима. По-видимому, более высокая (по сравнению с природными условиями) температура лаборатории приводит к росту двигательной активности личинок внутри самок нематод. В результате чего мы наблюдаем массовый выход личинок.

Следует отметить, что на продолжительность развития личинок оказывает влияние температурный фактор (Chabaud, Brygoo, 1958; Кириллова, Кириллов, 2015). При относительно низкой температуре воды в природе в мае, июне (см. материал и методы) развитие личинок в самках протекает медленно, темп отрождения личинок самками *C. ornata* при таких температурах (13-20 °С) в лаборатории низок (табл. 3). Таким образом, в природе идет накопление сформированных личинок в самках нематод. При помещении самок *C. ornata* в чашки Петри (лабораторные условия) происходит отрождение этих накопленных личинок в первые двое суток эксперимента.

Отмеченная нами тенденция снижения числа отрожденных личинок самками *C. ornata* по суткам (табл. 2) на наш взгляд обусловлена, во-первых, уменьшением общего количества оплодотворенных яиц в самках, во-вторых, снижением энергетических запасов в организме самок нематод. Кроме того, личинкам необходимо время для развития в яйцах в матке самки, даже при оптимальных температурных условиях (Кириллова, Кириллов, 2015). С этим же мы связываем перерывы (до суток) в отрождении личинок самками *C. ornata*. При относительно высокой температуре лаборатории (24-28 °С) развитие личинок в яйцах протекает быстрее, чем в природе. Накопления сформированных личинок в матке самки не происходит, как это мы наблюдаем в природных условиях. Так, ранее проведенное нами исследова-

ние показало, что во второй половине июня (температура воды 19,3 °С) в самках *C. ornata*, находящихся в амфибиях, отмечались сформированные личинки в яйцах и только в июле (23,9 °С) встречались самки нематод с пустой, растянутой маткой, уже отродившие личинок (Кириллов, Кириллова, 2016). Таким образом, в природе процессы развития и отрождения личинок продолжаются около 2 недель.

Температура окружающей среды оказывает влияние как на скорость развития личинок в самках *C. ornata*, так и на их активность. Снижение температуры приводит к понижению подвижности уже сформированных личинок, что препятствует их отрождению, а также к замедлению развития новых личинок и, следовательно, к уменьшению их продукции, а затем, к полной остановке процесса отрождения личинок при ≤ 12 °С (табл. 2). Повышение температуры (до 28 °С) ведет к активизации развития, подвижности личинок и отрождения их самками *C. ornata*.

Сохранение жизнеспособности самками *C. ornata* до 1, 2 дней *in vitro* после окончания репродукции подтверждается нашими данными о регистрации в лягушках самок нематод с пустой, растянутой маткой, которые после отрождения личинок еще какое-то время находились в хозяевах (Кириллов, Кириллова, 2016).

Результаты как ранее проведенного нами исследования (Кириллова, Кириллов, 2015), так и данного показали, что гибель самок нематод не приводит к гибели личинок. В нашем эксперименте самки *C. ornata* жили и успешно отрождали личинок *in vitro* около недели. Следовательно, и в природе погибшая или выведенная из организма хозяина по каким-либо причинам самка *C. ornata*, содержащая личинок в матке, может дать потомство.

Таким образом, наши экспериментальные данные показали, что *in vitro* самки *C. ornata* сохраняли жизнеспособность до 8 суток и продуцировали личинок до 7 дней. Выявлена достоверная зависимость плодовитости *C. ornata* от размеров нематод и от температуры окружающей среды. Чем крупнее самки паразитов, тем выше их плодовитость и продолжительнее период продукции ими личинок. Температура окружающей среды обуславливает темпы созревания личинок в самках *C. ornata* и отрождения личинок самками нематод. Оптимальной температурой для развития и отрождения личинок является 24-28 °С. При температуре 12 °С и ниже отрождение личинок самками *C. ornata* не происходит.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Байсарова З.Т. Плодовитость *Trichocephalus ovis* в организме мелкого рогатого скота // Российский паразитологический журн. 2014. № 3. С. 12-14. – **Биттиров А.М., Арипшева Б.М., Каноква А.С.** Плодовитость самок *Oxyuris equi* у лошадей в условиях Кабардино-Балкарской республики // Российский паразитологический журн. 2010. №. С. 27-29.

Дубинина М.Н. Экологическое исследование паразитофауны озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall.) дельты Волги // Паразитологический сборник Зоол. института АН СССР. 1950. Т. 12. С. 300-350.

Кириллов А.А., Кириллова Н.Ю. Изменчивость размерной структуры гемипопуляции *Cosmocerca ornata* (Nematoda, Cosmocercidae) из озерных лягушек и определяющие ее факторы // Паразитология. 2015. Т. 49. Вып. 2. С. 104-118. – **Кириллов А.А., Кириллова Н.Ю.** Влияние зимовки озерной лягушки на репродуктивную структуру гемипопуляции *Cosmocerca ornata* (Nematoda, Cosmocercidae) // Паразитология. 2016. Т. 50. Вып. 1. С. 21-39. – **Кириллова Н.Ю., Кириллов А.А.** Динамика заражения озерных лягушек нематодой *Cosmocerca ornata* (Nematoda: Cosmocercidae) в зависимости от пола и возраста хозяина // Эколог. сборник 5: труды молодых ученых Поволжья / Под ред. С.А. Сенатора,

О.В. Мухортовой и С.В. Саксонова. Тольятти, ИЭВБ РАН, Кассандра, 2015. С. 152-156. – **Кириллова Н.Ю., Кириллов А.А., Евланов И.А.** Плодовитость нематоды *Thominx neopulchra* (Nematoda, Capillariidae) из летучих мышей рода *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) // Паразитология. 2011. Т. 45. Вып. 1. С. 19-25.

Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей вузов М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

Цейтлин Д.Г. О потенциальной плодовитости нематоды *Camallanus lacustris* (Camallanidae) // Паразитология. 1987. Т. 21. Вып. 4. С. 589-591.

Anderson R.M., May R.M. Regulation and stability of host-parasite population interactions. I. Regulatory processes // Journ. Animal Ecology. 1978. Vol. 47. P. 219-247.

Carr J.A. Stress and reproduction in amphibians // Hormones and reproduction of vertebrates / D.O. Norris, K.H. Lopez (eds), Academic Press, 2010. Vol. 1. P. 99-116. – **Chabaud A.G., Brygoo E.R.** Description et cycle evolutif d'*Aplectana courdurieri* n. sp. (Nemartoda, Cosmoceridae) // Memoires de l'Institut Scientifique de Madagascar. Serie A. 1958. Vol. 12. P. 159-176. – **Chylinski C., Boag B., Stear M.J., Cattadori I.M.** Effects of host characteristics and parasite intensity on growth and fecundity of *Trichostrongylus retortaeformis* infections in rabbits // Parasitology. 2009. Vol. 136. P. 117-123.

Duellman W.E., Trueb L. Biology of amphibians. The Johns Hopkins University, 1994. 670 p.

Feder M.E., Burggren W.W. (eds). Environmental physiology of the amphibians. The University of Chicago Press, 1992. 646 p.

Gemill A.W., Skorping A., Read A.F. Optimal timing of first reproduction in parasitic nematodes // Journ. of Evolutionary Biology. 1999. Vol. 12. P. 1148-1156.

Harvey P.H., Keymer A.E. Comparing life histories using phylogenies // Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. 1991. Vol. 332. P. 31-39.

Morand S. Life-history traits in parasitic nematodes: a comparative approach for the search of invariants // Functional Ecology. 1996. Vol. 10. P. 210-218.

Rossin M.A., Poulin R., Timi J.T., Malizia A.I. Causes of inter-individual variation in reproductive strategies of the parasitic nematode *Graphidioides subterraneus* // Parasitology Research. 2005. Vol. 96. P. 335-339. – **Rowea A., McMastera K., Emerya D., Sangsterb N.** *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts // Veterinary Parasitology. 2008. Vol. 153. № 3-4. P. 285-293.

Skorping A., Read A.F., Keymer A.E. Life history covariation in intestinal nematodes of mammals // Oikos. 1991. Vol. 60. P. 365-372.

Tompkins D.M., Hudson P.J. Regulation of nematode fecundity in the ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*): not just density dependence // Parasitology. 1999. Vol. 118. № 4. P. 417-423. – **Trouve S., Morand S.** Evolution of parasites' fecundity // International Journ. Parasitology. 1998. Vol. 28. P. 1817-1819.

Wells K.D. The ecology and behavior of amphibians. The University of Chicago Press, 2010. 1400 p.