

Фарғона водийсида *Skrjabinoeces similis* (Fasciolida: plagorhidae) трематодасининг тарқалиши ва молекуляр идентификацияси

Э.Э.Икромов

А.Е.Кучбоев

О.О.Амиров

ЎзР ФА Зоология институти

Э.Ф.Икромов

Наманган давлат университети

Аннотация: Мақолада Фарғона водийси вилоятларида тарқалган кўл бақасининг трематода-*Skrjabinoeces similis* (Looss,1899) билан зарарланиши, трематоданинг морфо-анатомияси ҳамда молекуляр-генетик идентификацияси бўйича маълумотлар келтирилган.

Калит сўзлар: Фарғона водийси, кўл бақаси, трематода, морфометрия, амплификация, ДНК полимераза

Distribution and molecular identification of the trematode *Skrjabinoeces similis* (Fasciolida: plagorhidae) in the Fergana Valley

E.E.Ikramov

A.E.Kuchboev

O.O. mirov

Institute of Zoology of AS of Uzbekistan

E.F.Ikramov

Namangan State University

Abstract: The article provides information on the prevalence of the lake frog with trematode *Skrjabinoeces similis* (Looss, 1899) in regions of the Fergana Valley, as well as morpho-anatomical and molecular genetic identification on this trematode.

Keywords: Fergana valley, lake frog, fluke, morphometry, amplification, DNA polymerase

Атроф-муҳитнинг антропоген трансформацияси жараёнида амфибиялар гельминтларининг тур таркиби ва уларнинг биоценодик муносабатларида сезиларли даражада ўзгаришлар кузатилмоқда [1,2,3]. Натижада, кўпшаклли (турнинг морфалари) турларнинг кўпайишига, айрим ҳолларда эса тур ичидаги морфо-анатомик ўзгарувчанликка кўра, морфо-анатомик жиҳатдан янги таърифлаб уларни “янги тур” сифатида тавсифлашга сабаб бўлмоқда. Бу эса турларнинг молекуляр-генетик жиҳатдан таҳлил қилиш заруриятини келтириб чиқармоқда.

Skrijabinoeces (Sk) similis (Looss, 1899) трематодасининг ривожланиш босқичлари мураккаб бўлиб, хўжайин турига ҳамда атроф-муҳитнинг абиотик ва биотик омилларига боғлиқ ҳолда ривожланади [15,18]. Паразитнинг мураккаб ҳаёт тарзини инобатга олган ҳолда, дунёнинг бир қатор давлатларида бу трематодани ўрганиш бўйича тадқиқот ишларини олиб борилмоқда. Хусусан, Е.Р. Zhytova ва бошқ. [18] ишларида Қрим ҳудудида бу трематоданинг оралик хўжайини сифатида *Planorbis planorbis* (Müller, 1774) ва *Anisus spirorbis* (Linnaeus, 1758) чучук сув моллюскалари қайд этган бўлса, У.А. Шакарбаев ва бошқ. [12] томонидан Ўзбекистоннинг Шимолий-Ғарбий ва Марказий географик ҳудудларида *Pl. planorbis* тури қайд қилинган.

Sk. similis нинг дефинитив хўжайини сифатида Россиянинг Волга дарёси ҳавзасида амфибиялардан *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758), Жанубий Урал минтақасида - *Rana arvalis* (Nilsson, 1842) ва *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) турлари, Туркиянинг Эрзурум вилоятида - *Rana macrocnemis* ва *P. ridibundus* турлари қайд қилинган [4, 11, 16].

Юқоридаги тадқиқотлар билан бир қаторда Республикамизнинг Навоий, Сурхондарё, Қашқадарё, Сирдарё, Жиззах ва Тошкент вилоятларида тарқалган кўл бақаси - *Pelophylax sp.* ва Певцов қурбақаси - *Bufo pesowi* (Bedriaga, 1898) ушбу трематоданинг асосий хўжайини сифатида аниқланган [5,6,13].

Мазкур тадқиқот ишининг мақсади Фарғона водийси ҳудудида кўл бақасининг *Sk. similis* трематодаси билан зарарланишини ўрганиш ҳамда трематоданинг морфо-анатомик ва молекуляр-генетик жиҳатдан тавсифлашдан иборат.

Материал ва тадқиқот усуллари. Ушбу тадқиқот учун материаллар 2019-2022 йилларда Фарғона водийсининг турли ҳудудларидан йиғилган 114 та кўл бақаси - *Pelophylax sp.* ҳисобланади [14,17]. Шу жумладан, Наманган вилоятидан - 60 та, Фарғона вилоятидан - 19 та ва Андижон вилоятидан - 35 та кўл бақаси йиғилди (1-жадвал). Йиғилган кўл бақаси тўлиқ ва тўлиқ бўлмаган гельминтологик ёриш усули орқали ўрганилди [8].

1-жадвал

Текширилган кўл бақасининг ҳудудлар бўйича тақсимланиши

Кўл бақаси йиғилган ҳудудлар (Туманлар)	Текширилган бақалар сони	Жинси	
		Эркак (♂)	Урғочи (♀)
Наманган вилояти			
Поп	14	8	6
Чуст	16	13	3
Мингбулоқ	13	8	5
Тўрақўрғон	17	10	7
Жами:	60	39	21
Фарғона вилояти			
Данғара	9	5	4
Бувайда	10	7	3
Жами:	19	12	7
Андижон вилояти			
Балиқчи	13	9	4
Олтинкўл	14	8	6
Бўстон	8	5	3
Жами:	35	22	13
Ҳаммаси	114	73	41

Трематоданинг морфометрик ўлчамлари тирик ҳолда szm45nt-21 русумли стереомикроскоп ва N-300M русумли камераси 9.0 MP бўлган тринокуляр микроскоп ёрдамида ўрганилди. Олинган натижалар илмий адабиётлар билан солиштирилди [7, 9, 10].

Молекуляр тадқиқот ишларини ўтказиш учун *Sk. similis* трематодаси намуналари Тўрақўрғон ва Данғара туманларидан йиғилди ва 70 % этанолда фиксация қилинди. Дастлаб, геном ДНКсини ажратиш олиш учун намуналар (битта нусхадан) 20 мкл миқдорда NaOH (0,25M) эритмаси солинган пробиркаларга 12 соат давомида хона ҳароратида (18-20°C) қолдирилди. Сўнгра намуна тўқимасини парчаланиши учун термостатни 95°C ли ҳароратида 3 минут давомида ушлаб турилди. Намуналар устига 10 мкл миқдорда трис-НСІ эритмаси солиниб, Вортекс аппарати ёрдамида аралаштирилди ва 2 минут давомида центрифуга ёрдамида ҳосил бўлган супернатант ажратиш олинди. Центрифуга жараёнидан сўнг, супернатант тоза пробиркага ўтказилди, 4 мкл миқдорида НСІ (1:15) дан солинди. Сўнг вортекс ва центрифуга ёрдамида, такроран супернатант ажратиш, 5 мкл миқдорда тритон (2% ли) солинди. Кейин эса термостатда 95°C гача бўлган ҳароратда 3 минут давомида қолдирилди. Ажратиш олинган геном ДНК намунаси - 20°C ҳароратда музлатгичда сақланди.

Трематоданинг геном ДНКсидан рибосома ДНКси (рДНК) ички транскриб спейсер (ITS) соҳасига тегишли нуклеотидлар кетма-кетлиги фрагментларини ажратишда AB28 тўғри (ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT) ва TW81 тескари (GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC) праймерларидан фойдаланилди [19]. Полимераза занжир реакцияси (ПЗР) қуйидаги схема бўйича амалга оширилди:

1 - босқич - 5 дақиқа давомида ДНКнинг 94°C шароитда денатурациялаш; 2 - босқич - ДНКнинг 95°C шароитда 45 сония давомида денатурациялаш; 3 - босқич - ДНКнинг 55°C шароитда 45 сония давомида праймерларни юмшатиш; 4 - босқич 72°C шароитда 1 дақиқа 40 сония давомида элонгациялаш, 5 - босқич - 72°C шароитда 5 дақиқа давомида занжирнинг элонгацияланишидан иборат бўлди. 2,3 ва 4- босқичлар цикли 35 мартагача такрорланди.

ПЗР маҳсулотларида ДНКнинг мавжудлигини 1,0 % ли агароза гелида 120 V кучланиш билан электрофорез қилиш усулида аниқланди. ДНК амплификацияси ва ДНКнинг гелдан ажратиб олишда «Силекс М» масъулияти чекланган жамиятнинг (Москва, Россия) реактивлар тўпламидан фойдаланилди.

ДНКни сиквенс қилишда ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 реактивлар тўплами ёрдамида амалга оширилиб, реакция маҳсулотлари ABI PRISM 3100-Avant автоматик секвенаторда қайд қилинди (Москва, Россия).

Таdqикотлар натижасида олинган маълумотлар статистик таҳлили GraphPad Prism 8.1 дастурида амалга оширилди.

Олинган натижалар ва уларнинг таҳлили. Фарғона водийсида олиб борилган гельминтологик текшириш натижаларига кўра, жами 114 та кўл бақасидан 59 таси (51,7%) трематода *Sk.similis* билан зарарланганлиги аниқланди. Инвазия интенсивлиги 1-7 нусхани ташкил қилди.

Олинган маълумотлар таҳлиliga кўра, кўл бақасининг трематодалар билан зарарланиши туманлар кесимида ва бақанинг ёшига нисбатан турли туманлиги аниқланди (2-жадвал).

2-жадвал

Кўл бақасининг трематода *Skrjabinoeces similis* билан ҳудудлар ва ёшга кўра зарарланиш кўрсаткичлари.

Хўжайин	Ёши	Жинси		Кўл бақаси йиғилган ҳудудлар n=114								
		♀ Ургочи	♂ Эркак	Поп n=14	Чуёт n=16	Мингбулок n=13	Тўрақўрғон n=17	Дангара n=9	Бувайда n=10	Балиқчи n=13	Олтинкўл n=14	Бўстон n=8
<i>Pelophyla</i> <i>x sp.</i>	Вояга етган	29	51	♂ 14,2/7	25/2-4	53,8/1-6	35,2/2-3	44,4/1-3	30/1-2	15,3/1	35,7/2-6	25/2-3
				♀ 21,4/1-3	6,25/2	-	11,7/1-2	22,2/1-2	-	30,7/2-5	14,2/1-2	12,5/2-4
	Ёш бақа	12	22	♂ 7,1/1	12,5/1-2	-	-	-	10/1	-	-	-
				♀ -	-	23,0/2-3	-	-	-	7,6/1	7,1/1	-
Жами:		41	73	42,8/1-7	43,7/1-4	76,9/1-6	46,9/1-3	33,3/1-3	40/1-2	53,6/1-5	57/1-6	37,5/2-4

Келтирилган 2-жадвалдан кўриниб турибдики, кўл бақасининг туманлар бўйича энг юқори зарарланиши (53,6% дан 76,9% гача) Мингбулок, Олтинкўл

ва Балиқчи туманига тўғри келса, нисбатан камроқ (40,0% дан 47% гача) Бувайда, Поп, Чуст, Тўрақўрғон туманларига ва паст даражада (33,3 дан 37,5% гача) Бўстон ва Данғара туманига тўғри келади.

Кўл бақасининг ушбу трематода билан зарарланишининг вилоятлар кесимида таҳлил қилинганда, водий ҳудудлари бўйича кўл бақасининг энг юқори инвазия экстенсивлиги Наманган вилояти ҳудудига 76,9%, нисбатан камроқ зарарланиш Андижон вилояти ҳудудига 57,0 % ва камроқ даражада зарарланиш Фарғона вилояти ҳудудига 33,3% тўғри келди. Инвазия интенсивлиги ҳам мос равишда Наманган вилоятида -2-7 нусхани, Андижон вилоятида - 1-5 нусхани, Фарғона вилоятида эса - 1-4 нусхани ташкил этди. Наманган ва Андижон вилоятларида (текшириш ўтказилган ҳудудларда) кўл бақасини трематода билан зарарланишини юқори кўрсаткичи паразитнинг асосий (кўл бақаси) ва оралик хўжайинлар (моллюскалар) нинг ҳудуддаги зичлигига ва атроф-муҳитдаги шарт-шароитларнинг Фарғона вилоятига нисбатан анча қўлайлиги билан изоҳлаш мумкин.

Кузатишлар кўл бақасини зарарланиши амфибиянинг жинсига ҳам боғлиқлигини ҳам кўрсатди. Чуст, Мингбулоқ, Тўрақўрғон, Данғара, Бувайда, Олтинкўл ва Бўстон туманларида эркак организмлар, Поп ва Балиқчи ҳудудларида эса урғочи индивидлар ушбу трематода билан зарарланиши юқори эканлигини кўрсатди. Жами текширилган бақаларининг эркак жинсига мансуб вакиллари нинг 33,3% зарарланган. Эркак индивидларнинг урғочи индивидларга нисбатан юқори даражада зарарланишида жинснинг аҳамияти бўйича янги тадқиқотлар олиб боришга замин бўлади.

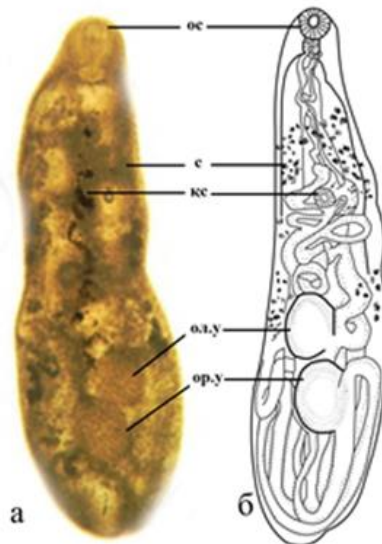
Тадқиқотлар давомида, Фарғона водийси топилган *Sk.similis* нинг морфометрик ўлчамлари аниқланиб, олинган маълумотлар Россия ҳудудидан К.И.Скрябин [9] томонидан қайд этилган ушбу тур вакили билан солиштирилди (3-жадвал).

3-жадвал

Skrjabinoeces similis трематодасининг айрим солиштирма морфометрик ўлчамлари (n=20)

Паразитнинг асосий морфометрик кўрсаткичлари	<i>Skrjabinoeces similis</i> (мм)	
	Бизнинг маълумотлар	Адабиёт бўйича (Скрябин, 1962)
Тана узунлиги	3,7-8,6	4,6-9,4
Тана эни	0,7-1,2	1-1,6
Оғиз сўрғичи диаметри	0,24 x 0,35 - 0,47 x 0,57	0,35 x 0,40 - 0,50 x 0,45
Қорин сўрғичи диаметри	0,001 – 0,016	0,004 – 0,010
Фаринкс узунлиги	0,08 x 0,13 - 0,11 x 0,16	0,14 x 0,18 - 0,17 x 0,20
Олдинги уруғдон диаметри	0,53 x 0,59 - 0,61 x 0,78	0,50 x 0,45 - 0,71 x 0,85
Кейинги уруғдон диаметри	0,40 x 0,67 - 0,69 x 0,91	0,50 x 0,71 - 0,78 x 1,1
Тухумдон диаметри	0,18 x 0,26 - 0,42 x 0,54	0,35 x 0,35 - 0,60 x 0,50

Келтирилган 3-жадвалнинг таҳлиliga кўра, айтиш мумкинки, ўрганилаётган трематоданинг Россия худудида учрайдиган вакилига нисбатан энг асосий морфометрик ўлчамлари бўйича бироз кичикроқлиги, генитал органларида, хусусан уруғдонларининг овалсимонлиги, бир-бирига яқин жойлашганлиги, тухумдонни бачадон ҳалқасидан юқоридалиги ва жинсий тешигини фаринкс текислигида жойлашганлиги билан фарқ қилади (1-расм).

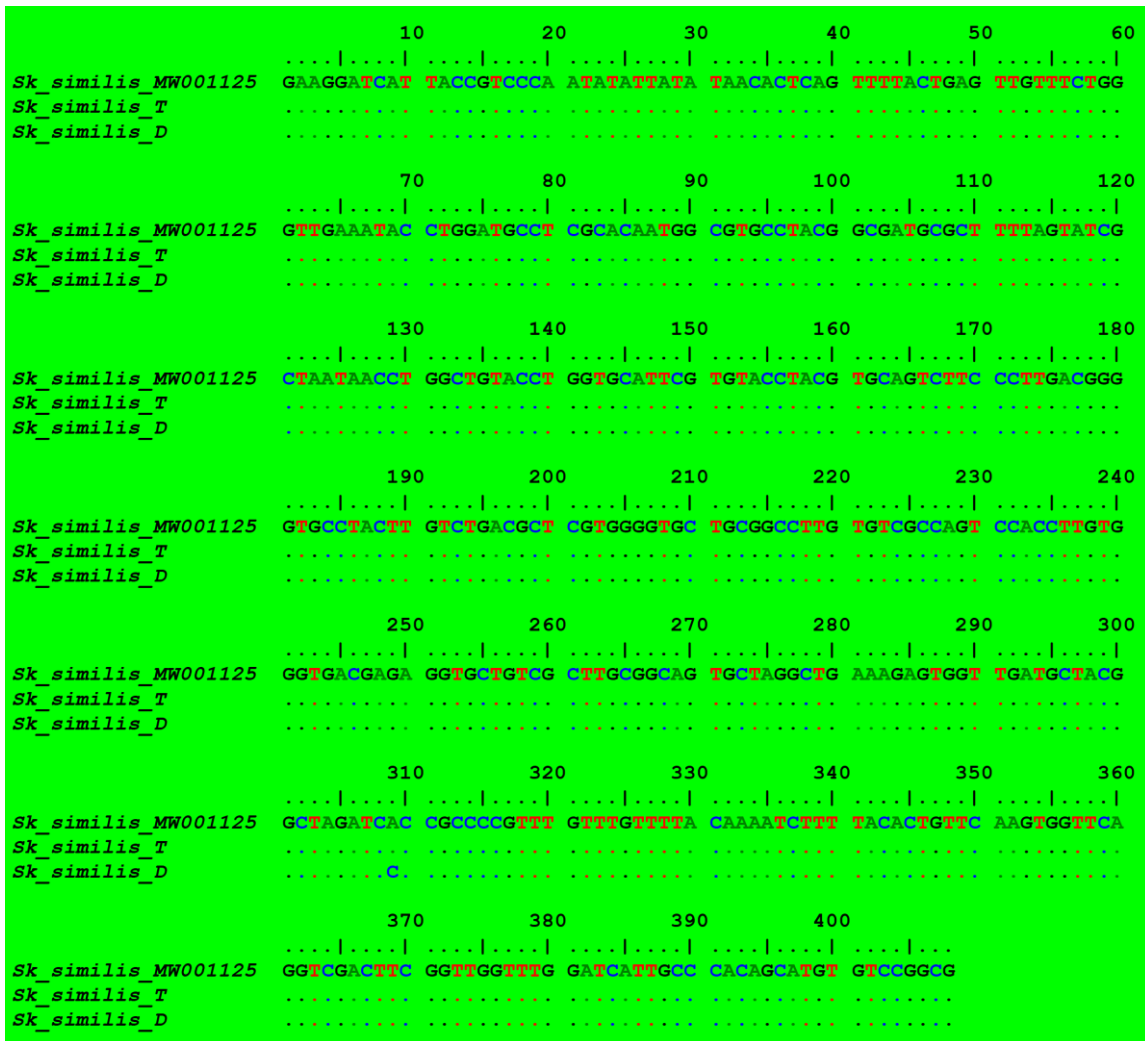


1-расм. *Skrjabinoeces similis* трематодасининг микрофотоси (асл нусха) ва чизилган нусхаси (РА-10): а - микрофотоси, б - чизма кўриниши.

Изоҳ: ос - оғиз сўргичи, с - саригдон, қс - қорин сўргичи, ол.у - олдинги уруғдон, ор.у - орқа уруғдон.

Буни кўйидаги асосий экологик омиллар билан боғлаш мумкин: биринчидан, Ўзбекистон худудининг қуруқ кескин континентал иқлим шароити бўлса; иккинчидан, “паразит-хўжайин” ўртасидаги коррелятив боғлиқликлар бўлса, учинчидан, водий ҳудуди биоценозларига антропоген босимни ортиб бораётганлиги билан изоҳлаш мумкин.

Трематоданинг Тўрақўрғон ва Данғара туманларидан йиғилган намуналарининг рДНК сининг 5.8S+ITS2 соҳасига тегишли бўлган 408 жуфт асосга эга бўлган нуклеотидлар кетма-кетлиги Миллий биоинформатика ахборот маркази-NCBI Халқаро Генбанк [20] маълумотлар базасидаги кириш рақами MW001125 билан солиштирилганда битта нуклеотидга, яъни 309-нуклеотидда А-аденин ўрнида Ц-цитозин нуклеотида билан алмашганлиги аниқланди. Ҳар иккала тумандаги трематода вакиллари ўртасидаги ўхшашлик 99,8 % ни ташкил этади. Нуклеотидлар ўртасидаги кичик (0,2%) фарқни ҳудудларнинг экологик шарт-шароитларининг хилма-хиллиги билан изоҳлаш мумкин (2 расм).



2-расм. Данғара, Тўрақўрғон туманларидан топилган ва Миллий биоинформатика ахборот маркази (NCBI) базасидаги кириш рақами MW001125 бўлган *Skrjabinoeces similis* трематодасининг рДНК 5,8S-ITS2 соҳаси нуклеотидлари кетма-кетлигини қиёсийлаш (5' дан 3'- охириг учга томон йўналишида).

Хулосалар. Олиб борилган тадқиқот натижаларига кўра, Фарғона водийсининг 9 та туманида тарқалган кўл бақасининг *Sk. similis* билан ўртача зарарланиши 47,9% ни, инвазия интенсивлиги 1-7 нусхани ташкил этди.

Фарғона водийси худудидаги кўл бақасининг ўпкасида паразитлик қилувчи *Sk. similis* нинг айрим морфометрик ўлчамлари Россия худудидаги популяцияларига нисбатан кичик эканлиги билан фарқ қилади.

Фарғона водийсининг Тўрақўрғон ва Данғара туманларида аниқланган *Sk.similis* ва трематоданинг Халқаро Генбанк базасидаги кириш рақами MW001125 намунаси ўртасидаги рДНК 5.8S-ITS2 соҳаси нуклеотидлар кетма-кетлиги ўртасидаги ўхшашлик 99,8 % ташкил қилади. Демак, *Sk.similis* ни дунё бўйича кенг тарқалган, айрим морфо-анатомик ва генетик хусусиятлари билан кўпшакли хусусиятларга эга бўлган гельминт турлари қаторига киритиш мумкин.

Фойдаланилган адабиётлар

1. Бреев К.А. Применение негативного-биномиального распределения для изучения популяционной экологии паразитов // Методы паразитологических исследований. - Л.: Наука, 1972. - 70 с.
2. Буракова А.В. Особенности заражения гельминтами остромордой лягушки фоновых и урбанизированных территорий // Урал. Вестник ОГУ, 2008. - №81. - С.111-116.
3. Вершинин В.Л. Экологические особенности популяций амфибий урбанизированных территорий // Автореф.дис. д-ра биол. наук.- Екатеринбург, 1997. - 442 с.
4. Зарипова Ф.Ф., Файзулин А.И., Михайлов Р.А. К фауне гельминтов бесхвостых земноводных Южного Урала // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - Самара, 2018. т. 20, -№ 5(4). - С.559-563.
5. Икрамов Э.Ф., Азимов Д.А. Гельминты амфибий Ферганской долины Узбекистана // Паразитология, 2004. -№3(1). - С.81-87
6. Икромов Э.Ф., Икромов Э.Э., Микулич Е.Л. Географические особенности гельминтофауны озёрной лягушки в двух отдалённых ее популяциях - Узбекистана и Беларуси // Научно-практический журнал Животноводство и ветеринарная медицина. - Горки, 2020. - №(1)36 -С.50-54.
7. Рыжиков К.М., Шарпило В.П., Шевченко Н.Н. Гельминты амфибий фауны СССР.- М: Наука, 1980. - 279 с.
8. Скрябин К.И. Метод полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая человека. М.: Изд-во МГУ, 1928. - 45 с.
9. Скрябин, К.И. Трематоды животных и человека. Москва-Ленинград: Изд-во АН СССР, 1962. - Т. 20. - 563 с.
10. Судариков В.Е. Подотряд Strigeata La Rue, 1926. Трематоды животных и человека. - М.: Изд-во АН СССР, 1960. - Т. 18. - С.453-694.
11. Чихляев И. В., Файзулин А.И. Материалы к гельминтофауне съедобной лягушки *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) в Волжском бассейне // Вестник СПбГУ. - Санкт-Петербург. 2016. Сер. 3.- Вып. 3 - С.175-180.
12. Шакарбаев У.А., Акрамова Ф.Д., Эсонбоев Ж.Р., Азимов Д.А. Церкариальная фауна трематод моллюсков (Gastropoda, Pulmonata) водоемов Северо-Западного и Центрального Узбекистана // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. Международная научная конференция. - Москва, 2021. - С.560-567.
13. Ikromov E.F., Azimov D.A., Cho M.R. The Helminthfauna of lake Frog *Rana ridibunda* Pallas, 1771 in Fergana valley of Uzbekistan // Journal of Asia-Pacific Entomology. 2004. Vol.7. - №2. - P.137-141.

14. Mazepa, G. (2013): Evolution of Water Frogs Pelophylax in Central Asia: How Hybridization and Mitochondrial Introgression among Ecologically Divergent Species Promote Occupation of Novel Environment. Master's Thesis, Uppsala University, Uppsala, Sweden. Available online: <https://www.researchgate.net/publication/361727081> (accessed on 19 August 2022).
15. Mc Namara M., Miller T., Cribb T. Evidence for extensive cryptic speciation in trematodes of butterflyfishes (Chaetodontidae) of the tropical Indo-West Pacific // International Journal for Parasitology, 2014, Vol. 44, Issue. 1, - P.37-48.
16. Tepe Y., Yilan Y. New records of trematode and acanthocephalan species in frogs in Erzurum Province, Turkey // Helminthologia, 2021. - Vol. 58(4), - P.372-384. doi: 10.2478/helm-2021-0043
17. Ualiyeva, D., Ermakov, O.A., Litvinchuk, S.N., Guo, X., Ivanov, A.Yu., Xu, R., Li, J., Xu, F., Arifulova, I.I., Kapyonkina, A.G., Khromov, V.A., Krainyuk, V.N., Sarzhanov, F., Dujsebayeva, T.N. (2022): Diversity, Phylogenetic Relationships and Distribution of Marsh Frogs (the Pelophylax ridibundus complex) from Kazakhstan and Northwest China. Diversity 2022, 14(10): 869. <https://doi.org/10.3390/d14100869>
18. Zhytova E. P., Romanchuk L. D., Gural'ska S. V., Andreieva O. Yu., Shves M. V. Circulation pathways of trematodes of freshwater gastropod mollusks in forest biocenoses of the Ukrainian Polissia // Vestnik Zoologii. - Ukraine, 2019. Vol. 53(1) -C. 13-22.
19. Curran J.A., Argyle D.J., Cox P., Onions D.E., Nicolson, L. Nucleotide sequence of the equine interferon gamma cDNA // DNA Sequence, 1994. 4(6), 405-407.
20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW001125.1/>