

УДК 595:142.3

Коцюба И.Ю.¹⁾, Межжерин С.В.²⁾, Жалай Е.И.²⁾, Гарбар А.В.¹⁾

**ПЛОИДНОСТЬ И КЛОНОВАЯ СТРУКТУРА
ПОПУЛЯЦИЙ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОГО ВИДА
DENDROBAENA OCTAEDRA (SAVIGNY, 1826)
(LUMBRICIDAE) В ПРЕДЕЛАХ УКРАИНЫ**

¹⁾ Житомирский государственный университет им. Ивана Франко,
г. Житомир;

²⁾ Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена НАН Украины, г. Киев,
e-mail: mezh@izan.kiev.ua

Ключевые слова: кариотипы, аллозимы, клоновое разнообразие, *Dendrobaena octaedra*.

Дендробена восьмигранная *Dendrobaena octaedra* (Sav.), которую еще называют таежным червем, является одним из самых массовых лесных видов семейства Lumbricidae Северной Евразии. К его особенностям следует отнести: партеногенетическое размножение [8, 9, 10, 20]; высокоплоидную структуру генома [4] (пента- или гексаплоидную [4, 7, 11]); поликлоновую структуру популяций [13, 14, 18]. Тем не менее, несмотря на сложную генетическую организацию и вполне вероятный значительный груз мутаций, вызванный партеногенетическим размножением и который проявляется в необычайно высоком генетическом разнообразии, дендробена восьмигранная — вид в подходящих для него стациях весьма многочисленный, для которого характерен ареал по всей лесной зоне Голарктики.

Особую научную пикантность исследованиям партеногенетических дождевых червей придает их гипервариабельность — экстраординарно высокая генетическая изменчивость, наблюдающаяся в популяциях амейотических организмов [5] и проявляющаяся в виде огромного числа биотипов клоновой природы. В результате каждая популяция партеногенетических червей оказывается представленной несколькими уникальными генетическими формами. Если принять во внимание, что большинство видов дождевых червей характеризуются обширными голарктическими ареалами, а в каждой популяции есть некоторое число уникальных биотипов, то оказывается, что даже приблизительный их подсчет на уровне вида оказывается

непосильной задачей. Исследования показывают, что виды партеногенетических люмбрицид характеризуются неодинаковым биотипическим (клоновым) разнообразием, которое меняется в широких пределах: при гипервариабельности среднее число особей на клон составляет от 2 до 4, в иных случаях оно изменяется от 10 до 20 [2, 3, 6, 15]. На практике это означает, что в любом случае почти в каждой популяции встречаются биотипы, представленные единичными особями, а потому формально их даже нельзя назвать клонами. На современном уровне знаний нет оснований полагать, что свойство гипервариабельности связано со степенью пloidности генома, хотя, наверное, степень пloidности и однозначно клоновое разнообразие возрастают у мелких люмбрицид [2].

Таким образом, вполне очевидной становится необходимость дальнейших исследований по этой интересной проблеме, целью которых является получение конкретных фактических данных, касающихся генетической структуры и изменчивости этих видов в пределах ареала. Именно для этого и проведен анализ кариологической и аллозимной генетической структуры таежного червя *D. octaedra* на территории Украины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основой исследования послужили серии дендробен (табл. 1), которые в дальнейшем были подвергнуты электрофоретическому и кариологическому анализу.

Таблица 1. Места взятия проб

Выборка	Широта	Долгота
с. Крылов, Ровенская обл.	26,99922	50,60192
г. Ужгород (Боздошский парк)	22,29454	48,61215
г. Ровно (зоопарк)	26,22977	50,61246
г. Винница (Лесопарк)	28,47715	49,23117
г. Житомир («Богуния», берег лесного ручья)	28,66755	50,27446
г. Киев (парк «Нивки»)	30,52363	50,43621
с. Денешы, Житомирская обл.	28,40933	50,21551
с. Перловка, Житомирская обл.	28,50762	50,21679
г. Олевск, Житомирская обл.	27,64976	51,22807
с. Котюржинцы, Хмельницкая обл.	27,6383	50,1558

Аллозимная изменчивость червей изучалась методом электрофореза в 7,5 % полиакриламидном геле и непрерывной трис-ЭДТА·Na₂-боратной рН 8,5 [12] системе буферов по следующим ферментным системам: аспаратаминотрансферазе (Aat),

малатдегидрогеназе (Mdh), неспецифическим эстеразам (Es) и супероксиддисмутазе (Sod).

Кариологический анализ проведен по методикам, описанным ранее и успешно использованным для исследования кариотипов дождевых червей [1]. В качестве источника получения делящихся клеток использована ткань семенных мешков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Геномная структура. Для исследования был использован 171 экземпляр *D. octaedra* из 10 выборок. Метафазные пластинки удовлетворительного качества удалось получить от 23 особей из шести популяций (табл. 2). При этом 5 особей были пентаплоидами ($5n = 90$) и 4 экземпляра гексаплоидами ($6n = 108$) (рис. 1). У 18 экземпляров обнаружены пластинки на стадии диакинеза мейоза. Число элементов в мейозе нестабильно и составляет от 43 до 63 (с преобладанием 57), при базовом числе хромосом $n = 18$. Вероятно, это связано с неравным распределением хромосом в первой анафазе мейоза.

Таблица 2. Число хромосом особей *D. octaedra* в разных популяций на стадиях митоза и мейоза

Выборка	Митозы			Мейозы		
	N ₁	N ₂	Число хромосом	N ₁	N ₂	Число элементов
г. Житомир	—	—	—	1	1	53
с. Денеши, Житомирская обл.	2	4	90	7	29	47-61
	2	7	108			
г. Винница	2	5	90	4	14	43-61
	1	2	108			
г. Ровно	—	—	—	3	5	43-57
с. Котюржинцы, Хмельницкая обл.	1	6	90	1	2	47-61
г. Олевск	1	6	108	2	9	55-63

Примечание: N₁ – число особей, от которых получены метафазные пластинки; N₂ – число проанализированных метафаз.

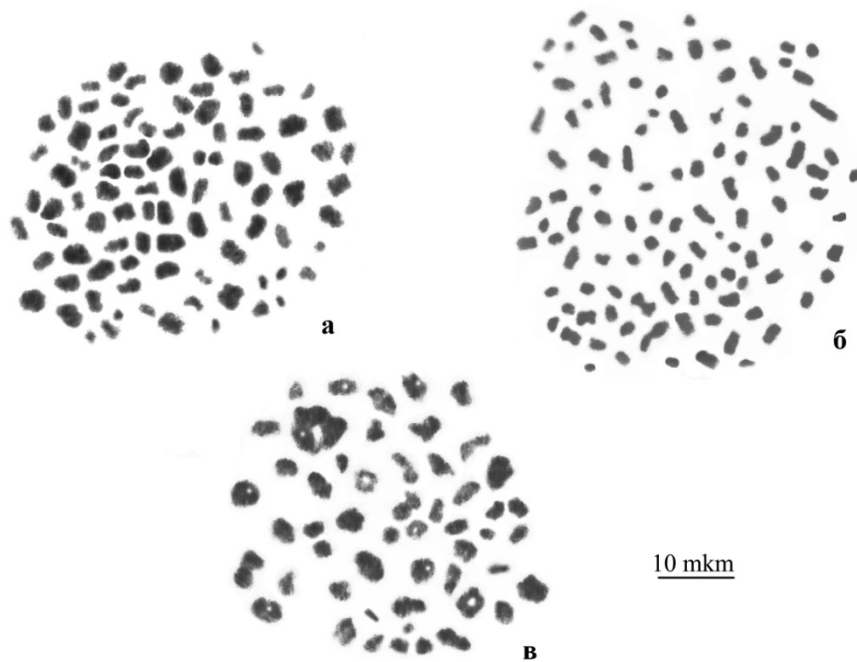


Рис. 1. Кариотип *D. octaedra*: а – митотическая метафаза ($5n = 90$) (с. Денешы, Житомирской обл.); б – митотическая метафаза ($6n = 108$) (г. Винница); в – диакинез ($n = 18$) (г. Винница).

Генотипическая и клоновая структура популяций. Анализ структуры поселений вида проведен по четырем ферментным системам: Aat, Mdh, Es, Sod, причем последняя оказалась мономорфной. Характер распределения генотипов полиморфных локусов, показывает, что в данном случае речь не идет об амфимиктическом размножении. Адекватной будет ситуация апомиксиса на основе партеногенеза, на что указывает либо отсутствие промежуточных гетерозиготных состояний, либо, наоборот, константный характер гетерозиготных сочетаний спектров исследованных ферментов. Особенно переменными оказались неспецифические эстеразы (рис. 2), кодируемые серией локусов, число которых у дендробены составляет не менее пяти. Изменчивость локусов, кодирующих этот ферменте, в конечном счете, и определяет гипервариабельность данного вида, которая заключается даже не столько в том, что его поселения всегда представлены несколькими биотипами, сколько в том, что в каждой популяции имеется их свой собственный набор.



Рис. 2. Изменчивость спектров неспецифических эстераз в популяциях *D. octaedra*: клоны А-Д — из популяции Житомира; Е-Г — из популяции Ровно; Н-М — из популяции Хмельницкого.

Число обнаруженных клонов в пределах каждой популяции колебалось от 2 до 25, причем, чем объемнее выборка, тем больше обнаружено в ней клонов. Всего на 234 исследованные особи идентифицировано 102 биотипа, из них 69 (68 %) были представлены единичными экземплярами (рис. 3). Таким образом, среднее число особей на клон в украинских популяциях *D. octaedra* составило 2,29, что свидетельствует об чрезвычайно высоком уровне клонового разнообразия по сравнению с другими видами или популяциями этого вида. Для сравнения, в Феноскандии среднее число особей на клон у этого вида составило от 1,90 до 2,91 [13, 14, 18]. Это значит, что на северном пределе европейского ареала вида клоновое разнообразие популяций меньше, чем на южном. Совершенно очевидно, что в случае с *D. octaedra*, когда более половины исследованных особей представляют свой особый биотип, а в каждой географической популяции представлены уникальные, нигде более не встречающиеся клоны (биотипы), налицо случай гипервариабельности – тот самый случай, когда определение числа генетических дискретных форм (биотипов) на протяжении всего ареала становится задачей с бесконечным числом переменных. Похожая ситуация, когда в каждой новой популяции обнаруживается свой набор биотипов, хотя и проявляется в разной степени, наблюдается и у других видов дождевых червей [16-19].

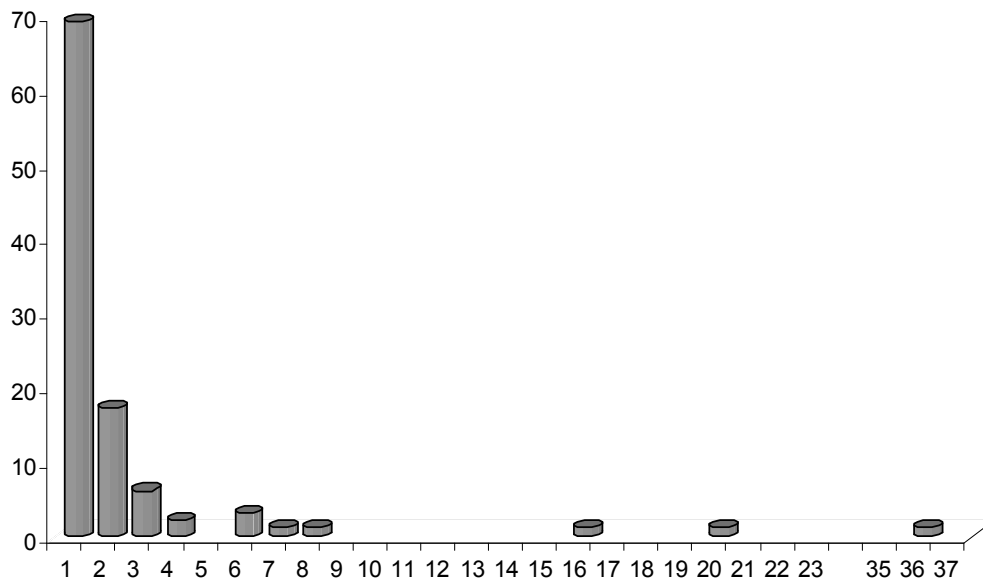


Рис. 3. Распределение клонов *D. octaedra* по числу особей его составляющих: по оси абсцисс число особей в клоне, по оси ординат – число клонов.

Нельзя не отметить тенденцию некоторого снижения клонового разнообразия популяций дендробен в крупных городах, которая становится особенно очевидной при сравнении популяции г. Житомира и его окрестностей (Денешы) (табл. 3), разница в средних значениях здесь составила три раза.

Таблица 3. Статистические показатели клоновой изменчивости в популяциях *D. octaedra*

Выборка	n	M	Min	Max	σ^2	N
с. Крылов	8	1,25	1	2	0,21	10
г. Житомир	7	6,71	1	36	167,57	47
с. Денешы	23	2,09	1	20	15,54	48
с. Перловка	2	1,50	1	2	0,50	3
г. Винница	4	1,00	1	1	0	4
г. Ровно	10	2,10	1	6	2,99	21
с. Котюржинцы	9	2,56	1	8	6,78	23
г. Олевск	6	1,83	1	4	1,37	11
г. Киев	8	1,38	1	3	0,55	11
г. Ужгород	25	2,24	1	16	10,61	56

n – число клонов (биотипов); M – среднее число особей на клон; σ^2 – дисперсия средней; min – минимальное число особей в клоне, max – максимально число особей в клоне; N – число исследованных особей.

Характеризуя распределение числа особей по клонам (табл. 3), можно отметить его отрицательно биномиальный характер в самых

массовых выборках, что находит отражение в превышении дисперсией средней в несколько раз. Очевидно, что распределение носит четко выраженный агрегированный характер, с одной стороны, в каждой из выборок имеет место избыток редких и единично встречающихся биотипов, а, с другой, происходит накопление особей массовых клонов. Такого рода центробежная тенденция отчетливо просматривается в суммарном распределении (рис. 3), в котором при среднем значении на уровне 2,29 дисперсия составила 18,4, то есть превысила ее в 8 раз. Отсюда следует, что разделение биотипов на массовые и единичные имеет под собой не только стохастический, но и вполне определенный биологический смысл. Конкретно особи массовых клоновых биотипов — это потомки клоновых родительских особей, у которых образование гамет идет амейотически, тогда как появление особей единично встречающихся биотипов с уникальными генетическими признаками или новой комбинацией старых может быть интерпретировано как следствие внутригенной рекомбинации. Это в результате и становится причиной генетической гипервариабельности дождевых червей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты подтверждает установленный ранее у многих партеногенетических мелких ракообразных и дождевых червей факт гипервариабельности. Это означает, что одни из самых массовых видов животных, обитающие в пресноводных водоемах и почве, утратившие нормальный ход мейоза, имеют темпы генетической эволюции гораздо выше, чем обычные амфимиктические виды и, значит, совсем не являются эволюционными «маргиналами». Отсюда может быть сделан важный вывод о том, что на самом деле процессы конъюгации и рекомбинация хромосом, протекающие при мейозе, которые, как традиционно считается, являются факторами повышения генетического разнообразия и ускорителями эволюции, на самом деле являются сдерживающими консервативными началами, не позволяющими видам так быстро меняться. Это следует из того обстоятельства, что снятие пресса мейоза у партеногенетических видов, как правило, приводит к резкому нарастанию генетического разнообразия на уровне генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гарбар А.В., Онищук И.П. Хромосомный гетероморфизм *Octolasmus lacteum* (Örley, 1885) (Oligochaeta, Lumbricidae) как результат гибридогенеза // Доповіди НАН України. – 2007. – № 9. – С. 136-140.

2. Межжерин С.В., Власенко Р.П., Гарбар А.В. Анализ клонового разнообразия двух видов апомиктических дождевых червей (Lumbricidae: Aporrectodea) и проблема изменчивости мелких и крупных организмов // Доповіді НАН України. – 2007. – № 8. – С. 151-156.
3. Межжерин С.В., Гарбар А.В., Онищук И.П., Власенко Р.П., Жалай Е.И. Клоновое разнообразие партеногенетических видов дождевых червей в фауне Украины // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2008. – Т. 8, вып. 1. – С. 88-92.
4. Casellato S., Rodinghiero R. Caryology of the Lumbricidae // Caryologia. – 1972. – V. 25. – P. 513 – 538.
5. Cywinska A., Hebert P. D. N. Origins of clonal diversity in the hypervariable asexual ostracode *Cyprodopsis vidua* // J. Evol. Biol. – 2002 – V. 15, Is. 1. – P. 134-142.
6. Hansena P. L., Holmstrupa M., Bayleyb M., Simonsena V. Low genetic variation for *Dendrobaena octaedra* from Greenland compared to populations from Europe and North America: Refuge or selection? // Pedobiologia. – 2006. – V. 50. – P. 225-234.
7. Hongell K., Terhivuo J. Chromosomal status of the parthenogenetic earthworm *Dendrobaena octaedra* (Sav.) (Oligochaeta: Lumbricidae) in Southern Finland // Hereditas. – 1989. – V. 10. – P. 179-182.
8. Muldal S. The chromosomes of the earthworms I. The evolution of polyploidy // Heredity. – 1952 – № 6. – P. 55–76.
9. Omodeo P. Caryology of the Lumbricidae // Caryologia. – 1952. – Vol. 4. – P. 173-275.
10. Omodeo P. Cariologia dei Lumbricidae. II. Contributo // Caryologia. – 1955. – № 8. – P. 135-178.
11. Omodeo P. Contributo alla revisione Lumbricidae // Arch. Zool. Ital. – 1956. – Vol. 41. – P. 129–212.
12. Peacock F.C., Bunting S.L., Queen K.G. Serum protein electrophoresis in acrilamide gel: patterns from normal human subjects // Science. – 1965. – Vol. 147. – P. 1451-1455.
13. Terhivuo J. Morphological and morphometric variation of the parthenogenetic earthworm *Dendrobaena octaedra* (Sav.) (Oligochaeta, Lumbricidae) in Eastern Fennoscandia // Ann. Zool. Fennici. – 1988. – Vol. 25. – P. 303-320.
14. Terhivuo J., Saura A. Allozyme variation in parthenogenetic *Dendrobaena octaedra* (Oligochaeta, Lumbricidae) populations of eastions of eastern Fennoscandia // Pedobiologia. – 1990. – Vol. 34. – P. 113-139.
15. Terhivuo J., Saura A. Clonal and morphological variation in marginal populations of parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* and *O. cyaneum* (Oligochaeta, Lumbricidae) from eastern Fennoscandia // Booll. Zool. – 1993. – Vol. 60. – P. 87-96.
16. Terhivuo J., Saura A. Genic and morphological variation of parthenogenetic earthworm *Aporrectodea rosea* in southern Finland (Oligochaeta, Lumbricidae) // Ann. Zool. Fennici. – 1993. – Vol. 30, № 13. – P. 215-224.
17. Terhivuo J., Saura A. Island biogeography of a North European parthenogenetic earthworm: Fugitive clones of *Eiseniella tetraedra* (Sav.) (Lumbricidae) // Pedobiologia. – 1999. – Vol. 43. – P. 481-486.
18. Terhivuo J., Saura A. Dispersal and clonal diversity of North-European parthenogenetic earthworms // Biol. Invasions. – 2006. – Vol. 8. – P. 1205-1218.

19. Terhivuo J., Saura A., Hongell K. Genetic and morphological variation in the parthenogenetic earthworm *Eiseniella tetraedra* (Sav.) (Oligochaeta : Lumbricidae) from South Finland and North Norway // *Pedobiologia*. – 1994. – Vol. 38. – P. 81-96.
20. Vedovini A. Systematique, caryologie et ecologie des Oligochetes Terrestres de la région Provencale // *Nat. Univ. Provence*. – 1973. – 150 p.

И.Ю. Коцюба, С.В. Межжерин, Е.И. Жалай, А.В. Гарбар
ПЛОИДНОСТЬ И КЛОНОВАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ
ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОГО ВИДА *DENDROBAENA*
***OCTAEDRA* (SAVIGNY, 1826) (LUMBRICIDAE) В ПРЕДЕЛАХ**
УКРАИНЫ

Ключевые слова: кариотипы, аллозимы, клоновое разнообразие, *Dendrobaena octaedra*.

Путем кариотипирования и аллозимного анализа установлено, что партеногенетический дождевой червь *Dendrobaena octaedra* на территории Украины представлен пента- ($5n = 90$) и гексаплоидными ($6n = 108$) расами и характеризуется рекордно высоким для дождевых червей уровнем клонового разнообразия: на 234 исследованных особи выявлено 102 клона, что составило в среднем около 2,29 особи на клон.

I. U. Kotsyuba, S. V. Mezhzherin, E. I. Zhalay, O. V. Garbar
PLOIDY LEVEL AND CLONAL STRUCTURE OF
***DENDROBAENA OCTAEDRA* (SAVIGNY, 1826)**
PARTHENOGENETIC EARTHWORM POPULATIONS IN
UKRAINE

Key words: karyotype, allozymes, clonal diversity, *Dendrobaena octaedra*.

The results of karyotyping and allozymic analysis of the parthenogenetic earthworm *Dendrobaena octaedra* show that on the territory of Ukraine it is represented by pentaploid ($5n = 90$) and hexaploid ($6n = 108$) races. It is characterized by an extremely high index of clone diversity: in 234 researched specimens 102 clones were found, which makes an average of 2.29 specimens per clone.