

УДК 595.384.1:575.2

ОСОБЕННОСТИ АЛЛОЗИМНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В ПОПУЛЯЦИЯХ ДЛИННОПАЛЫХ РАКОВ (*PONTASTACUS* BOTT, 1950) В ПРЕДЕЛАХ УКРАИНЫ

Межжерин С. В., Жалай Е. И., Костюк В. С.

Особенности аллозимной изменчивости в популяциях длиннопалых раков (*Pontastacus* Bott, 1950) в пределах Украины — С. В. Межжерин¹, Е. И. Жалай¹, В. С. Костюк². — Анализ аллозимной изменчивости выборок длиннопалых раков *Pontastacus leptodactylus* s. lato показал их четкую генетическую дифференциацию на две группы. Судя по ключевым морфологическим признакам их следует рассматривать как представляющих два симпатричных и репродуктивно изолированных вида: номинативного длиннопалого рака *P. leptodactylus* s. str. и угловатого рака *P. angulosus*, видовой статус которого всегда вызывал сомнения. В пределах *P. angulosus* по характеру географической изменчивости локуса *Aat-1* и мультилокусной дивергенции можно выделить западную (*P. angulosus* s. str.) и восточную (*P. danubialis*) викарные формы, приуроченные соответственно к бассейну Дуная и Днепра. При этом по бассейну Днестра проходит зона интрогрессивной гибридизации, в которой сосредоточены популяции с промежуточными частотами аллелей. Очевидно, форме длиннопалого рака из бассейна Дуная следует придать статус вида *Pontastacus (angulosus) danubialis*, которую необходимо рассматривать в рамках надвидового комплекса *Pontastacus (superspecies angulosus)*.

Ключевые слова: длиннопалые раки, *Pontastacus (superspecies angulosus)*, аллозимы, надвидовая группировка

Адреса: ¹ Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена НАН Украины. 01601. Киев ул. Б.Хмельницкого 15 e-mail: mezh@izan.kiev.ua. ² Житомирский государственный университет имени Ивана Франко. 10008. Житомир, ул. Большая Бердичевская, 40.

Peculiarities of allozyme variation in narrow-clawed crayfish (*Pontastacus*) populations within Ukraine — S. V. Mezhzherin¹, E. I. Zhalay¹, V. S. Kostyuk² — The analysis of allozyme variation of narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* s. lato samples showed strict genetic divergence into two groups. As for key morphological signs they should be related to two different sympatric and reproductively isolated species: nominative narrow-clawed crayfish *P. leptodactylus* s. str. and angular-clawed crayfish *P. angulosus*. The latter was given different taxonomic status. Within *P. angulosus* species according to *Aat-1* locus geographic variation, the Western and the Eastern geographical forms can be distinguished and attributed to the Danube and the Dnieper accordingly. The zone of introgressive hybridization is in the r. Dniester basin where population with intermediate allele frequencies are concentrated. Obviously, the vicarious form in the Danube basin should be given the status of *Pontastacus (angulosus) danubialis* species but viewed within *Pontastacus (superspecies angulosus)* complex.

Key words: narrow-clawed crayfish, *Pontastacus (superspecies angulosus)*, allozymes, superspecies grouping.

Address: ¹Dep. Evol. Genet. Basis of Systematics. Schmalhausen Institute of Zoology NAS of Ukraine, B. Khmelnytskogo 15, Kiev 01601, Ukraine. E-mails: mezh@izan.kiev.ua. ²Ivan Franko Zhytomyr State University, Velika Berdychevska 40, Zhytomyr 10008, Ukraine. Isaguar

Введение

Таксономия европейских речных раков является весьма противоречивой. Большинство систематиков, главным образом представители западноевропейской школы [1-2], выделяют три вида: рака широкопалого *Astacus astacus* L., 1758, рака длиннопалого *A. leptodactylus* Eschscholtz, 1823 и рака толстопалого *A. pachypus* Rathke, 1837. Однако некоторые исследователи считают более адекватной дробную систематику, предполагающую гораздо большее число таксонов. Так, Я.И. Бродский [3] выделяет семь видов и два рода: широкопалых раков *Astacus* L., 1758 и длиннопалых раков *Pontastacus* Bott, 1950, в пределах последнего, рассматривая и толстопалого рака. Я.И. Старобогатов [4-5] пошел дальше, он

уже выделил три рода, описав род толстопалых раков *Caspiastacus* Starobogatov, 1995, причем в каждом из родов указал несколько видов — всего 14. В результате самой дискуссионной оказалась таксономия рода *Pontastacus*. Число видов по представлениям разных авторов в этой группе меняется от 1 и до 9.

Причиной таких противоречий является все еще недостаточная изученность генетической структуры поселений длиннопалых раков. В отличие от широкопалого рака, популяции которого в Европе охвачены современными генетическими исследованиями [6-8], длиннопалый рак в этом плане практически не изучен. Вопросу генетической структурированности его

поселений посвящено несколько работ, базирующихся на данных изменчивости единичных локусов [9-10] и выполненных еще в 70-х годах прошлого столетия. Эти работы не привнесли ничего нового в решение дискуссионных вопросов таксономии. Последние работы, выполненные путем мультилокусного анализа, показали, что представления о длиннопалом раке как едином виде не состоятельны. В частности, показано, что по совокупности аллозимов этот вид распадается на две различных генетических общности [11], которые могут быть идентифицированы как собственно длиннопалый рак *A. leptodactylus* s. str. и угловатый рак *A. angulosus*. Популяции этих симпатрических видов поддерживают генные различия, а значит репродуктивно друг от друга изолированы. Это небольшое открытие очертило новые горизонты исследований этой группы, так как стало ясно, что систематика длиннопалых раков до конца не выяснена. К этому следует добавить, что большинство широкоареальных видов представляют собой иерархическую систему соподчиняющихся категорий [12]. Это означает, что географически распространенные виды с перекрывающимися ареалами, это, как правило, группа викарных видов с замещающими ареалами, соединенные друг с другом зонами генных интрогрессий [13] той или иной ширины.

Именно с целью дальнейшей оценки генетической неоднородности широкопалого рака *A. leptodactylus* аус. и проведено данное исследование.

Материал и методы

Фактической основой послужили 35 выборки речных раков, собранных в различных водоемах и водотоках Украины. По ключевым морфологическим признакам [3-5], касающимся формы клешней, они были разделены на две группы, особи которых предварительно классифицированы на два вида (рис. 1).

Серии раков, отнесенные к угловатому раку *A. angulosus*, были взяты из следующих мест: 1 — пгт. Подкамень (пруд) Бродовский р-н (n = 10), 2 — г. Золочев (пруд) Львовской обл. (n = 12); 3 — с. Малые Загайцы (пруд) Шумский р-н (n = 21), 4 — с. Катериновка (пруд) (n = 14), 5 — с. Бережцы (пруд) (n = 4) Кременецкий р-н, 6 — с. Барыш (пруд) Бучацкий р-н Тернопольская обл. (n = 9); 7 — г. Бурштын (водохранилище) Калушский р-н (n = 26), 8 — с. Дубовцы (пруд) Галицкий р-н (n = 19), 9 — с. Исаков (ручей) Глумацкий р-н Ивано-Франковской обл. (n = 4); 10 — с. Грудки (пруд) Камень-Каширский р-н (n = 7), 11 — с. Гишин (ручей) Ковельский р-н (n = 3), 12 — оз. Соломинiec (n = 15) Шацкий р-н, Волынской обл.; 13 — с. Большая Горбаша (пруд) Новоград-Волынский р-н (n = 6), 14 — г. Коростень (р. Уж) (n = 8), 15 — с. Антоновичи (пруд) Овручский р-н

(n = 10) Житомирской обл.; 16 — Краснооскольское вдхр. Боровский р-н (n = 14) Харьковской обл.; 17 — Стеблиевский лиман р. Днепр Херсонской обл. (n = 18); 18 — р. Дунай (n = 19) и 19 — каналы (n = 9) в окрестностях с. Вилково Килийский р-н Одесской обл.

Выборки номинативного узкопалого рака *A. leptodactylus* собраны из следующих мест: 20 — г. Долина (пруд) (n = 15) Долинский р-н Ивано-Франковской области; 21 — с. Шепетин (пруд) (n = 11), Дубновский р-н, 22 — с. Збуж (р. Горынь) (n = 14) Костопольский р-н Ровенской области; 23 — г. Луцк (р. Стырь) (n = 20); 24 — р. Южный Буг в районе г. Винницы (n = 16); 25 — г. Нетишин (n = 6) Славутский р-н Хмельницкой области; 26 — пгт. Довбыш (n = 8) Барановский р-н, 27 — с. Давыдовка (р. Ирша) (n = 9) Владимир-Волынский р-н, 28 — с. Сколобов (ручей) (n = 10) Красноармейский р-н, 29 — с. Борушковцы (р. Деревичка) (n = 10) Любарский р-н, 30 — пгт. Мирополь (р. Случ) (n = 10) Романовский р-н, 31 — с. Загребля (р. Гуйва) (n = 10) Андрушовский р-н, 32 — г. Радомышль (р. Мика) (n = 10), 33 — г. Житомир (р. Тетерев) (n = 22) Житомирской области; 34 — с. Батурин (р. Сейм) (n = 16) Бахмацкий р-н Черниговской обл.; 35 — п. Мирное с. Красная Долина (n = 11) Славянский р-н Донецкая обл.

Электрофоретическому анализу в 7,5% полиакриламидном геле были повергнуты водные экстракты мышц клешней. Разгонку проводили в трис-ЭДТА-боратной рН 8,5 системе буферов [14]. Всего проанализировано 8 ферментных систем и 2 структурных белка, кодирующиеся соответственно 17 локусами, а именно: аспартаминотрансфераза (*Aat-1*, *Aat-2*), лактатдегидрогеназа (*Ldh-1*, *Ldh-2*), малатдегидрогеназа (*Mdh-1*, *Mdh-2*), фосфоглюкомутаза (*Pgm*), супероксиддисмутаза (*Sod-1*, *Sod-2*), фосфоглюконатдегидрогеназа (*Pgdh*), малик энзим (*Me-1*), неспецифические эстеразы (*Es-1*, *Es-2*, *Es-3*), два структурных белка мышц (*Pt-1*, *Pt-2*) и альбумины (*Alb*).

Результаты и их обсуждение.

Проведенный аллозимный анализ по 17 локусам выявил изменчивость четырех (*Aat-1*, *Aat-2*, *Es-1*, *Es-2*), частоты аллелей которых в двух морфологических группах раков распределялись альтернативно (табл. 1). Причем, если по трем локусам (*Aat-1*, *Aat-2*, *Es-1*) наблюдались только устойчивые различия в частотах аллелей, то по одному из них (*Es-2*) имели место фиксированные генные различия. С учетом того, что предполагаемые виды симпатричны, устойчивые различия в генных частотах означают факт репродуктивной изоляции этих форм, а если гибридизация все же и имеет место, то она резко ограничена.

Таблица 1. Средняя частота аллелей полиморфных локусов (M) и пределы их изменчивости (Lim) у двух симпатрических видов речных раков

Локус	Аллели	<i>Pontastacus angulosus</i> (№№ 1-19)		<i>Pontastacus leptodactylus</i> (№№ 20-35)	
		M	Lim	M	Lim
<i>Aat-1</i>	100	0,707 ± 0,086	0 – 1	0,954 ± 0,064	0,83 – 1
<i>Aat-2</i>	100	0,992 ± 0,007	0,86 – 1	0,504 ± 0,049	0,06 – 0,88
<i>Es-1</i>	100	0,918 ± 0,028	0,6 – 1	0,484 ± 0,039	0 – 0,61
<i>Es-2</i>	100	1	1	0	0
<i>H exp</i>		0,015	0 – 0,054	0,053	0,011 – 0,075

№ – порядковый номер выборки, *H exp* – ожидаемая гетерозиготность. Локусы: *Alb*, *Es-3*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Me-1*, *Pgdh*, *Pgm*, *Pt-1*, *Pt-2* были инвариантными.

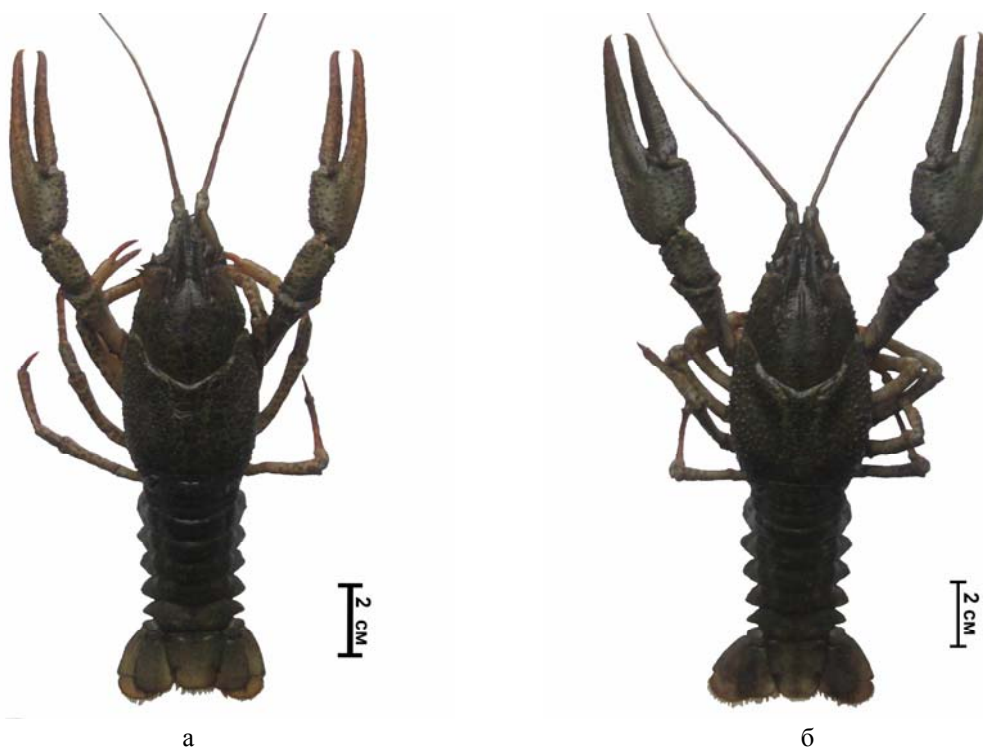


Рис. 1. Общий вид исследованных речных раков: а – *P. leptodactylus* (♂, р. Тетерев, с. Корчак Житомирский район); б – *P. angulosus* (♂, р. Гуйва, с. Пряжево, Житомирский р-н).

Уровни наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностей не отличались (табл. 1), хотя и значения существенно колебались в зависимости от популяции. Так, ожидаемая гетерозиготность (*H exp*) по выборкам варьировала от 0 до 0,067, в среднем составив 0,033. При этом средняя гетерозиготность исследованных популяций *A. angulosus* была низкой даже для десятигогих раков $0,015 \pm 0,004$ [15], тогда как у *A. leptodactylus* s. str. оказалось выше более чем в три раза $0,053 \pm 0,0033$.

Расчеты генетических дистанций и фенограмма, построенная на основе матрицы генетических дистанций (рис. 2), показывают наличие двух четких генетически отличных групп популяций, отвечающих видам *P. leptodactylus* s.

str. и *P. angulosus*. При этом средняя генетическая дистанция, оцененная по 17 локусам, составила между предполагаемыми видами $D_{Nei} = 0,101 \pm 0,001$. В пределах *P. leptodactylus* s. str. она была $D_{Nei} = 0,007 \pm 0,001$, а в границах *P. angulosus* оказалась равной $D_{Nei} = 0,018 \pm 0,001$. Причиной неоднозначности внутривидовых значений является большая гетерогенность популяций угловатого рака, которые по изменчивости локуса *Aat-1* могут быть разделены на две группы. В группе популяций, относящихся к бассейнам рек Дуная, Днестра и Нижнего Днепра, фиксирован или преобладает аллель *Aat-1*⁹⁰, тогда как в популяциях рек Центральной и Северной Украины доминирует альтернативный аллозим *Aat-1*¹⁰⁰ (рис. 3).

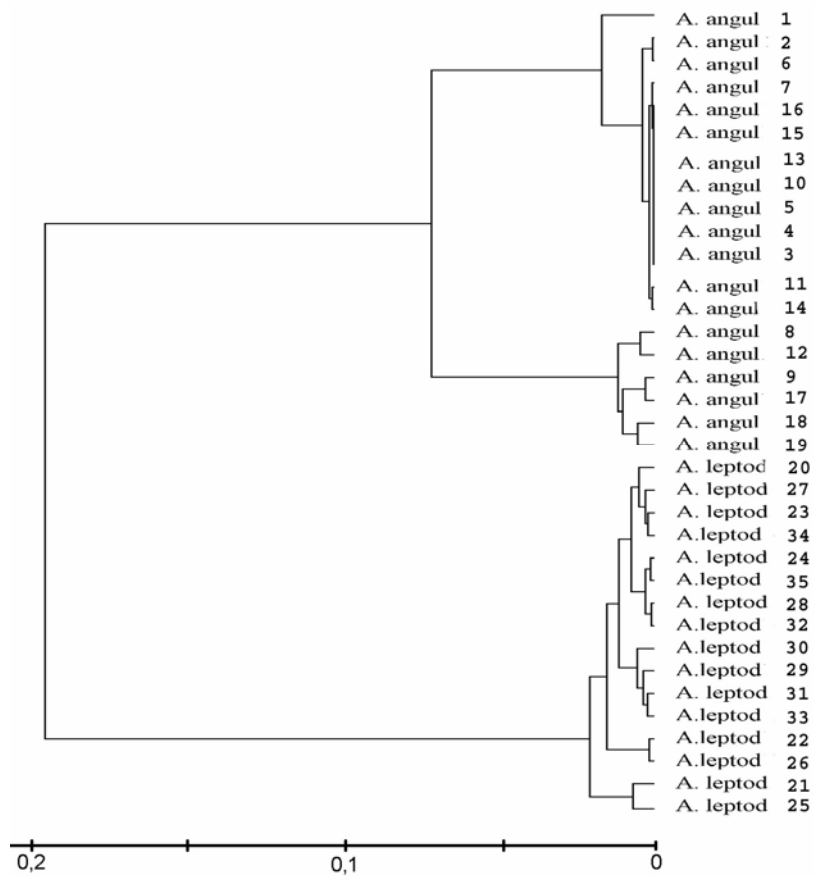


Рис. 2. Фенограмма генетических дистанций [16], рассчитанных по изменчивости 17 локусов и построенная по алгоритму UPGMA. По оси абсцисс — значения генетической дистанции.

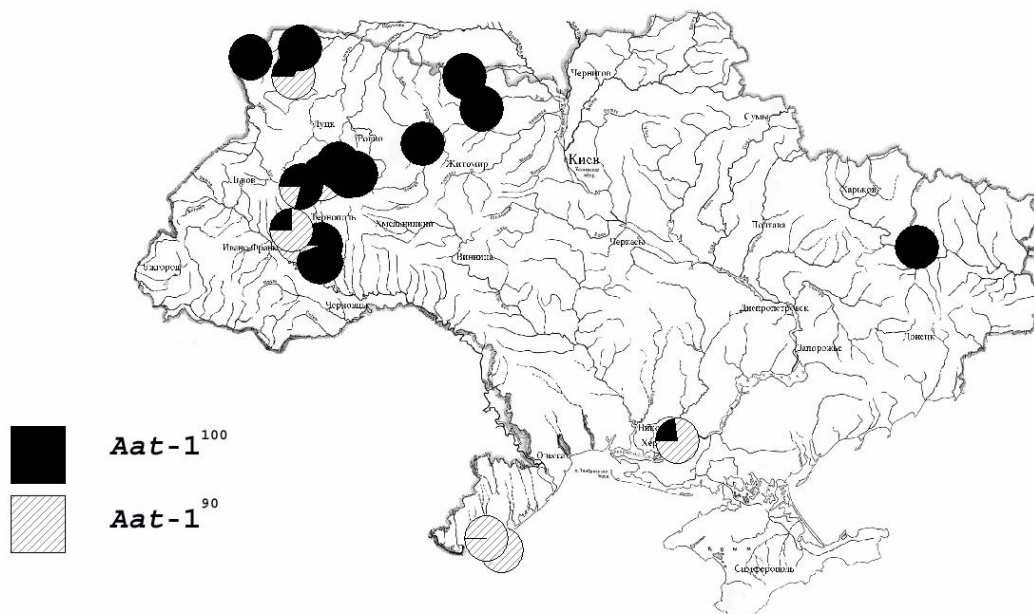


Рис. 3. Частоты локуса *Aat-1* в популяциях углового рака *P. angulosus* в пределах Украины.

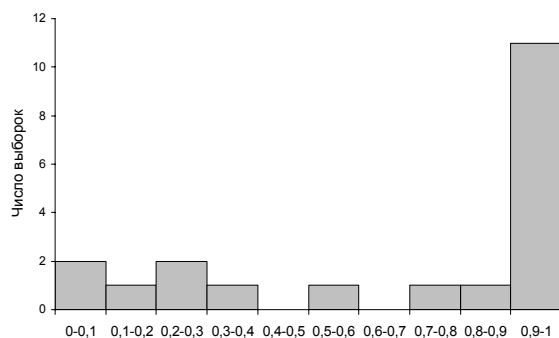


Рис. 4. Распределение частоты аллелей $Aat-1^{100}$ в популяциях *P. angulosus*. По оси абсцисс – частота.

В результате средняя генетическая дистанция между этими группами популяций составила $D_{Nei} = 0,037 \pm 0,015$. Тогда как в пределах этих популяций была существенно ниже. Так в южных и юго-западных речных бассейнах популяции угловатого рака были дифференцированы на уровне $D_{Nei} = 0,005 \pm 0,001$, в реках Центральной и Северной Украины значения генетических дистанций были в два раза ниже $D_{Nei} = 0,002 \pm 0,001$.

Пространственное распределение частот аллелей локуса *Aat-1*, разделяющее популяции *P. angulosus* на юго-западные и центральные, при статистической обработке имеет характер близкий к U-образному (рис. 4). Этот случай характерен для двух викарных видов, имеющих фиксацию альтернативных аллелей, но географически соединенных переходной зоной гибридизации или генных интродукций [13], где располагаются

популяции с промежуточными частотами аллелей. Очевидно, что установленная ситуация с двумя географическими формами угловатого рака может быть интерпретирована таким же образом. При этом приблизительно по бассейну Днестра проходит зона интрогрессивной гибридизации, в которой сосредоточены популяции с промежуточными частотами аллелей. Такие особенности аллозимной популяций угловатого рака в пространстве позволяют географической форме бассейна Дуная придать статус алловида *Pontastacus (angulosus) danubialis* Brodsky, 1981, но рассматривать ее необходимо в рамках надвидового комплекса *Pontastacus (superspecies angulosus)*.

Заключение

Таким образом, путем анализа аллозимной изменчивости широкопалых раков популяций Украины можно утверждать, что, действительно, систематическая ситуация с длиннопалыми раками гораздо сложнее, чем общепринято. Вместо одного полиморфного вида *P. leptodactylus* аус. на данный момент можно насчитать три. Причем система иерархична. Это два вида *P. leptodactylus* s. str. и *P. angulosus*, с перекрывающимися ареалами, причем в водах Украины равные по численности. Кроме того в пределах последнего можно выделить два викарных вида, соединенные зонами генных интродукций и генетически гораздо менее дифференцированные. При этом вид, обитающий на Нижнем Дунае и Нижнем Днепре, должен именоваться как *P. (angulosus) danubialis*.

- Atlas of Crayfish in Europe / Souty-Grosset C., Holdich D.M., Noël P.Y., Reynolds J.D., Hafner P. (Eds.). Paris: Muséum national d'Histoire naturelle, (Patrimoines naturels). – 2006. – 64 p.
- Fetzner J. W. «Family Astacidae Latreille, 1802-1803». Crayfish Taxon Browser. Carnegie Museum of Natural History. <http://iz.carnegiemnh.org/crayfish/NewAstacidea/family.asp?f=Astacidae>
- Бродський С. Я. Фауна України. – Том 26: Вищі раки, Вип. 3. Річкові раки. – Київ : Наукова думка, 1981. – 212 с.
- Старобогатов Я.И. Систематика и географическое распространение речных раков Азии и Восточной Европы (Crustacea Decapoda Astacoidea) // *Arthropoda selecta*. – 1995. – 4, N.3-4. – P. 3-25.
- Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Т.2, Ракообразные. СПб, 1995. Старобогатов Я. И. Отряд Decapoda. – С. 174–184.
- Schultz P. Status of the noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in Germany; monitoring protocol and the use of RAPD marker to assess the genetic structure of population // *Bul. Fr. Pech. Piscic.* – 2000. – 356. – P. 123-138.
- Alarante A., Henttonen P., Jussila J. et al. Genetic differences among noble crayfish (*astacus astacus*) stocks in Finland? Sweden and Estonia based on the ITS1 region // *Bul. Fr. Pech. Piscic.* – 2006. – 380-381. – P. 965-976.
- Schrimpt A., Schultz H.K., Theissing K. et al. The first large-scale genetic analysis of the vulnerable noble crayfish *Astacus astacus* reveals low haplotypes diversity in Central European populations // *Knowledge and management of aquatic ecosystems*. 2011. 401. (<http://dx.doi.org/10.1051/kmae/2011065>)
- Романов Л.М., Балахнин И.А., Бродский С.Я. Генетический анализ популяционной структуры раков из водоемов УССР // *Генетика*. – 1976. – 12, № 12. – С. 81-85
- Балахнин И.А., Бродский С.Я., Романов Л.М. и др. Дрейф генов щелочной фосфатазы в популяциях речного рака // XIV Межд. конф. по группам крови и биохимическому полиморфизму животных. Л. 1978. Тез. докл. – Л. 1978. – С. 173.
- Вавилов Н.И. Линнеевский вид как система. М.-Л. Сельхозгиз. – 1931. – 32 с.
- Межжерин С.В., Костюк В.С., Жалай Е.И. Аллозимные и морфологические доказательства реальности двух симпатрических видов пресноводных раков в пределах *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (Decapoda: Astacidae) // *Доповіді Національної Академії наук України*. – 2012. – № 9. – С. 131-135.
- Yanchukov A., Hofman S., Szymura J.M., Mezhzherin S.V., Morozov-Ionov S.Yu., Barton N.H., Nurnberger B. Hybridization of *Bombina orientalis* and *B. variegata* (Anura, Discoglossidae) at a sharp ecotone in Western Ukraine: comparisons across transects and over time // *Evolution*. – 2006. – 60, N3. – P. 583–600.
- Peacock F.C., Bunting S.L., Queen K.G. Serum protein electrophoresis in acrilamide gel patterns from normal human subjects // *Science*. – 1965. – 147. – P. 1451–1455.
- Nelson K., Hedgecock D. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the decapode Crustacea // *Amer. Natur.* – 1980. – 116. – P. 238-280.
- Nei M. *Molecular population genetic and evolution*. – Amsterdam: North-Holland, 1975. – 275 p.

Отримано: 23 серпня 2012 р.

Прийнято до друку: 14 листопада 2012 р.