

Д.А. ГАРБАР, А.В. ГАРБАР

Житомирский государственный университет им. Ивана Франко
Украина, 10008, Житомир, ул. Б. Бердичевская 40
E-mail: garbar@zu.edu.ua**КАРИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
РОДА *PLANORBARIUS*
(*GASTROPODA, PULMONATA,*
BULINIDAE) ФАУНЫ УКРАИНЫ**

Установлено отсутствие значимых различий между видами рода *Planorbarius* в узком понимании (*P. corneus*, *P. banaticus*, *P. purpura* и *P. grandis*). Все исследованные виды имеют идентичные хромосомные формулы ($2n = 30m + 6st = 36$) и основные числа ($FN = 72$). Не обнаружено достоверных различий между ними по длине диплоидного набора (TCL), относительной длине хромосом (RL) и центромерным индексам (CI). Виды, выделенные на основе генного маркирования, хорошо отличаются по центромерному индексу 12-й пары хромосом, что подтверждает аллоидовую структуру *P. corneus s. lato*.

© Д.А. ГАРБАР, А.В. ГАРБАР, 2007

Введение. Первые кариологические исследования рода *Planorbarius* были проведены в середине XX ст. Однако полученные результаты оказались довольно противоречивыми. Так, для *P. corneus* (Linne, 1758) сообщались различные числа хромосом в диплоидном наборе: $2n = 36$ [1, 2] и $2n = 34$ [3].

Ботке [4] исследовал хромосомный набор этого вида подробнее. Согласно его данным кариотип *P. corneus* состоит из 36 постеленно уменьшающихся в размере моноцентрических хромосом с медианным или субмедианным положением центромеры. Ограниченный объем исследованного материала (7 метафазных пластинок с высокой степенью спирализации хромосом) не позволил сделать более подробное описание кариотипа этого вида. Следует отметить, что во всех перечисленных работах вид *P. corneus* принимается в широком понимании (как единственный полиморфный представитель рода), и этих взглядов придерживается большинство современных малакологов [5–10].

Однако некоторые, преимущественно отечественные, исследователи склонны придавать видовой статус многочисленным морфологическим формам. Они выделяют в пределах рода *Planorbarius* от 5 до 8 симпатрических видов [11–13]. Так, для фауны Украины Стадниченко [14] выделяет пять видов: *P. corneus* (Linne, 1758), *P. banaticus* (Lang, 1856), *P. purpura* (O.F. Muller, 1774), *P. grandis* (Dunker, 1856), *P. stenostoma* (Bourguignat in Servain, 1881). Попытка исследовать кариологические особенности видов рода *Planorbarius* в таком узком смысле предпринята Максимовой [12]. Ею исследованы хромосомные наборы четырех из них (*P. corneus*, *P. purpura*, *P. grandis* и *P. adelosius*). Для кариологического анализа использовали преимущественно хромосомы на стадии профазы и метафазы второго мейотического деления. Было установлено, что число хромосом в гаплоидном наборе варьирует в широких пределах ($n = 15–20$), хотя преобладающим является $n = 18$. Автор пришел к выводу, что нестабильность числа хромосом в разных клетках гонады связана с наличием добавочных хромосом. Поэтому использование особенностей кариотипа в систематике этой группы чрезвычайно затруднено.

Результаты проведенного нами биохимического генного маркирования [15] однозначно доказывают конспецифичность *P. corneus*,

P. banaticus, *P. purpura* и *P. grandis*, которые приводятся некоторыми авторами для фауны Украины. Сравнение изменчивости аллозимных маркеров и морфологических признаков показало, что изоляция дистанцией гораздо существеннее дифференциации симбиотически обитающих видов. Более того, значимость генетических отличий моллюсков из северо-восточных и восточных популяций от центральных и западноукраинских доказывает возможность алловидовой структуры *P. corneus* s.l.

В связи с этим нами проведен сравнительно-кариологический анализ четырех видов, выделяемых на основании морфологического подхода (*P. corneus*, *P. banaticus*, *P. purpura* и *P. grandis*), а также двух алловидов, выделенных на основании генного маркирования, с целью определения уровня кариологических различий между ними.

Материалы и методы. Материал для кариологических исследований собран авторами на территории Украины в период с 2002 по 2005 гг. (табл. 1).

Препараты хромосом готовили из тканей гонады по методике, которая успешно использовалась для исследования кариотипов других групп моллюсков [16, 17]. Животным делали инъекцию 0,02%-ного раствора колхицина за 16–17 ч до вскрытия. Кусочки гонады измель-

чали и гипотонировали 15–20 мин в дистиллированной воде. Материал фиксировали в смеси 96%-ного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Клеточную суспензию готовили путем мацерации материала в смеси ледяной уксусной и 60%-ной молочной кислот (30 : 1), после чего раскапывали ее с помощью капиллярной пипетки на сухие, подогретье до 50 °С предметные стекла. Высушенные препараты окрашивали в течение 10 мин в приготовленном на 0,01 М фосфатном буфере (рН 6,8) 10%-ном растворе азур-эозина по Романовскому. Препараты проводили через ксилол и заключали в канадский бальзам. Анализ препаратов осуществляли с помощью микроскопа «Микмед» с увеличением 10 × 90. Метафазные пластинки (2n) с удовлетворительным разбросом хромосом и одинаковой степенью спирализации отбирали для последующего фотографирования и измерения. На основании промеров вычисляли длину диплоидного набора (TCL), относительную длину хромосом (RL = общая длина хромосомной пары/TCL · 100 %) и центромерный индекс (C_i – длина короткого плеча/длина хромосомы). Морфологический тип хромосом определяли в соответствии с классификацией Левана [18]. Основное число (FN) определяли как количество плеч хромосом в диплоидном наборе. Линейные параметры хромосом обраба-

Таблица 1

Материал, использованный для кариологических исследований

Таксон по морфологическим критериям	Локализация	Таксон по генным маркерам	Исследовано*	
			экземпляров	метафазных пластинок
<i>P. corneus</i> (Linne, 1758)	Чернигов, озеро	Восточный	31	11
	Житомир, р. Тетерев	Западный	20	7
<i>P. banaticus</i> (Lang, 1856)	Житомир, р. Тетерев	Западный	16	4
	Житомирская обл., с. Сингуры, пруд	Западный	5	1
	Чернигов, озеро	Восточный	16	12
	Тернопольский обл., г. Подгайцы, р. Коронец	Западный	10	2
<i>P. purpura</i> (O.F. Muller, 1774)	Житомир, р. Тетерев	Западный	35	13
	Чернигов, озеро	Восточный	5	1
	Сумская обл., с. Печище, р. Сула	Восточный	9	2
	Сумы, оз. Дурова	Восточный	11	2
<i>P. grandis</i> (Dunker, 1856)	Одесская обл., г. Килия, р. Дунай	Западный	12	2
	Житомир, р. Тетерев	Западный	28	13

* От некоторых экземпляров метафазные пластинки не получены.

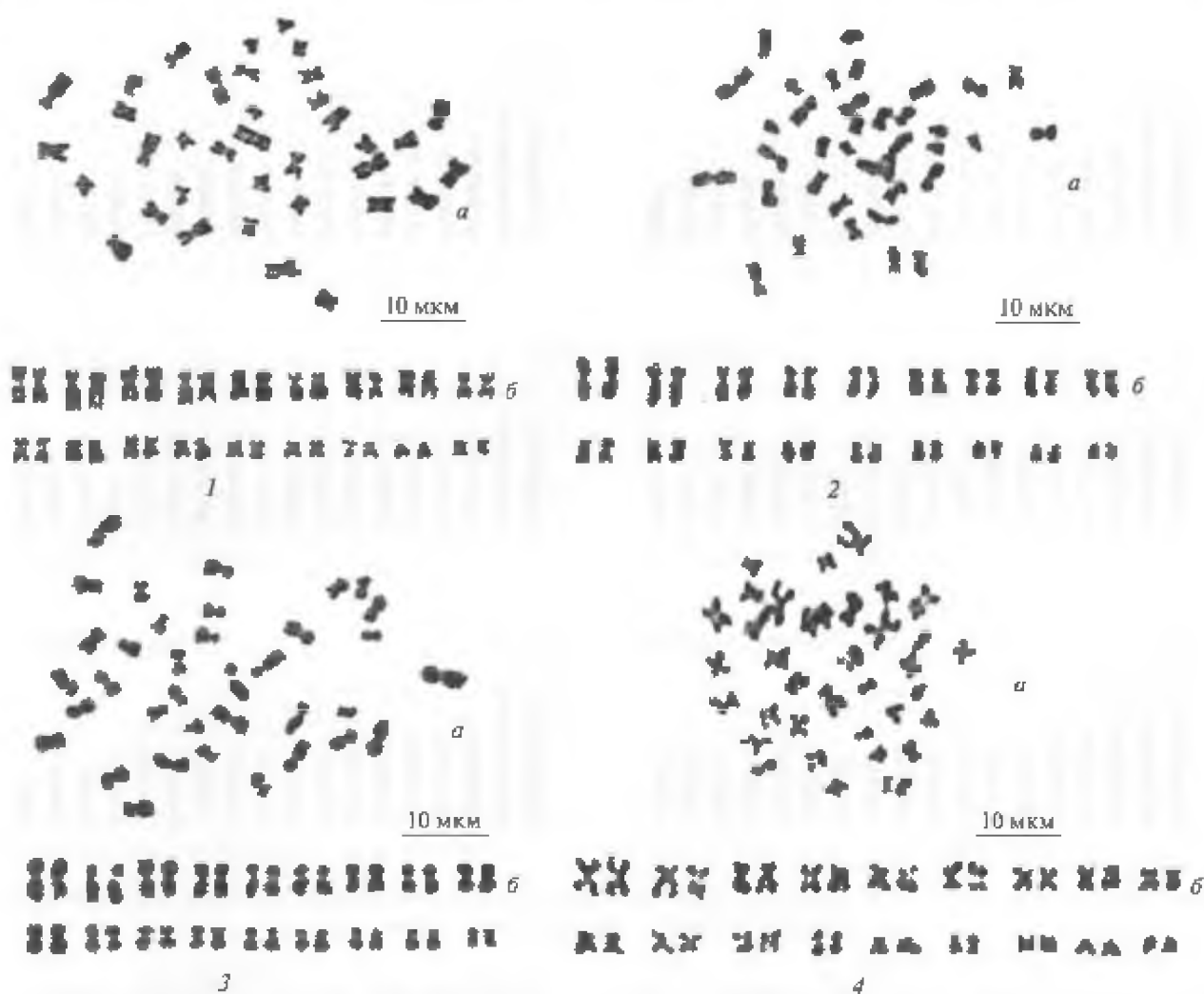


Рис. 1. Хромосомы моллюсков рода *Planorbarius*: 1 — *P. «corneus»*, 2 — *P. «banaticus»*, 3 — *P. «purpura»*, 4 — *P. «grandis»*; а — митотическая метафаза ($2n$), б — кариограмма

ны методами вариационной статистики (STATISTICA 6.0, Microsoft Excel 2003).

Результаты исследований и их обсуждение.
Описание кариотипов. *Planorbarius «corneus»* — диплоидный набор ($2n$) состоит из 36 хромосом. Длина диплоидного набора $TCL = 156,56 \pm 5,91$ мкм. Хромосомы постепенно уменьшаются в размере от 1-й до 18-й пары. Относительная длина их варьирует от 8,42 (1-я пара) до 3,69 % (18-я пара). Морфологическая характеристика кариотипа: 2, 14, 17-я пары хромосом представлены субметацентриками; остальные пары метацентрические. Хромосомная формула $2n = 30m + 6sm = 36$. Основное число $FN = 72$ (рис. 1.1 и 2.1).

Planorbarius «banaticus» — диплоидный набор ($2n$) состоит из 36 хромосом. Длина диплоидного набора $TCL = 167,96 \pm 0,92$ мкм. Хромосомы постепенно уменьшаются в размере от 1-й до 18-й пары. Относительная длина их варьирует от 8,41 (1-я пара) до 3,48 % (18-я пара). Морфологическая характеристика кариотипа: 2, 14, 17-я пары хромосом представлены субметацентриками; остальные пары метацентрические. Хромосомная формула $2n = 30m + 6sm = 36$. Основное число $FN = 72$ (рис. 1.2 и 2.2).

Planorbarius «purpura». — диплоидный набор ($2n$) состоит из 36 хромосом. Длина диплоидного набора $TCL = 164,68 \pm 1,40$ мкм. Хромо-

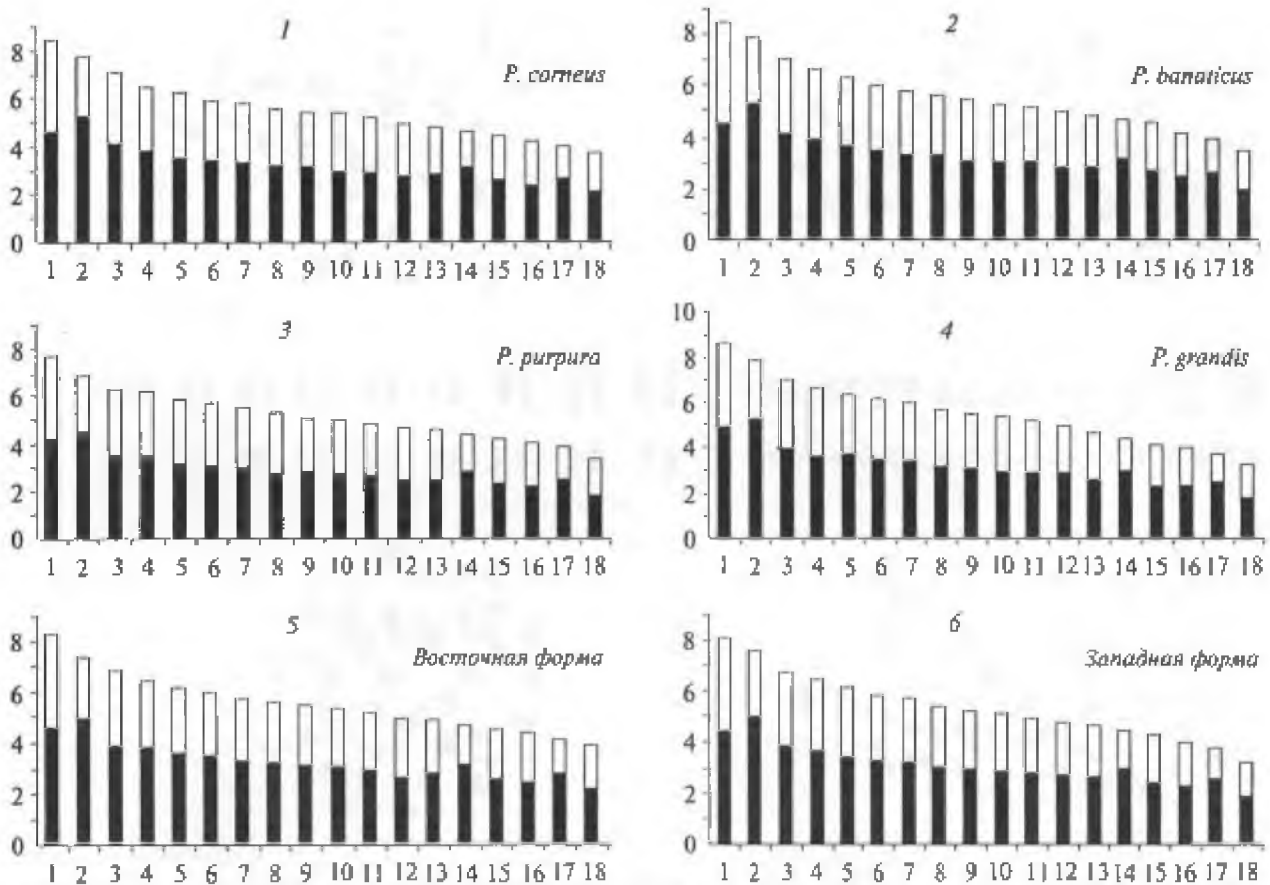


Рис. 2. Идиограммы кариотипов моллюсков рода *Planorbarius*: по вертикали — относительная длина хромосом (RI.%), по горизонтали — номера хромосомных пар

сомы постепенно уменьшаются в размере от 1-й до 18-й пары. Относительная длина их варьирует от 8,25 (1-я пара) до 3,62 % (18-я пара). Морфологическая характеристика кариотипа: 2, 14, 17-я пары хромосом представлены субметацентриками; остальные пары метацентрические. Хромосомная формула $2n = 30m + 6sm = 36$. Основное число $FN = 72$ (рис. 1.3 и 2.3).

Planorbarius «grandis» — диплоидный набор ($2n$) состоит из 36 хромосом. Длина диплоидного набора $TCL = 166,06 \pm 0,76$ мкм. Хромосомы постепенно уменьшаются в размере от 1-й до 18-й пары. Относительная длина их варьирует от 8,63 (1-я пара) до 3,38 % (18-я пара). Морфологическая характеристика кариотипа: 2, 14, 17-я пары хромосом представлены субметацентриками; остальные пары метацентрические. Хромосомная формула $2n = 30m + 6sm = 36$. Основное число $FN = 72$ (рис. 1.4 и 2.4).

«Восточная форма» (г. Чернигов, озеро) — диплоидный набор ($2n$) состоит из 36 хромосом. Длина диплоидного набора $TCL = 164,40 \pm 1,60$ мкм. Хромосомы постепенно уменьшаются в размере от 1-й до 18-й пары. Относительная длина их варьирует от 8,24 (1-я пара) до 3,89 % (18-я пара). Морфологическая характеристика кариотипа: 2, 14, 17-я пары хромосом представлены субметацентриками; остальные пары метацентрические. Хромосомная формула $2n = 30m + 6sm = 36$. Основное число $FN = 72$ (рис. 1.1, 2 и 2.5).

«Западная форма» (г. Житомир, р. Тетерев) — диплоидный набор ($2n$) состоит из 36 хромосом. Длина диплоидного набора $TCL = 164,86 \pm 2,52$ мкм. Хромосомы постепенно уменьшаются в размере от 1-й до 18-й пары. Относительная длина их варьирует от 8,33 (1-я пара) до 3,32 % (18-я пара). Морфологическая характеристика кариотипа: 2, 14, 17-я пары хромосом

представлены субметацентриками; остальные пары метацентрические. Хромосомная формула $2n = 30m + 6sm = 36$. Основное число $FN = 72$ (рис. 1.3, 4 и 2.6).

Сравнительный анализ кариотипов. Наиболее изменчивым показателем кариотипа оказался центромерный индекс (Ci) (рис. 3.3, 3.4). Некоторые отличия обнаружены между четырьмя традиционными видами, выделенными по морфологическим признакам (дисперсионный анализ, LSD-тест). Так *P. «banaticus»* достоверно отличается от *P. «purpura»* по центромерному индексу 1-й пары хромосом ($P = 0,01$) а *P. «grandis»* от *P. «purpura»* — по центромерному индексу 4-й пары ($P = 0,03$).

Появление изменений в морфологии отдельных пар хромосом чаще всего связано с их перестройками (инверсии, транслокации, деления и др.). При появлении такой перестройки определенной пары хромосом у одного из видов он должен достоверно отличаться по центромерному индексу этой пары от всех остальных видов, кариотипы которых не изменялись. В случае четырех исследуемых видов

такая закономерность не прослеживается, поэтому обнаруженные отличия по центромерным индексам между некоторыми парами видов недостаточны для их разграничения.

Сравнение по центромерным индексам аллоидов, выделенных на основании биохимического генного маркирования, свидетельствует о наличии более значимых различий между ними, чем в случае четырех традиционных видов. Два указанных аллоида достоверно отличаются по центромерным индексам 12-й ($P = 0,00001$) и 15-й ($P = 0,02$) пар хромосом. Если в случае 15-й хромосомной пары уровень достоверности различий сопоставим с уровнем достоверности различий между традиционными видами, то в случае 12-й пары достоверность различий выше на три порядка. Моллюски с северо-востока и востока Украины характеризуются центромерным индексом 12-й пары $0,48 \pm 0,01$, тогда как для моллюсков с центра и запада Украины этот показатель несколько ниже — $0,43 \pm 0,01$.

Результаты дискриминантного анализа (табл. 2) показали, что эти аллоиды дифференциру-

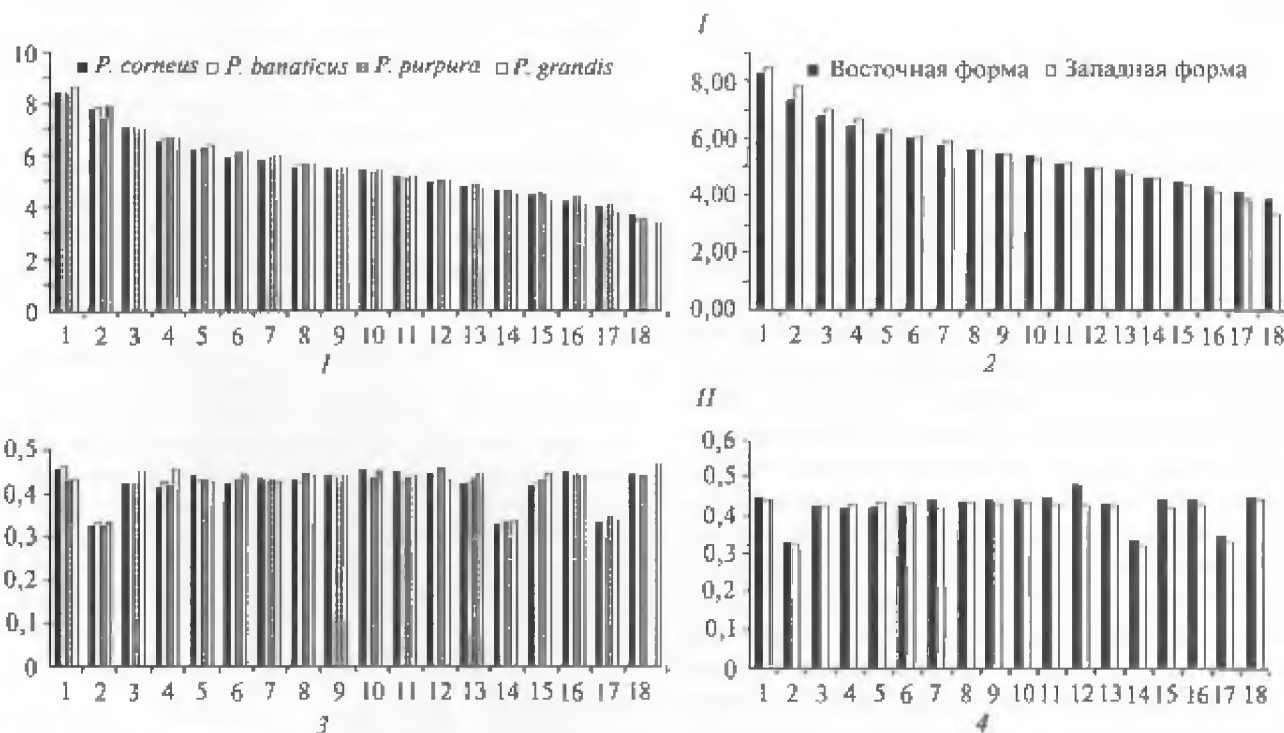


Рис. 3. Относительная длина хромосом (RL%) (I) и центромерные индексы (Ci) (II) исследованных видов рода *Planorbarius*

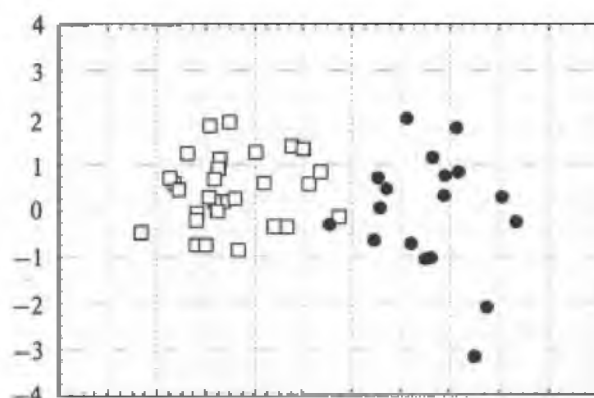


Рис. 4. Распределение исследованных экземпляров алловидов *Planorbarius* в поле первых двух дискриминантных функций: по горизонтали — функция 1; по вертикали — функция 2; ● — восточная форма; □ — западная форма

Таблица 2

Надежность дискриминации, %, по центромерным индексам алловидов рода *Planorbarius*, выделенных по результатам биохимического генного маркирования

Алловид	Процент	Восточный	Западный
Восточный	94,44	17	1
Западный	96,77	1	30
В целом	95,91	18	31

ются на уровне 96 %. На диаграмме рассеяния выборки хотя и соприкасаются, однако довольно четко разделены (рис. 4). Следовательно, большинство экземпляров этих алловидов может быть разграничено по центромерным индексам.

Таким образом, некоторые кариологические признаки видов рода *Planorbarius* могут использоваться в качестве дифференцирующих. Вместе с тем большинство параметров их кариотипов обнаруживают значительное сходство. Так, исследованные алловиды имеют 36 хромосом в диплоидном наборе, что согласуется с ранее опубликованными данными [1, 2, 4]. Хромосомное число $2n = 34$, установленное для *P. corneus* [3], вероятно, определено ошибочно. Кроме того, алловиды *Planorbarius* имеют идентичные хромосомные формулы и основные числа (FN). Не обнаружено также достоверных отличий по относительной длине хромосом (RL) (рис. 3, 1, 2) и длине диплоидного набора

(TCL). Следовательно, кариологические признаки в этой группе могут использоваться также в качестве интегрирующих. Значительное сходство хромосомных наборов алловидов свидетельствует об их близком филогенетическом родстве и незначительной роли хромосомных перестроек в процессах видообразования в пределах рода *Planorbarius*.

Выводы. В результате сравнительного анализа кариотипов рода *Planorbarius* установлено отсутствие значимых различий между видами в узком понимании, выделяемыми по морфологическим признакам (*P. «corneus»*, *P. «banaticus»*, *P. «purpura»* и *P. «grandis»*). Все исследованные виды имеют идентичные хромосомные формулы ($2n = 30m + 6sm = 36$) и основные числа (FN = 72). Не обнаружено также достоверных различий между ними по длине диплоидного набора (TCL), относительной длине хромосом (RL) и центромерным индексам (Ci).

В то же время алловиды, выделенные на основе генного маркирования, хорошо разграничиваются по центромерному индексу 12-й пары хромосом, которая для них является маркерной. Таким образом, кариологические данные свидетельствуют в пользу того, что *P. corneus* является политипическим видом (надвидом), представленным серией замещающих алловидов. Если рассматривать род *Planorbarius* с этой точки зрения, кариотип приобретает определенное дифференцирующее значение, и некоторые его параметры (в основном центромерные индексы) могут быть полезными для последующих таксономических и цитогенетических исследований группы.

SUMMARY. The absence of significant distinctions between the species of the genus *Planorbarius* in the narrow sense (*P. corneus*, *P. banaticus*, *P. purpura* and *P. grandis*) has been established. All investigated species had identical chromosomal formulas ($2n = 30m + 6sm = 36$) and fundamental numbers (FN = 72). Reliable distinctions between them were not found by total complement length (TCL), relative length of chromosomes (RL) and centromeric indexes. The species selected on the basis of genetic marking differed clearly by centromeric index of chromosome 12 that confirms the allospecies frame of *P. corneus s. lato*.

РЕЗЮМЕ. Установлено відсутність значущих відмінностей між видами роду *Planorbarius* у вузькому розумінні (*P. corneus*, *P. banaticus*, *P. purpura* і *P. grandis*). Всі досліджені види мають ідентичні хромосомні

формули ($2n = 30m + 6m = 36$) і основні числа ($FN = 72$). Не виявлено достовірних розходжень між ними за довжиною диплоїдного набору (TCL), відносною довжиною хромосом (RL) і центромерними індексами (Cі). Види, виділені на основі генного маркування, добре відрізняються за центромерним індексом 12-ї пари хромосом, що підтверджує алопloidову структуру *P. corneus s. lato*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Le Calvez J., Certain P.* Données cariologiques sur quelques pulmonés basommatophores // *C. r. Acad. Sci. Paris.* — 1950. — № 231. — P. 794—795.
2. *Burch J.B.* The chromosomes of *Planorbarius corneus* (Linnaeus), with a discussion on the value of chromosome numbers in snail systematics // *Basteria.* — 1961. — 25, № 4/5. — P. 45—52.
3. *Azevedo J. F., Concalves M.M.* Ensaios sobre o estado da pimeracao cromosomica de algumas especies de moluscos de agua doce // *Anais Inst. Med. Trop.* — 1956. — 13. — P. 569—577.
4. *Boitke W.* Heterochromatin in a pulmonate snail *Planorbarius corneus* // *Caryologia.* — 1982. — 35, № 4. — P. 443—448.
5. *Жадин В.И.* Моллюски пресных и солоноватых вод СССР. — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1952. — 376 с.
6. *Baker F.C.* The molluscan family Planorbidae. — Urbana: Univ. Illinois press, 1945. — 530 p.
7. *Hubendick B.* Phylogeny in the Planorbidae // *Trans. Zool. Soc. London.* — 1955. — 28, № 6. — P. 453—542.
8. *McMillan N.F.* The range of *Planorbarius corneus* (L.) in the British Isles // *J. Conch.* — 1955. — 20. — P. 63—65.
9. *Falkner G., Obrdlík P., Falkner M.* Mollusques continentaux de France. — Paris, 2002. — 350 p.
10. *Gloer P.* Die Subwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. — Conch Books, 2002. — 327 p.
11. *Кривошеина Л.В., Старобогатов Я.И.* Состав и зоогеографическая характеристика пресноводной малакофауны горной части бассейна верхнего Иртыша // *Зоол. журн.* — 1973. — 22, вып. 3. — С. 348—355.
12. *Максимова Т.И.* Морфологический и генетический анализ моллюсков семейства *Bulinidae* (Gastropoda, Pulmonata) фауны России и сопредельных территорий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 03.00.08. — СПб., 1995. — 28 с.
13. *Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий /* Под ред. С.Я. Цалолыхина. Т.6. Моллюски, Полихеты, Немертины. — СПб.: Наука, 2004. — 528 с.
14. *Стадниченко А.П.* Прудовиковообразные (пузырчиковые, витушковы, катушковые) // *Фауна Украины.* — Т.29. — Киев: Наук. думка, 1990. — 292 с.
15. *Межжерин С.В., Гарбар Д.А., Гарбар А.В.* Систематическая структура комплекса *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) s. lato: анализ аллозимных маркеров и морфометрических признаков // *Вестн. зоологии.* — 2005. — 39, № 6. — С. 11—17
16. *Thiriot-Quievreux C.* Chromosome studies in pelagic opisthobranch molluscs // *Can. J. Zool.* — 1988. — № 66. — P. 1460—1477.
17. *Гарбар А.В.* Кариотип *Lymnaea auricularia* (Gastropoda, Pulmonata, Lymnaeidae) из Центрального Полесья // *Вестн. зоологии.* — 1998. — 32, № 5/6. — С. 137—138.
18. *Levan A., Fredga K., Sandberg A.* Nomenclature for centromeric position on chromosomes // *Hereditas.* — 1964. — № 52. — P. 201—220.

Поступила 24.05.06