

УДК 595.142.3

## КЛОНАЛЬНАЯ СТРУКТУРА, КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛИРОВАННОГО ПОСЕЛЕНИЯ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНОГО ВИДА ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ *APORRECTODEA ROSEA* (*OLIGOCHAETA: LUMBRICIDAE*)

Р. П. Власенко, А. В. Гарбар, С. В. Межжерин

**Клональна структура, кариологічний та морфологічний аналіз гіперваріабельного виду дощових черв'як *Aporrectodea rosea* (*Oligochaeta: Lumbricidae*) з ізольованого поселення.** — Р. П. Власенко<sup>1</sup>, О. В. Гарбар<sup>1</sup>, С. В. Межжерин<sup>2</sup>. — У результаті біохімічного генного маркування за 5 локусамі (*Aat*, *Es-1*, *Es-2*, *Es-3*, *Mdh*) 94 особини *A. rosea* з території Національного ботанічного саду ім. А. В. Фоміна (Київ) виявлено 17 клонів. Встановлено, що клони різноплоїдні, а також ди- ( $2n=36$ ), три- ( $3n=54$ ) і, ймовірно, гекса- ( $6n=108$ ) та октаплоїдні ( $8n=144$ ). Аналіз морфологічних ознак 4 найбільш масових клонів виявив їх чітку відмежованість, в основному, за якісними параметрами, що стосуються забарвлення та форми пояса.

**Ключові слова:** дощові черви, *Aporrectodea*, морфологія, клони, хромосоми.

**Адреси:** <sup>1</sup> Житомирський державний університет ім. Івана Франка, ул. Б. Бердичевская, 40, Житомир, 10002, Україна, e-mail: saguaroklub@mail.ru, vlasenko\_r@mail.ru; <sup>2</sup> Інститут зоології НАН України, ул. Б. Хмельницького, 15, Київ-30. ГСП, 01601 Україна.

**Clone structure, karyological and morphological analysis of hypervariable *Aporrectodea rosea* (*Oligochaeta: Lumbricidae*) earthworm species from the isolated locality.** — R. P. Vlasenko<sup>1</sup>, O. V. Garbar<sup>1</sup>, S. V. Mezherin<sup>2</sup>. — As a result of biochemical genic investigation basing on 5 loci (*Aat*, *Es-1*, *Es-2*, *Es-3*, *Mdh*) of 94 *A. rosea* individuals from the territory of the Fomin National Botanical Garden (Kiev) 17 clones are found. The earthworms clones have different chromosome sets and are di- ( $2n=36$ ), tri- ( $2n=54$ ), and presumably hexa- ( $6n=108$ ) and octoploides ( $8n=144$ ). The morphological analysis of 4 most numerous clones disclosed their good separation mainly according to qualitative parameters connected with the pigmentation and the girdle form.

### Вступление

Дождевые черви семейства Lumbricidae одна из немногих групп животных, у которых выявлено массовую полиплоидию (Muldal, 1952; Omodeo, 1955; Викторов, 1993; Булатова и др., 1984). Считается, что все современные виды этого семейства имеют амфидиплоидную природу, причем около 50% из них имеют вторичную полиплоидию, вызванную дополнительной гибридизацией, которая в случаях нечётноплоидности приводит к апомиксису и партеногенезу (Викторов, 1993), что в свою очередь приводит к образованию многочисленных клонов. Наибольшее разнообразие полиплоидных форм и клонов наблюдается, конечно, у космополитических видов дождевых червей. Одним из них является *Aporrectodea rosea* – фоновый вид большинства почвенных ценозов Центрального Полесья.

В результате кариологических исследований было определено, что особи *A. rosea* имеют гаплоидное число хромосом ( $n = 18$ ) (Muldal, 1952), характерное для рода в целом. Хотя, в отличие от других представителей этого рода, он характеризуется высоким разнообразием полиплоидных рас. Помимо диплоидной ( $2n = 36$ ) (Vedovini, 1973) в Европе обнаружены три- ( $3n = 54$ ), тетра- ( $4n =$

$72$ ), пента- ( $5n = 90$ ), гекса- ( $6n = 108$ ), окто- ( $8n = 144$ ) и даже декаплоидные ( $10n = 160-174$ ) формы (Викторов, 1993; Muldal, 1952; Omodeo, 1952, 1955 и др.).

Использование метода биохимического генного маркирования позволило обнаружить многочисленные клоновые формы *A. rosea* в Феноскандии (Terhivuo, Sauga, 1993). При этом уровень клонового разнообразия этого вида существенно превышает аналогичный показатель для других видов рода (Coboli Sbordoni et al., 1987). В результате предварительных исследований установлено, что на территории Украины *A. rosea* характеризуется высоким клоновым разнообразием. Характерно, что большинство „клонов” представлены единичными экземплярами. Кроме того, практически каждая исследованная популяция представлена своим набором клонов. Все это делает невозможным сравнительный анализ всех выявленных генетически дискретных форм на уровне экстерьерных признаков. Поэтому для установления связи варьирующих морфологических параметров с генетической структурой отдельных особей этого вида нами взята изолированная, но, тем не менее, многочисленная популяция из Национального Ботани-

ческого сада им. А. В. Фомина (г. Киев). Целью данной работы явилась оценка клонового разнообразия вида *A. rosea* в одном отдельно взятом изоляте, а также анализ генетической, кариологической и морфологической структуры особей разных клонов.

### Материал и методика

Материал собирали в весенне-осенний период 2005-2006 года. Сбор и исследование дождевых червей проводили по общепринятым методикам (Бызова и др., 1987). Всего взято 8 проб с территории ботанического сада им. А. В. Фомина (табл. 1), расположенного в центре мегаполиса. Методом биохимического генного маркирования исследовано 94 экз. дождевых червей, причем от 65 экз. получено 70 кариологических препаратов.

Хромосомные препараты готовили из тканей семенных мешков по методике воздушносухих препаратов с предварительным колхицированием животных (Ford, Hemerton, 1956), которая успешно использовалась для исследования кариотипов беспозвоночных (Thiriot-Quievreux, 1988, Викторов, 1993, Гарбар, 1998).

Методом электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле с использованием Трис-ЭДТА-боратной рН 8,5 системы буферов (Peacock, et al., 1965) в экстрактах из хвостовой части тела исследована электрофоретическая изменчивость спектров ферментов (*Aat*, *Es-1*, *Es-2*, *Es-3*, *Mdh*).

Морфологические исследования начинали на живом материале, определяя характер пигментации тела и пояска. Дальнейшие исследования проводили на фиксированных червях, у них измеряли длину тела ( $L$ ) и пояска ( $l_1$ ), расстояние от переднего конца тела до пояска ( $l_2$ ), максимальный диаметр тела за пояском ( $d$ ). С помощью лупы подчитывали общее количество сегментов ( $n_1$ ) и количество сегментов до пояска ( $n_2$ ), определяли форму головной лопасти, расстояние между щетинками, положение спинных пор и папилл, размеры и положение пояска, форму и положение пубертатных валиков. Затем определяли количество сегментов на 1 мм тела ( $n_1/L$ ), количество сегментов на 1 мм тела до пояска ( $n_2/l_2$ ), относительную длину тела ( $l_2/d$ ).

Статистическая обработка материалов осуществлялась с помощью пакета прикладных статистических программ STATISTICA 6.0.

### Результаты и обсуждение

**Клональная структура популяции.** В результате биохимического генного маркирования 94 экз. *A. rosea* обнаружено 17 клонов, что составляет 5,5 экз. на один клон. Среди выявленных клонов 9 (52,94%) представлены единичными экземплярами и еще 3 (17,7%) двумя. Таким образом, четыре массовых клона составляют 29,4% от общего числа клонов. Вместе с тем по количеству экземпляров (78 экз.) они составляют 82% от объема выборки. В пределах этих клонов количество выявленных особей

варьирует от 5 (*A. rosea-C*) до 30 (*A. rosea-B*). Распределение клонов по числу особей (рис. 1) оказалось близким к распределению редких событий ( $X = 5,5$ ;  $\sigma = 9,6$ ), то есть подчиняется стохастическим закономерностям.

Клоны *A. rosea-A* и *A. rosea-D* представлены 29 и 14 экз. соответственно. В выборках, взятых в разные сезоны, наблюдается резкое изменение клонового состава (табл. 1). Причем изменяется не только состав редких клонов, представленных единичными экземплярами, но и доминирующий клон. Так, в осенних выборках 2006 г. исчез клон *A. rosea-A* явно доминировавший в весенне-летний период.

**Кариологический анализ.** Всего 30 четких митотических метафаз были получены от 8 экз., представляющих самые распространенные клоны. От четырех экземпляров *A. rosea-A* получено 20 метафазных пластинок, в которых насчитывалось строго по 54 хромосомы. С учетом того, что базовым для червей рода *Aporrectodea* является 18 хромосом в гаплоидном наборе, то очевидно, что особи этого клона триплоидны ( $3n = 54$ ,  $NF = 108$ ). У представителей клона *A. rosea-B* получено три метафазных пластинки от одного единственного экз., который имел диплоидный набор хромосом ( $2n = 36$ ,  $NF = 72$ ). Вероятно, этот клон представлен диплоидной расой. На исследованных препаратах хромосомы триплоидной расы были несколько мельче, чем диплоидные – это может быть связано с уменьшением размеров хромосом при полиплоидии или с различиями в степени спирализации хромосом. Для клона *A. rosea-C* было получено только две метафазные пластинки от одного экземпляра, которые имели от 80 до 108 хромосом. Кратное 18 хромосом число составляет 108, а значит особи этого клона, вероятнее всего, гексаплоидные ( $6n = 108$ ,  $NF = 216$ ). У *A. rosea-D* получено пять метафазных пластинок от двух экземпляров, число хромосом в обнаруженных метафазах варьировало от 40 до 144. Кратным числом является 144, а значит предположительно особи этого клона октаплоидные ( $8n = 144$ ,  $NF = 288$ ). Варьирование числа хромосом в метафазных пластинках у клонов *A. rosea-C* и *A. rosea-D* вероятнее всего не артефакт, связанный с «потерей» отдельных хромосом при анализе, а миксоплоидией, что вполне нормально для высокоплоидных организмов.

**Анализ морфологических особенностей клонов.** Средние значения линейных параметров четырех массовых клонов *A. rosea* представлены в табл. 2. Дисперсионный анализ (LSD-тест) показал наличие достоверных отличий между ними по некоторым признакам (табл. 3). Так по диаметру тела ( $d$ , мм) удастся дифференцировать 4 пары, а по относительной толщине тела ( $l_2/d$ ) 5 клонов из шести. По другим параметрам отличий вообще не обнаружено или они соответствуют только одной паре клонов. Хорошо обособлен по исследуемым признакам клон *A. rosea-A*. Он достоверно отличается от всех других клонов по 2-5 параметрам.

Таблица 1. Представленность клонов *A. rosea* в сезонных выборках с территории Национального ботанического сада им. А. В. Фомина

Период сбора материала	Клон <i>A. rosea</i>	n
Июнь – июль 2005 года	A, B, C', D'	9
Август 2005 года	A	10
Май - июнь 2006 года	A, B, D''	13
Июль 2006 года	A, B, I, J, K, H, F, E, M	34
Сентябрь 2006 года	B, B', C', D	25
Октябрь 2006 года	D	3

Таблица 2. Линейные параметры клонов *A. rosea*

Клон	A	B	C	D
n	29	30	5	14
L, мм (M ± m)	27,14 ± 1,26	31,00 ± 0,88	31,60 ± 1,12	29,36 ± 1,09
n <sub>1</sub> (M ± m)	96,14 ± 3,52	110,03 ± 2,39	110,20 ± 3,32	104,86 ± 2,39
n <sub>1</sub> /L (M ± m)	3,60 ± 0,06	3,58 ± 0,05	3,49 ± 0,02	3,61 ± 0,08
n <sub>2</sub> /l <sub>2</sub> (M ± m)	2,86 ± 0,03	2,85 ± 0,08	2,87 ± 0,08	2,98 ± 0,05
l <sub>2</sub> , мм (M ± m)	8,19 ± 0,05	8,85 ± 0,32	8,40 ± 0,24	8,43 ± 0,14
l <sub>1</sub> , мм (M ± m)	3,28 ± 0,09	3,09 ± 0,13	3,00 ± 0,32	2,93 ± 0,22
D, мм (M ± m)	2,15 ± 0,06	1,92 ± 0,04	1,70 ± 0,12	1,71 ± 0,07
l <sub>2</sub> /D (M ± m)	3,89 ± 0,06	4,48 ± 0,11	5,00 ± 0,20	4,97 ± 0,11

Таблица 3. Достоверные отличия между клонами *A. rosea*

Выборка	L, мм	n <sub>1</sub>	l <sub>2</sub> , мм	D, мм	l <sub>2</sub> /D
<i>A. rosea</i> -A – <i>A. rosea</i> -B	**	***	*	**	***
<i>A. rosea</i> -A - <i>A. rosea</i> -C				***	***
<i>A. rosea</i> -A - <i>A. rosea</i> -D				***	***
<i>A. rosea</i> -B - <i>A. rosea</i> -C					*
<i>A. rosea</i> -B - <i>A. rosea</i> -D				*	***
<i>A. rosea</i> -C - <i>A. rosea</i> -D					

\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Таблица 4. Частота встречаемости (%) качественных признаков у клонов *A. rosea*.

Признаки	Варианты параметров	A n = 29	B n = 30	C n = 5	D n = 14
Начало пояса (сегм.)	25	100	100	100	0
	26	0	0	0	100
Конец пояса (сегм.)	31	3,45	0	0	0
	32	26,55	100	100	100
Пигментация пояса	Ярко-оранжевый	96,55	0	0	100
	Светло-оранжевый	0	100	0	0
	Не пигментирован	0	0	100	0
	красный	3,45	0	0	0
Папиллы (сегм.)	9	37,931	10	40	28,571
	9,12	3,448	36,667	0	7,143
	10,11(1),12	6,897	3,333	0	0
	9,10,11(1)	0	6,667	0	0
	9,11	17,241	0	0	0
	9,11(1), 12	6,897	0	0	0
	9, 10	13,793	3,333	0	21,429
	0	6,897	13,333	40	35,714
	10,12	3,448	6,667	0	0
	11,12	3,448	0	0	0
	12	0	16,667	20	7,143
	10(1),11,12	0	3,333	0	0

Таблица 5. Надежность дискриминации клонов *A. rosea* по разным группам признаков (по типам дискриминации)

Клоны	Тип дискриминации		
	I	II	III
A	96,55	75,86	96,55
B	96,67	60,00	93,33
C	100,00	0,00	100,00
D	100,00	57,14	100,00
В целом	97,44	61,54	96,15

I – по качественным признакам, II – по количественным признакам, III – по совокупности признаков.

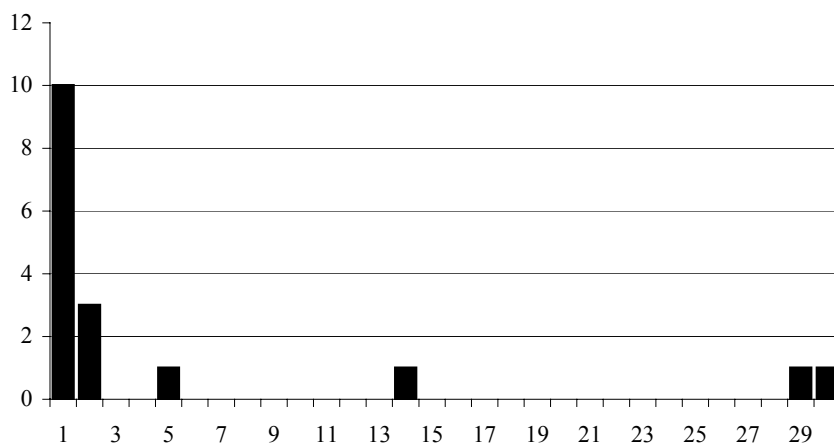


Рис. 1. Распределение клонов *A. rosea* в исследованной популяции по числу экземпляров (по оси абсцисс – число особей в пределах клона, по оси ординат - число клонов)

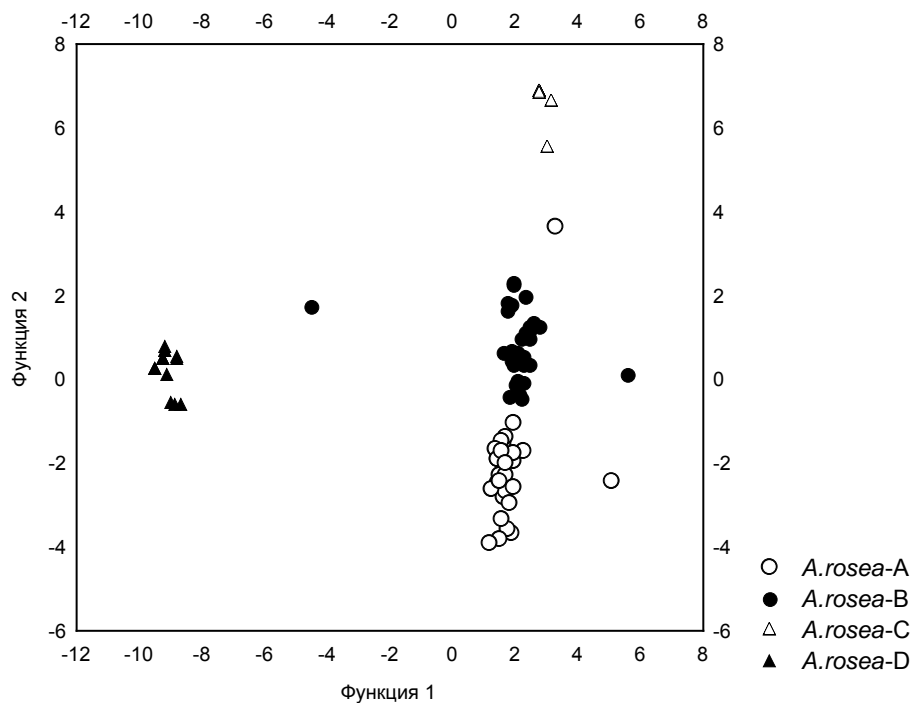


Рис. 2. Распределение исследованных клонов *A. rosea* в поле дискриминантных функций, полученным по качественным признакам.

Клоны *A. rosea*-В и *A. rosea*-С с невысоким уровнем достоверности ( $p < 0,05$ ) отличаются лишь по одному параметру. А между парой клонов *A. rosea*-С - *A. rosea*-D отличий по линейным параметрам не обнаружено. В табл. 3 представлены данные по частоте встречаемости (%) качественных параметров у сравниваемых клонов. Как видно из таблицы, положение папилл оказалось очень варибельным признаком, хотя определить закономерности их положения у разных клонов не удалось. Можно только констатировать, что у *A. rosea*-С и *A. rosea*-D этот показатель более стабильный, чем у двух других, хотя это может быть связано с меньшими размерами выборок этих клонов.

По другим признакам выявлено ряд отличий, что позволяет дифференцировать четыре исследованные клоны. Выявлено два варианта положения пояска: у клонов *A. rosea*-А, *A. rosea*-В и *A. rosea*-С он начинается с 25 сегмента, а у *A. rosea*-D – с 26 сегмента. Четыре варианта пигментации пояска распределяются между клонами так: *A. rosea*-А и *A. rosea*-D – ярко-оранжевая или иногда красная, *A. rosea*-В – светло-оранжевая, *A. rosea*-С – пигментация пояска отсутствует.

Дискриминантный анализ по набору признаков показал, что исследуемые клоны по качественным признакам на много лучше дискриминируются, чем по количественным признакам (97,44 и 61,54% соответственно). Включение в анализ совокупности признаков даже приводит к некоторому снижению точности дискриминации (96,15%) сравнительно с качественными параметрами.

Как видно с диаграммы рассеяния (дискриминантный анализ качественных признаков) (рис. 2), по первой дискриминантной функции выделяется только *A. rosea*-D. По второй дискриминантной функции в некоторой степени разделяются *A. rosea*-А, *A. rosea*-В и *A. rosea*-С. Использование других дискриминантных функций дает сходные результаты. Некоторые метки на диаграмме лежат за границами основных массивов. Возможно, что в результате более детального генети-

ческого анализа эти экземпляры могут быть разграничены генетически.

**Обсуждение.** Проведенный анализ определил высокое разнообразие клонов *A. rosea* даже в пределах локальной популяции (17 клонов), что является вполне ожидаемым, поскольку необычайно высокий уровень клонового разнообразия этого вида был отмечены в Феноскандии (Terhivuo, Saura, 1993). Такая высокая степень генетического разнообразия вида, вероятно, вызваны как полифилитичностью (происхождением от целого ряда родительских видов), так и необычайно высокой мутабельностью. Именно вследствие последнего обстоятельства большинство альтернативных генотипов представлено единичными особями. Вероятнее всего, их появление вызвано точковыми мутациями, которые должны достаточно свободно накапливаться у полиплоидных апомиктических видов.

Несмотря на ограниченное число хромосомных препаратов, полученных при анализе 65 экземпляров червей, можно говорить о том, что основные расы отличаются по степени плоидности, что также указывает на необычайно высокий уровень генетического разнообразия вида. Действительно, ведь в одном изолированном поселении встретились ди-, три- и вероятно еще несколько высокоплоидных рас.

Как выяснилось в результате анализа, значительная морфологическая гетерогенность этого вида четко коррелирует с уровнем клонового разнообразия. Практически для всех клонов обнаружены наборы признаков, позволяющие их идентифицировать. Характерно, что по качественным признакам они разграничиваются лучше, чем по совокупности линейных параметров. Доминирующие клоны изменяются в разные сезоны года, вероятно, потому что их морфологическая индивидуальность в значительной степени обусловлена не только генетическими особенностями, но и экологическими предпочтениями, в частности, к степени влажности почвы.

1. Булатова Н. Ш., Викторов А. Г., Перель Т. С. Экологическая неоднородность полиплоидных видов дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae) на примере *Eisenia nordenskioldi* (Eisen) // Докл. АН СССР. -1984. -Т. 278, №4. -С. 1020-1021.
2. Бызова Ю. Б., Гуляров М. С. и др. Количественные методы в почвенной зоологии. М.: Наука, 1987. – 288 с.
3. Викторов А.Г. Разнообразие полиплоидных рас в семействе дождевых червей Lumbricidae // Успехи современной биологии. – 1993. – 113, вып. 3. – С. 304-312.
4. Гарбар А.В. Кариотип *Lymnaea auricularia* (Gastropoda, Pulmonata, Lymnaeidae) из Центрального Полесья // Вестн. зоологии. - 1998. – 32, №5-6 – С. 137-138.
5. Coboli Sbordoni M., de Matthaeus E., Omodeo P., Bidoli R., Rodino E. Allozyme variation and divergence between diploid and triploid populations of *Allobophora caliginosa* (Lumbricidae: Oligochaeta) // On earthworms /A.M. Bomvicini Pagliai, P. Omodeo (eds.) / Selected Symposia and Monographs. – Modena: Mucchi, – 1987. – P. 53-74.
6. Ford R., Hamerton J.L. A colchicines hipotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes // Stain Technology. – 1956. – 31, N 6. – P. 247-251.
7. Muldal S. The chromosomes of the earthworms I. The evolution of polyploidy // *Heredity*. - 1952 - 6: 55–76.
8. Omodeo P. Caryology of the Lumbricidae // *Caryologia*. - 1952. – 4. – P. 173-275.
9. Omodeo P. Cariologia dei Lumbricidae. II. Contributo // *Caryologia*. - 1955. – 8. – P. 135-178.
10. 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.
11. Terhivuo J., Saura A. Genic and morphological variation of the parthenogenetic earthworm *Aporrectodea rosea* in southern Finland (Oligochaeta, Lumbricidae) // *Ann. Zool. Fenneci*. –1993. – 30. – P. 215-224.
12. Thiriot-Quievreux C. Chromosome studies in pelagic Opisthobranch molluscs // *Can. J. Zool.* – 1988. – 66. – P. 1460-1477.
13. Vedovini A. Systematique, caryologie et ecologie des Oligochetes Terrestres de la Region Provencale. M.D. These. Nat. Univ. Provence. - 1973. – 150 p.

Отримано: 2 лютого 2007 р.

Прийнято до друку: 24 лютого 2007 р.