

УДК 594.38:574.5:575

Гарлінська Алла,
кандидат біологічних наук, доцент, завідувач кафедри
медико-біологічних дисциплін
Житомирський державний університет імені Івана Франка

АЛОЗИМНИЙ АНАЛІЗ МОЛЮСКІВ ПІДРОДИНИ PHYSINAE

Генетичні методи дослідження відіграють вагомую роль у вирішенні багатьох проблем систематики. Серед інших характеристик, які використовуються в систематиці, часто генотип виявляється тим параметром, який вказує на репродуктивну ізоляцію, котра має місце між окремими видами. Генотип є найбільш сталою систематичною ознакою, яка дозволяє виявити міжпопуляційні та видові відмінності у дуже близьких за фенотипами видів.

Матеріалом для алозимного аналізу слугували сім видів пухирчикових, зібрані у водоймах і водотоках України. Для електрофоретичного аналізу використовували водний екстракт гомогенатів тіл молюсків (без черепашки). Здійснювали електрофоретичний аналіз таких ферментів:

аспартатамінотрансфераза (*Aat*), малатдегідрогеназа (*Mdn*), супероксидисмутаза (*Sod*) і неспецифічні естерази. Його проводили 7,5%-ому в поліакриламідному гелі і тріс-ЕДТА боратної рН 8,5 системі буферів [7]. Електрофорез перших трьох ферментів відбувався протягом 2,5, останнього – 1,5 год. Зафарбовування гелів здійснювали за стандартними гістохімічними методиками, адаптованими для зафарбовування гелів [5].

Алозимна мінливість *Physella acuta*.

Результати електрофоретичного аналізу свідчать про те, що за згаданих вище умов електрофорезу в гель входили тільки розчинні форми ферментів – аспартатамінотрансферази (*Aat*), малатдегідрогенази (*Mdh*), супероксидисмутази (*Sod*), які відповідно кодуються мономорфними у виду локусами *Aat-1*, *Mdh-1* і *Sod-1*.

Неспецифічні естерази представлені серією принаймі з шести локусів (рис. 1), два з яких є поліморфними і мають чітку двохалельну генетичну інтерпретацію (рис. 1).

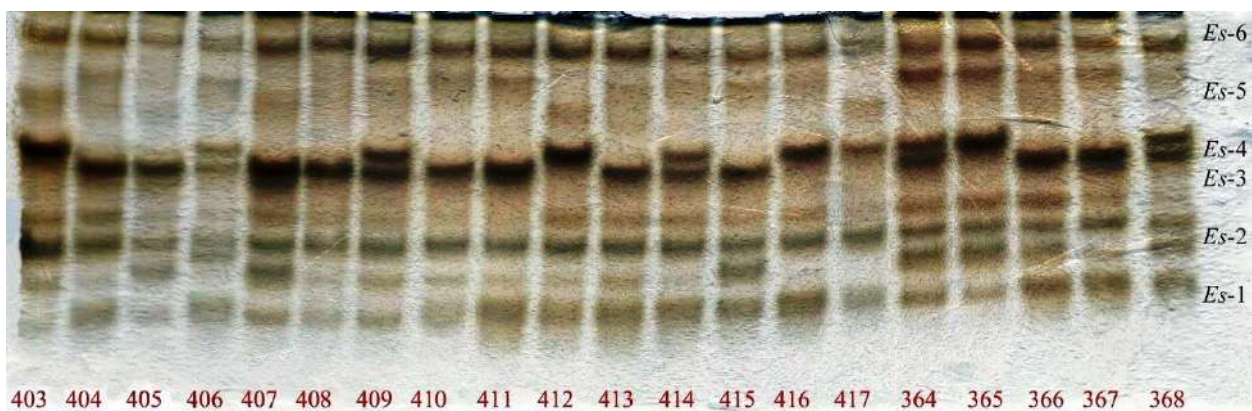


Рис. 1. Мінливість спектрів неспецифічних естераз у популяціях *Phys. acuta* (№№ 403-417 Сіверський Донець, Станично-Луганське Луганської обл., №№ 364-369 – Нижній Дністер, Маяки Одеської обл.).

Примітка. Особини №№ 403, 412, 416-417 і 365 інтерпретовані як гомозиготи $Es-4^{bb}$; № 406, 409, 414, 364 і 368 – як гетерозиготи $Es-4^{ab}$, останні як гомозиготи $Es-4^{aa}$. Особини 405, 407, 415, 364-366 і 368 визначені як гетерозиготи $Es-2^{ab}$, останні – як гомозиготи $Es-2^{bb}$.

Розподіл генотипів за цими двома локусами відповідає закону Харді-Вайнберга, що є свідченням панміктичності популяцій цього виду.

В узагальненій сукупності усіх вибірок спостерігався явний дефіцит гетерозигот за локусом *Es-4*, що цілком могло бути пов'язане з ефектом Валлунда, оскільки популяції достовірно відрізнялися за частотами алелей.

Тоді як за локусом *Es-2* ні в жодній з вибірок, узятих окремо, ні за їх сукупності не виявлено відхилень у спостережуваних розподілах генотипів від закону Харді-Вайнберга.

Зіставлення географічних популяцій цього молюска показало, що за всіма мономорфними локусами (*Aat-1*, *Mdh-1*, *Sod-1*, *Es-1*, *Es-3*, *Es-5*, *Es-6*) в усіх популяціях має місце фіксація одного і того ж алеля, а за поліморфними локусами *Es-2*, *Es-4* досліджені популяції достовірно відрізняються. Причому спрямованість за двома локусами багато в чому співпадає. До популяцій, де частоти алелей *Es-4^a* і *Es-3^b* були відносно незначними, належать регіони Нижнього Дунаю, Нижнього Дністра і р. Салгир. До вибірок, у яких ці алелі були фіксованими або виявлялися близькими до цього стану, слід віднести популяції з водойм-охолоджувачів Южноукраїнської АЕС і з каналу Дніпро-Донбас. Популяції з Миколаївського водосховища і з Сіверського Дінця мали проміжні значення частот алелей цих локусів.

Очевидно, що ці невинуваткові відмінності в частотах алелей поліморфних генів відбивають історію розселення виду, але все ж таки у взятому географічному масштабі і числі вибірок вони недостатні для того аби можна було сформулювати якусь стійку тенденцію.

Алозимна мінливість *Physa fontinalis s. lato*

Проведений електрофоретичний аналіз показав, що за даних умов електрофорезу ферменти аспартатамінотрансфераза, малатдегідрогеназа, супероксидисмутаза є мономорфними і представлені інваріантними спектрами, що відповідають локусам *Aat-1*, *Mdh-1* і *Sod-1*.

При цьому неспецифічні естерази представлені, як мінімум, чотирма фракціями, котрі відповідають чотирьом передбачуваним поліморфним локусам

(рис. 2), причому тільки один з них – *Es-3* має досить чітку алельну інтерпретацію.

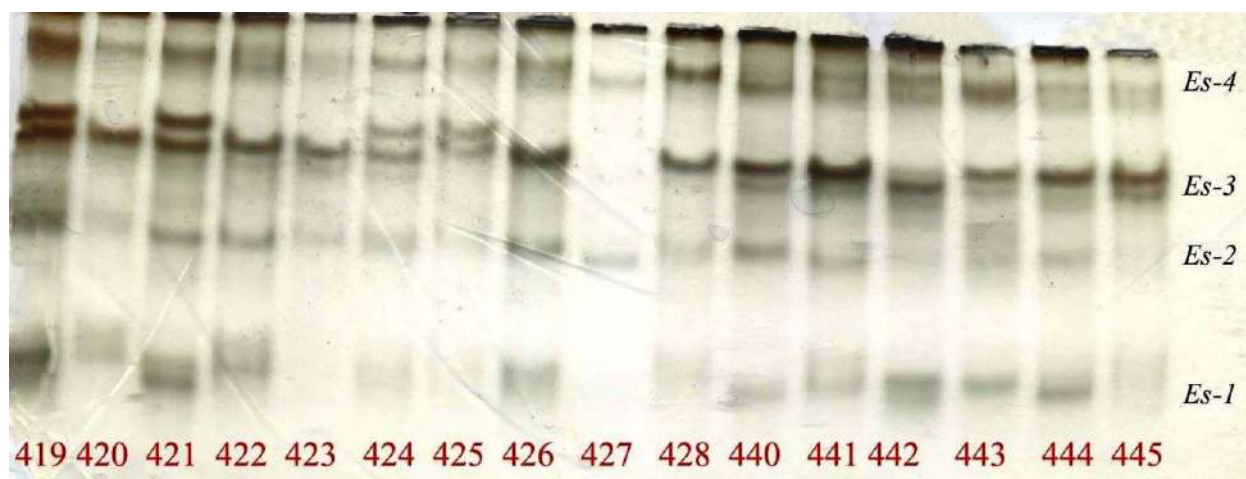


Рис. 2. Мінливість спектрів неспецифічних естераз у популяціях *Ph. fontinalis s. lato* (№№ 419-428 – р. Самара, Дмитрівка Дніпропетровської обл., №№ 440-445 – р. Ворскла, Охтирка Сумської обл.). Особини №№ 419-420, 428, 441-442, 444-445 за морфологічними ознаками ідентифіковані як *Ph. adversa*, а останні – як *Ph. fontinalis s. str.*

Примітка. Особини №№ 419, 421, 424 інтерпретовані як гомозиготи *Es-3^{ac}*; 425 – як *Es-3^{ac}* і 426 як *Es-3^{ab}*, 409, 414, 364 і 368 як гетерозиготи *Es-3^{ab}*, останні як гомозиготи *Es-3^{aa}*; особина № 442 як гомозигота *Es-3^{a'a'}*, всі інші – як гомозиготи *Es-3^{aa}*.

Зіставлення розподілу генотипів, а також отримані на цій основі частоти алелей локусу *Es-2* не дають підстав для того, щоби вважати, що у симбіотопічно мешкаючих видів *Ph. adversa* і *Ph. fontinalis* є стійкі генетичні відмінності, які повинні були би спостерігатися у репродуктивно ізольованих видів у місцях їх спільного проживання.

Крім того, дані частот алелей цього локусу, узагальнені по усіх досліджених популяціях цих двох передбачуваних видів, не дають достовірних відмінностей, і це за тієї умови, що особини так званого виду *Ph. adversa* частіше зустрічаються на Лівобережжі. Це означає, що в мінливості частот алелей у різних видів не можна виключити вплив географічного чинника.

Відзначено відсутність відмінностей у спектрах між особинами цих двох видів і за іншими локусами, що також дає можливість вважати, що ці два симбіотопічних «види» насправді ж є крайніми варіантами мінливості одного і того ж виду.

Розрахунки спостережуваних і очікуваних розподілів генотипів найчисельніших за об'ємом вибірок цього виду показали, що на відміну від популяцій *Phys. acuta* у нього часто має місце достовірний дефіцит гетерозигот і надлишок гомозигот. З урахуванням небагаточисельності цього виду молюска в широкому розумінні, розрідженість його популяцій і малорухомий спосіб життя вказують на можливість часткового самоzapлiднення і навіть факультативного партеногенезу. І в тому, і в іншому випадку наслідком для структури популяцій саме і є достовірне зниження представленості гетерозиготних особин. Симптоматично, що для близького американського виду *Phys. heterostropha* також характерним є дефіцит гетерозигот у популяціях [4]. Ця обставина підтверджує можливість автоміксису в цій групі молюсків.

Ще два «види» *Ph. bulla* і *Ph. Skinneri*, були виявлені окремими поселеннями.

Електрофоретичний аналіз особин першого виду проведений у порівнянні з особинами *Ph. adversa* і *Ph. fontinalis* із цього ж географічного регіону. Зокрема, наймінливіший і мультилокусний спектр неспецифічних естераз (рис. 3) показав відсутність чітких відмінностей, які могли би бути інтерпретованими як фіксації альтернативних алелей або генотипів. Це дає можливість на сучасному рівні знань вважати *Ph. bulla* синонімічною *Ph. fontinalis*.

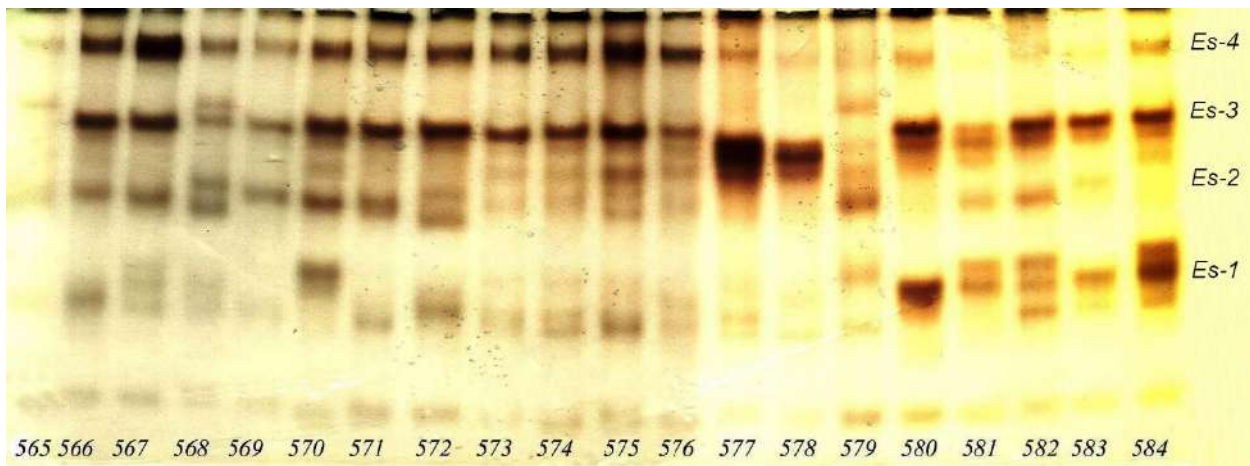


Рис. 3. Мінливість спектрів неспецифічних естераз у припущених «видів»: №№ 565-576 – *Ph. bulla*; 577-578 – *Ph. fontinalis* (р. Олешня, Олешня Сумської обл.); 579 – *Ph. adversa* (р. Крюків, Смичин Чернігівської обл.); 580 – *Ph. adversa* (р. Уда, Нова Баварія Харківської обл.); 581-584 – *Ph. fontinalis* (р. Уда, Нова Баварія Харківської обл.).

Що стосується *Ph. skinneri*, то мінливість спектрів неспецифічних естераз у цього виду незвичайно висока. При цьому спостерігаються і відмінності у рухливості фракцій (рис. 4), що, очевидно, відбиває специфічність алельного складу локусів, що кодуються цими ферментами. Не менш цікавою є і та обставина, що кожна особина мала свій тип електрофореграми. Подібна ситуація характерна для так званих гіперваріабельних поліклонових партеногенетичних видів, коли кожна особина характеризується своїм особливим типом спектрів, перш за все, неспецифічних естераз [1-3]. Очевидно, що такі відмінності дають усі підстави вважати, що в даному випадку цілком доречним вважати *Ph. skinneri* або окремим аловидом, який представляє регіон Закарпаття (слід звернути увагу на те, що в Закарпатті не виявлено *Ph. fontinalis* s. lato), або особливою партеногенетичною і можливо поліплоїдною формою. Тим паче, що партеногенез у червононогих прісноводних молюсків – явище досить поширене, причому зустрічається він у них у формі факультативного партеногенезу [6].

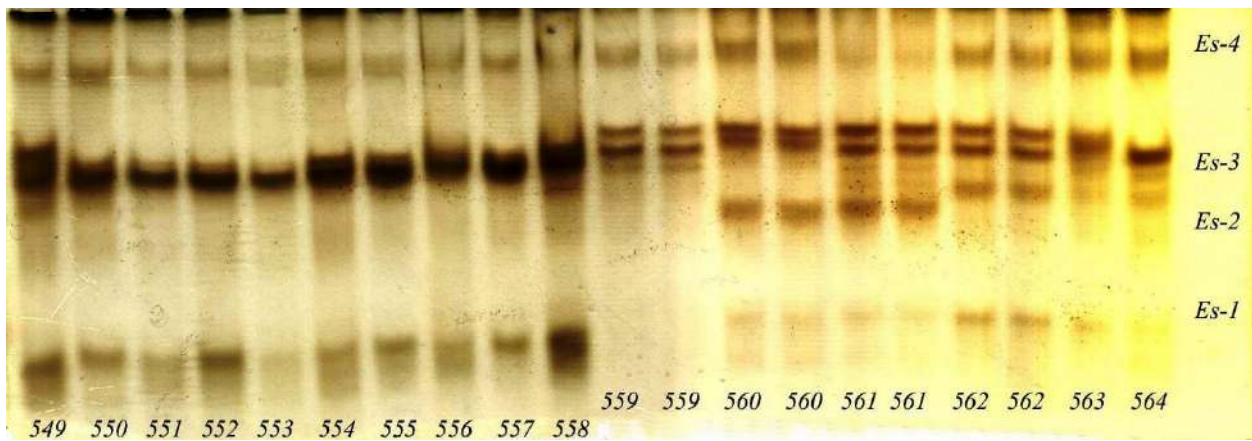


Рис. 4 Мінливість спектрів неспецифічних естераз у припущених «видів»: №№ 549-558 – *Ph. fontinalis* (р. Серет, Тернопіль); 559-564 – *Ph. skinneri* (р. Латориця, Закарпатської обл.).

Проведене біохімічне генне маркування дає основу для наступних висновків. *Phys. acuta* – амфіміктичний вид, популяції якого в досліджуваному регіоні різняться частотами алелей. Для *Ph. fontinalis* s. lato, представленого в даному дослідженні чотирима видами у вузькому розумінні, характерною є амфіміктичність. При цьому *Ph. adversa* і *Ph. bulla* можна розглядати як синоніми *Ph. fontinalis*, а виду *Ph. skinneri*, ймовірно, доведеться надати окремий таксономічний статус, що, однак, вимагає проведення у подальшому додаткових досліджень.

Список використаних джерел та літератури

1. Коцюба И. Ю. Межжерин С. В., Жалай Е. И., Гарбар А. В. Пloidность и клоновая структура популяций партеногенетического вида *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826) (Lumbricidae) в пределах Украины. *Биологический альманах*. 2010. Вып. 14. 110–119.
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 *Доповіди НАНУ*. 2007. №8. С.151–156.
3. Межжерин С. В., Коцюба И. Ю., Жалай Е. И., Гарбар А. В. Генетическая структура популяций партеногенетического дождевого червя *Eiseniella tetraedra*

(Savigny, 1826) в естественной и урбанизированной среде обитания. *Наукові записки Ужгородського ун-ту*. 2010. Вип. 28. С. 175–179.

4. Dillon R. T. The biogeography of sea Islands: clues from the population genetics of the freshwater snail *Physa heterostropha* / R. T. Dillon, A. R. Wethington // *Syst. Biol.* – 1995. – 44. 3. – P. 400–408.

5. Harris H., Hopkinson D. A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam: North-Holland, 1976. 257 p.

6. Johnson S. G., Leefe W. R. Clonal diversity and polyphyletic origins of hybrid and spontaneous parthenogenetic *Comeloma* (Gastropoda: Viviparidae) from the south-eastern United States. *J. Evol. Biol.* 1999. 12. P. 1056–1068.

7. Peacock F. C., Bunting S. L., Queen K. G. Serum protein electrophoresis in acrilamye gel patterns from normal human subjects. *Science*. 1965. Vol. 147. – P. 1451–1455.