

Vestnik zoologii, 44(3): 195–207, 2010

УДК 575.17:595.14 (477)

КРИПТИЧЕСКИЕ БИОТИПЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ, *OCTOLASION LACTEUM* (OLIGOCHAETA, LUMBRICIDAE), В УКРАИНЕ

С. В. Межжерин¹, И. П. Онищук², А. В. Гарбар², Е. И. Жалай¹

¹Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины,
ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев, 01601 Украина
E-mail: mezh@izan.kiev.ua

²Житомирский государственный университет им. И. Франко,
ул. Б. Бердичевская, 40, Житомир, 10002 Украина
E-mail: saguaroklub@mail.ru

Получено 4 ноября 2009

Принято 25 марта 2010

Криптические биотипы дождевого червя *Octolasion lacteum* (Oligochaeta, Lumbricidae) в Украине. Межжерин С. В., Онищук И. П., Гарбар А. В., Жалай Е. И. — Биохимическое геномное маркирование, дополненное данными по кариологии и морфологической изменчивости, популяций дождевого червя *Octolasion lacteum* Örley, 1885 (= *tyrtaeum* Savigny 1826), выполненное на территории Украины, выявило не менее 19 криптических биотипов, разной степени генетической дифференциации. В Северной и Центральной Украине доминируют две генетически полиморфные симбиотопичные формы, на которые приходится около 90% исследованных особей и которые отличаются фракциями неспецифических эстераз. Для них характерен субтриплоидный набор хромосом ($2n + x = 38$) и аномальный сперматогенез, протекающий при числе хромосом меньше гаплоидного, особи этих форм рознятся размерами и некоторыми пропорциями тела. Кроме того, здесь же, главным образом, единичными экземплярами встречается не менее 10 субтриплоидных возможно партеногенетических форм. На юге Украины обнаружены исключительно клоновые формы, имеющие, как показал кариологический анализ червей Крыма, триплоидную структуру генома ($3n = 54$).

Ключевые слова: дождевые черви, *Octolasion lacteum* (= *tyrtaeum*), аллозимы, кариотипы, сперматогенез, клоны.

Cryptic Biotypes of Earthworm *Octolasion lacteum* (Oligochaeta, Lumbricidae) in Ukraine. Mezhzhherin S. V., Onyschuk I. P., Garbar A. V., Zhalay E. I. — Biochemical gene marking of earthworm *Octolasion lacteum* Örley, 1885 (= *tyrtaeum* Savigny 1826) population with data on karyology and morphological variability helped to find out at least 19 cryptic biotypes at different genetical differentiation on the territory of Ukraine. In the northern and central parts of Ukraine two genetically polymorphic symbiotopic forms dominate. They make 90% of the investigate individuals and differ in fraction of nonspecific esterases. They are characterized with subtriploid set of chromosomes ($2n + x = 38$) and anomalous spermatogenesis going with chromosome number less than haploid and differ in size and some body proportions. Also on this territory mainly as rare individuals at least ten subtriploid, probably parthenogenetic, forms were found. In the south of Ukraine only clone forms with triploid ($3n = 54$), according to karyological analysis of earthworms in the Crimea, genome structure were found.

Key words: earthworms, *Octolasion lacteum* (= *tyrtaeum*), allozyme polymorphism, karyotypes, spermatogenesis, clones.

Введение

Палеарктический вид дождевых червей *Octolasion lacteum* Örley, 1885, который в англоязычной литературе обычно именуют *O. tyrtaeum* Savigny 1826, широко расселился по всему миру. На начало

70-х гг. его ареал охватывал Европу, Северную и Южную Америку, Африку и Австралию. Такой обширной экспансии, как считается (Перель, 1982), способствовало партеногенетическое размножение.

Облигатный партеногенез, встречающийся у дождевых червей, в большинстве случаев относится к аутомиктическому типу, для которого характерно премейотическое удвоение хромосом. Эта форма партеногенеза функционально эквивалентна апомиксису и известна у полиплоидов. Единственное исключение — диплоидный *O. lacteum* (Muldal, 1952). По данным С. Мюльдаля (Muldal, 1952), в Великобритании *O. lacteum* — облигатно партеногенетический диплоид ($2n = 38$). В Италии обнаружены триплоидная ($3n = 54$) и предположительно тетраплоидная ($4n = 72$) партеногенетические формы (Omodeo, 1955). Поскольку базовое число хромосом в этом случае — $n = 18$, то этот автор считает, что диплоидная форма ($2n = 38$) на самом деле является субтриплоидом. Однако конкретные механизмы уменьшения количества хромосом не рассматриваются. Кариологическое исследование особей этого вида с территории Украины (Гарбар, Онищук, 2007) показало, что черви диплоидны ($2n = 38$) при некоторых особенностях их кариотипа: гетероморфизме первой пары хромосом и аномальном сперматогонииальном мейозе, протекающем при числе хромосом меньше гаплоидного набора.

В результате электрофоретических исследований популяций этого вида на территории восточных штатов США была доказана клоновая организация его популяций. При этом около 90% из примерно 2000 исследованных экземпляров принадлежали двум массовым, часто симпатричным клонам (Jaenike et al., 1980; Jaenike, Selander, 1979, 1985), которые имели достаточно четкие отличия по длине тела, а на шесть остальных приходилось всего около 10% исследованных особей. Исследование структуры ДНК *O. lacteum* из Германских и Канадских популяций (Heethoff et al., 2003) также показало наличие двух генетически дискретных линий, отличающихся размерами тела. Похожие, но все же отличающиеся результаты были получены при анализе генетической структуры маргинальных популяций Восточной Феноскандии (Terhivuo, Sauga, 1993). На 238 исследованных животных было идентифицировано 24 клона, при этом пять массовых клонов составляли 74% общего количества особей.

Учитывая изложенные особенности *O. lacteum*, а также возможность обнаружения его клоновых рас на территории Украины целесообразным является комплексное исследование дождевых червей этого вида с привлечением кариологических, электрофоретических и морфологических методов.

Материал и методы

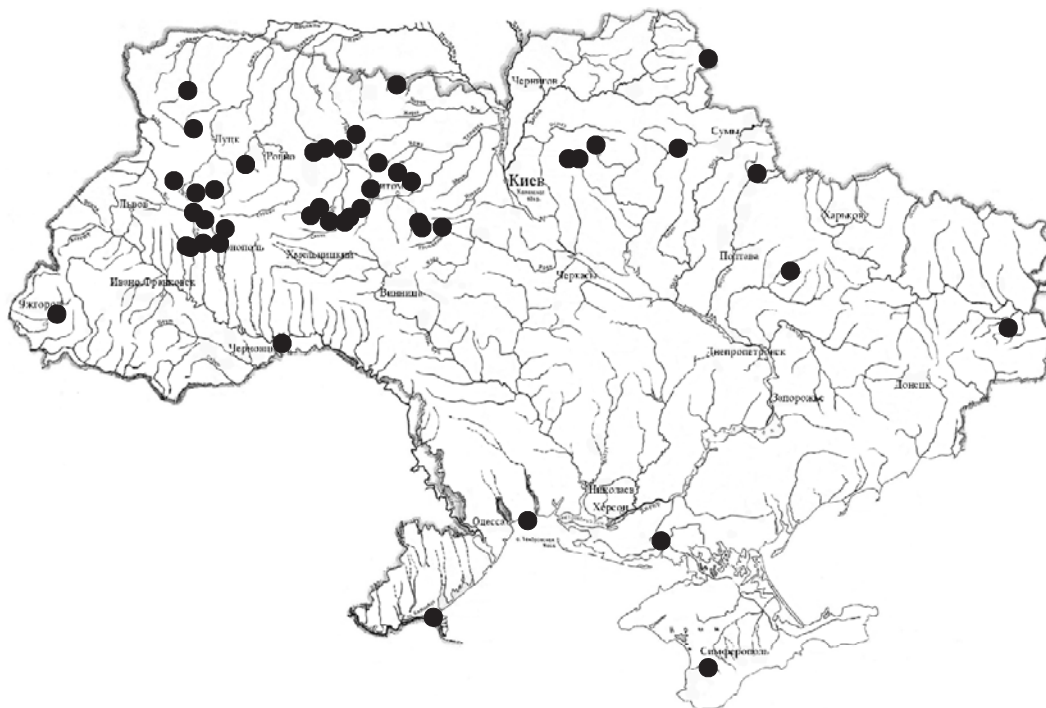


Рис. 1. Места сбора материала.

Fig. 1. Places of collecting material.

Материал для исследований взят в весенне-осенний период 2006–2008 гг. Сбор и исследование дождевых червей проводили по общепринятым методикам (Бызова и др., 1987). Всего с территории Украины проанализировано 50 выборок (рис. 1).

Для биохимического генного маркирования и морфологических исследований использовано 655 экз. дождевых червей, идентифицированных по морфологическим признакам как *O. lacteum*, причем от 75 экз. получены кариологические препараты пригодные для анализа.

Методом электрофореза в 7,5%-ном полиакриламидном геле с использованием ТРИС-ЭДТА-боратной pH 8,5 системы буферов (Peacock et al., 1965) в экстрактах из хвостовой части тела исследована электрофоретическая изменчивость спектров ферментов аспаратаминотрансферазы (*Aat*), малатдегидрогеназы (*Mdh*), неспецифических эстераз (*Es*) и супероксиддисмутазы (*Sod*).

Препараты хромосом готовили из семенных мешков по методике, которая ранее успешно использовалась нами для исследования кариотипов дождевых червей (Гарбар, Онищук, 2007; Garbar, Vlasenco, 2007). Животным делали инъекцию 0,1%-ного колхицина за 19 ч до вскрытия. Семенные мешки извлекали и гипотонировали 60 мин в дистиллированной воде. Материал фиксировали в смеси 96%-ного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Из фиксированного материала готовили хромосомные препараты методом отпечатка (Ситникова и др., 1991). Высушенные препараты окрашивали в течение 10 мин в 10%-ном растворе азур-эозина по Романовскому, приготовленном на 0,01M-ом фосфатном буфере (pH 6,8). Исследовали препараты с помощью микроскопа «Микмед» (ок. 10, об. 90). Форму хромосом определяли в соответствии с классификацией А. Левана с соавторами (Levan et al., 1961). На основании промеров хромосом (общая длина хромосомы, длина короткого и длинного плеч) рассчитывали центромерный индекс ($I^c = \text{длина короткого плеча} / \text{длина хромосомы} \times 100\%$), определяли длину набора (TCL) и относительную длину хромосом ($L^r = \text{общая длина хромосомы} / \text{TCL} \times 100\%$).

Морфологические исследования начинали на живом материале, определяя характер пигментации тела и пояска. Дальнейшие исследования проводили на фиксированных червях, у которых измеряли длину тела (*L*), переднего конца тела (*l1*), пояска (*l2*), максимальный диаметр тела за пояска (*D*). С помощью лупы подчитывали общее количество сегментов (*n1*) и количество сегментов до пояска (*n2*), определяли форму головной лопасти, расстояние между щетинками, положение первой спинной поры и папилл, размеры и положение пояска, форму и положение пубертатных валиков. В качестве признаков использовали относительную длину одного сегмента всего тела ($L/n1$), а также относительную длину одного сегмента до пояска ($l1/n2$). Кроме того, рассчитывали ряд индексов, характеризующих пропорции тела.

Статистически обработан материал с помощью пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0.

Результаты

Биохимическое генное маркирование

Локусы *Aat-1* и *Sod-1*, кодирующие соответствующие ферменты, при данных условиях электрофореза были мономорфными. Тогда как спектры *Mdh* и неспецифических эстераз (*Es-1*, -2, -3, -4, -5, -6) были изменчивыми. По характеру полиморфизма локусов этих двух ферментных систем на территории Украины можно выделить не менее 18 криптических форм *O. lacteum*, отличающихся фиксациями альтернативных аллелей в разных сочетаниях (рис. 2). При этом количество особей этих генетических форм было крайне неравномерным и их распределение (рис. 3) характеризовалось явной перерасеянностью ($M = 31,9$; $St.-Dev. = 103$).

На две самые многочисленные формы пришлось 86% исследованных особей. При этом, судя по полиморфизму локуса *Es-4* (рис. 2), они не имеют клоновой структуры.

Форма *O. lacteum-A* составила 72% исследованных особей, обнаружена практически во всех выборках лесной и лесостепной природных зон Украины (рис. 4). Причем, за редким исключением особи этого биотипа в выборках численно преобладали. Полиморфным оказался локус *Es-4*, который представлен двумя аллелями, образующими соответственно три генотипа. Проверка наблюдаемого распределения генотипов этого локуса на соответствие ожидаемому показала, что имеется четкая тенденция к дефициту гетерозигот, которая находит отражение в смещении индекса фиксации *Fis*, отражающего степень инбредности в популяциях (рис. 5). Причем в выборках западного региона

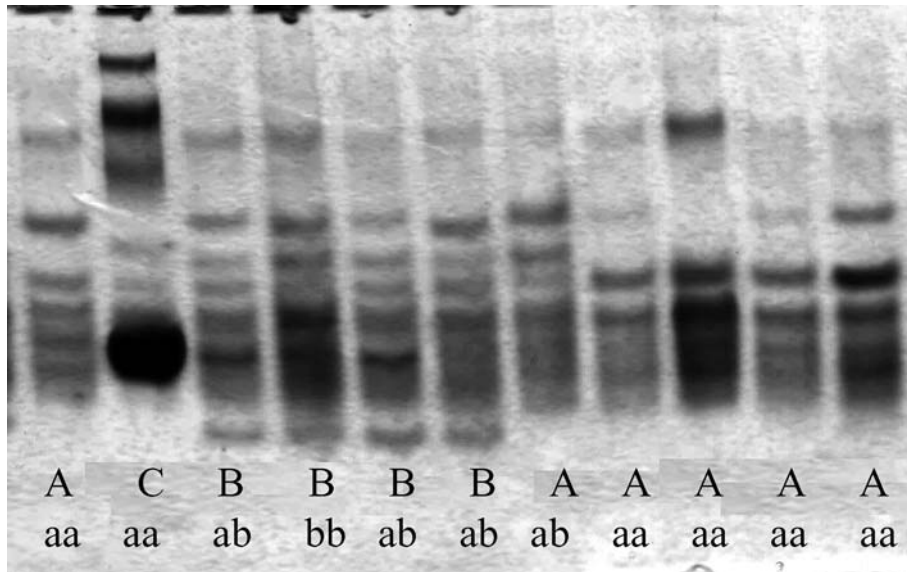


Рис. 2. Изменчивость спектров неспецифических эстераз в популяциях *O. lacteum*: A, B, C — генетические формы (биотипы); aa, ab, bb — генотипы по локусу *Es-4*. Старт сверху.

Fig. 2. Variation of nonspecific esterases spectra in *O. lacteum* populations: A, B, C — genetic forms; aa, ab, bb — *Es-4* locus genotypes. Start above.

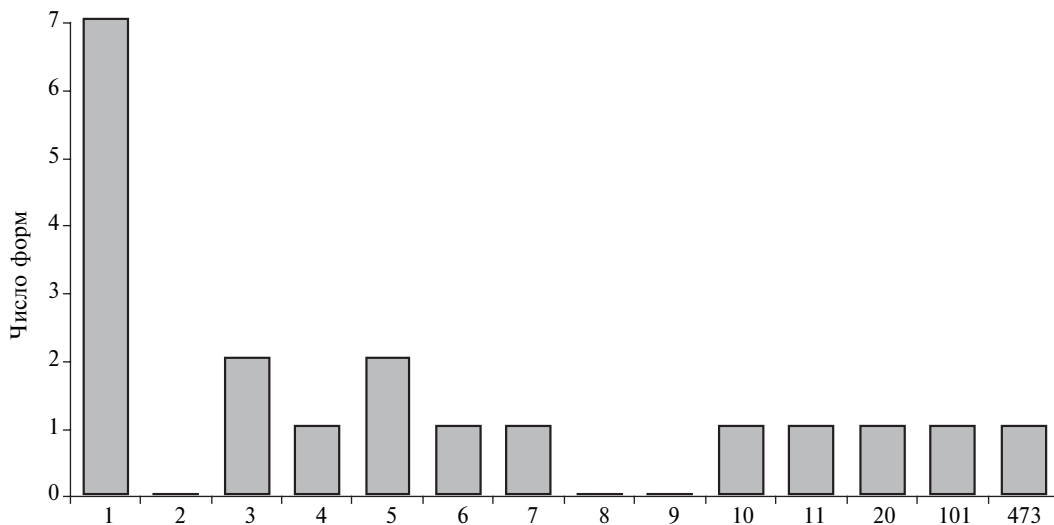


Рис. 3. Распределение биотипов *O. lacteum* по числу особей.

Fig. 3. Distribution of *O. lacteum* biotypes by the number of individuals.

(Волынской, Ровенской, Львовской, Ивано-Франковской, Тернопольской, Винницкой и Хмельницкой областей), в которых насчитывалось от 20 особей и более, ожидаемые и наблюдаемые распределения большей частью соответствовали друг другу, тогда как восточнее — в Житомирской, Черниговской, Сумской и Черкасской областях обнаружена четкая тенденция дефицита гетерозигот. В результате в обобщенной выборке червей этого биотипа, из которой исключены выборки, в которых локус *Es-4* мономорфен (окр. с. Червоное Львовская обл., Ивано-Франковская, Хмельницкая, Полтавская и Харьковская области), выявлен высоко достоверный дефицит гетерозигот ($Es-4^{aa} = 250 (232,2)$; $Es-4^{ab} = 71 (106,5)$; $Es-4^{bb} = 30 (12,2)$; $\chi^2 = 39,07$; $p < 0,001$). Конечно, проведенный

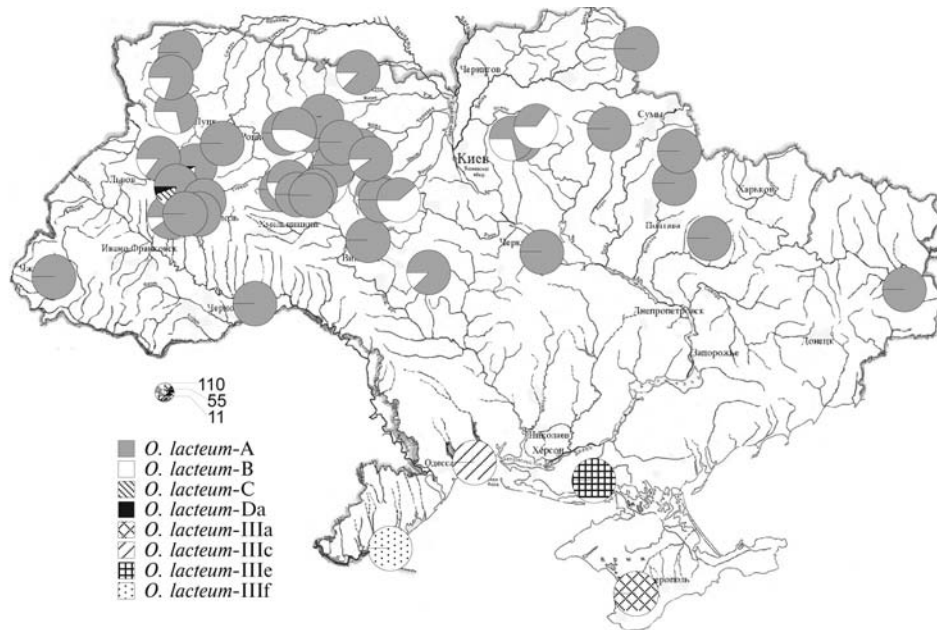


Рис. 4. Географическое распределение самых массовых биотипов *O. lacteum*. Биотипы: *O. lacteum*-A, *O. lacteum*-B, *O. lacteum*-C, *O. lacteum*-Da—субтриплоиды, а *O. lacteum*-IIIa, *O. lacteum*-IIIc, *O. lacteum*-IIIe, *O. lacteum*-IIIf — триплоиды.

Fig. 4. Geographical distribution of the most widespread biotypes of *O. lacteum*. Biotypes: *O. lacteum*-A, *O. lacteum*-B, *O. lacteum*-C, *O. lacteum*-Da are subtriploids; *O. lacteum*-IIIa, *O. lacteum*-IIIc, *O. lacteum*-IIIe, *O. lacteum*-IIIf are triploids.

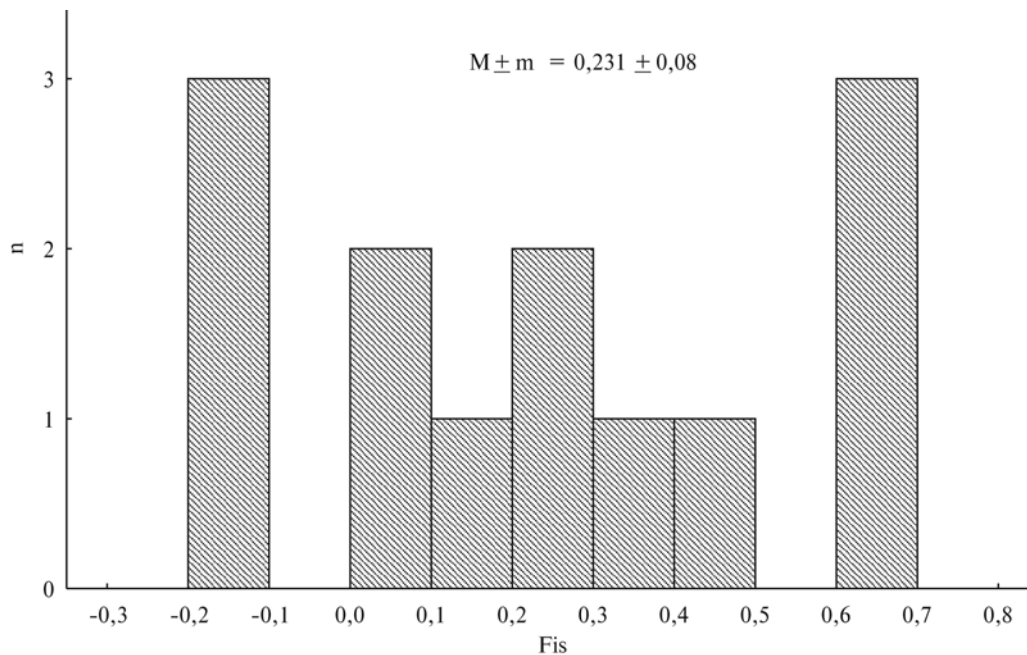


Рис. 5. Распределение значений коэффициента инбридинга особей (Fis) в популяциях биотипа *O. lacteum*-A. Расчет коэффициента проведен по формуле: $Fis = 1 - (H_o/H_e)$, где H_o и H_e — наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно. Сдвиг в сторону положительных значений отражает дефицит гетерозигот.

Fig. 5. Distribution of inbreed coefficients (Fis) in populations of *O. lacteum*-A. Calculations realized accordingly to formula: $Fis = 1 - (H_o/H_e)$, where H_o и H_e — observed and expected heterozygosities. A change toward positive values reflects the deficit of heterozygotes.

расчет несколько условен, поскольку базируется не на единой популяции, а на совокупности разрозненных, однако с учетом общей тенденции избытка гетерозигот, наблюдаемой в ряду выборок, такая экстраполяция может считаться вполне приемлемой.

Вторая по численности форма (*O. lacteum*-В), составившая 15,4% особей, обитает совместно с формой *O. lacteum*-А. При этом никаких особых географических предпочтений в пределах Украины в ее распространении не наблюдается, хотя эта форма чаще встречается в городах и населенных пунктах. Так, в Ружине, Нежине и Любаре она даже преобладает по численности над *O. lacteum*-А. Возможно биотип *O. lacteum*-В имеет синантропную природу, а потому для Украины его можно считать инвазионным. Незначительный объем выборок этого биотипа не позволяет проводить анализ распределения биотипов в каждой из изученных популяций. Однако отсутствие различий популяций по частотам аллелей (у данной формы в отличие от предыдущей преобладает аллель $Es-4^b$) позволяет подсчитать теоретическое распределение генотипов для обобщенной выборки. И в данном случае имеет место отклонение от равновесного распределения, но только в сторону избытка гетерозигот ($Es-4^{aa} = 3$ (10,7); $Es-4^{ab} = 57$ (41,7); $Es-4^{bb} = 33$ (40,6); $\chi^2 = 21,93$ $p < 0,001$).

Совместно с упомянутыми выше формами единично или небольшими сериями встречались особи, четко диагностировавшиеся по спектрам неспецифических эстераз (рис. 2) и малатдегидрогеназы. Так, в окр. с. Червоне Львовской обл. отмечены сразу три биотипа. Наряду с самым массовым *O. lacteum*-А, здесь отмечены *O. Lacteum*-С (11 экз.), а также *O. Lacteum*-D (6 экз.). Причем две последние подобно клоновым формам характеризовались стабильно инвариантными спектрами. Остальные биотипы встречались единичными экземплярами и были, как бы, вкраплены в выборки *O. Lacteum*-А. Всего же редких биотипов в северном регионе можно насчитать не менее 11. Особенно следует подчеркнуть факт того, что эти, на первый взгляд, внешне не отличающиеся, но генетически дискретные формы червей обитают совместного, а это доказывает, что между ними существует репродуктивная изоляция, которая может быть как сугубо биологической, так и обусловленной партеногенезом. Хотя промежуточный характер спектров у некоторых особей, в частности нахождение по одному такому экземпляру в гг. Ковеле и Рогатине, наводит на мысль о возможности ограниченной гибридизации между редкими биотипами, с одной стороны, и *O. lacteum*-А, с другой.

Генное маркирование южных форм (из АР Крыма, Одесской и Херсонской областей), особи которых по всем спектрам были инвариантными, а имеющиеся редкие случаи изменчивости вполне могли быть интерпретированы как появление альтернативного клона, дает основание считать их облигатными партеногенетами. Всего здесь идентифицировано шесть клонов со средним числом 7,6 особей на одну генетическую форму.

Кариологический анализ

Кариотип *O. lacteum*-А представлен на рисунке 6. В метафазе митоза обнаружено 38 хромосом. Линейные параметры хромосом определены на основании промеров десяти метафазных пластинок. Длина хромосомного набора: $TCL = 167,52 \pm 11,89$ мкм. Относительная длина хромосом равномерно убывает от $5,92 \pm 0,24\%$ (1-я пара) до $1,03 \pm 0,07\%$ (19-я пара). Кариотип состоит из 19 метацентрических и 19 субметацентрических хромосом. Основное число $FN = 76$.

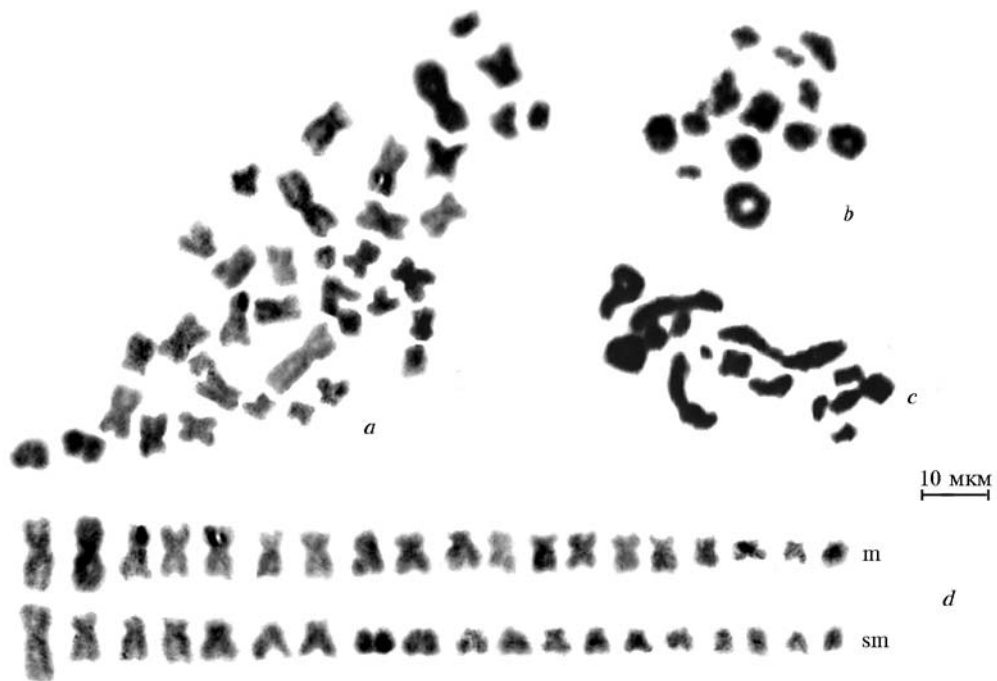


Рис. 6. Кариотип *O. lacteum*-А: *a* — митотическая метафаза; *b, c* — диакинез; *d* — кариограмма (*m* — метацентрические хромосомы; *sm* — субметацентрические хромосомы).

Fig. 6. Karyotype of *O. lacteum*-A: *a* — mitotic metaphase; *b, c* — diakinesis; *d* — karyogram (*m* — metacentric chromosomes; *sm* — submetacentric chromosomes).

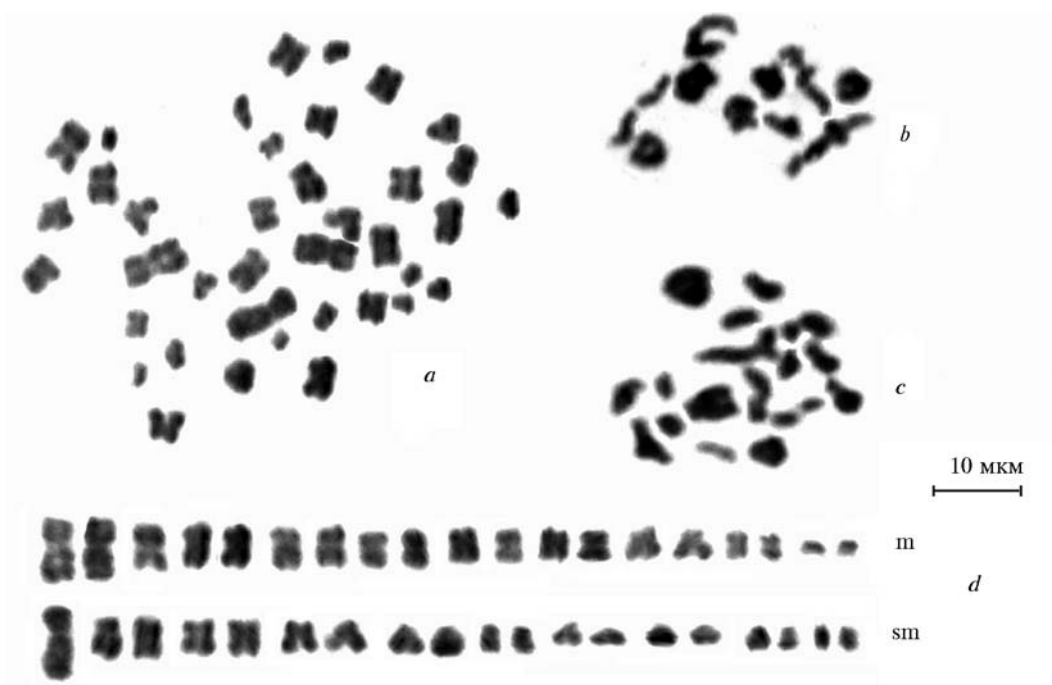


Рис. 7. Кариотип *O. lacteum*-В: *a* — митотическая метафаза; *b, c* — диакинез; *d* — кариограмма (*m* — метацентрические хромосомы; *sm* — субметацентрические хромосомы).

Fig. 7. Karyotype of *O. lacteum*-B: *a* — mitotic metaphase; *b, c* — diakinesis; *d* — karyogram (*m* — metacentric chromosomes; *sm* — submetacentric chromosomes).

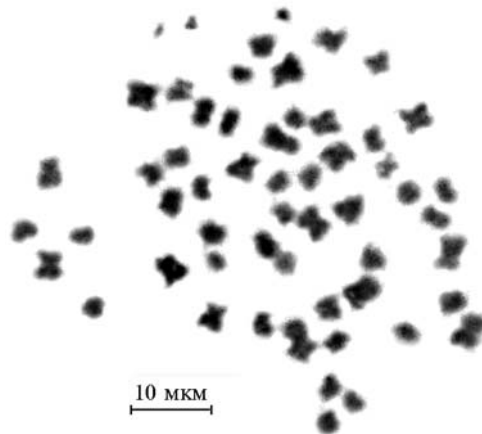


Рис. 8. Митотическая метафаза триплоидного *O. lacteum* ($3n = 54$).

Fig. 8. Mitotic metaphase of triploid *O. lacteum* ($3n = 54$).

В сперматогамиальном мейозе число и форма хромосом варьировали (рис. 6, б, в). Пластинки обычно содержали 12–19 элементов. При этом пластинки с низким числом элементов содержали преимущественно нормальные биваленты (рис. 6, б), тогда как на пластинках с более высоким числом элементов появлялись сложные структуры, предположительно триваленты (рис. 6, в).

Кариотип *O. lacteum*-В также представлен 38 хромосомами (рис. 7). Линейные параметры хромосом определены на основании промеров девяти метафазных пластинок. Длина хромосомного набора $TCL = 159,53 \pm 12,11$ мкм. Относительная длина хромосом равномерно убывает от $5,63 \pm 0,19\%$ (1-я пара) до $1,13 \pm 0,1\%$ (19-я пара). Кариотип состоит из 19 метацентрических и 19 субметацентрических хромосом. Основное число $FN = 76$.

Картина сперматогамиального мейоза (рис. 7, б, в) оказалась очень схожей с *O. lacteum*-А: также наблюдались пластинки с варьирующим количеством и формой элементов, часть из которых представлены тривалентами.

Для редких форм кариотипы удалось установить лишь для *O. lacteum*-С и *O. lacteum*-D, также отвечающее субтриплоидному набору хромосом — $2n + x = 38$.

Результаты кариологического анализа *O. lacteum* из Крыма (с. Мостовое), свидетельствуют о триплоидности этой формы. В метафазных пластинках этих особей насчитывается 54 хромосомы ($3n = 54$) (рис. 8). Основное число $FN = 108$.

Таким образом, *O. lacteum* s. l. на территории Украины представлен, по меньшей мере, двумя хромосомными расами: субтриплоидной ($2n + x = 38$) и триплоидной ($3n = 54$).

Анализ морфологических особенностей криптоических форм

Морфологические признаки всех исследованных особей соответствовали описанию *O. lacteum* (Перель, 1979). Тем не менее анализ абсолютных размеров самых массовых форм показал наличие достоверных различий между некоторыми из них по ряду параметров (табл. 1). Так, наиболее многочисленные субтриплоидные формы *O. lacteum*-А и *O. lacteum*-В достоверно отличаются только длиной тела и общим количеством сегментов. Особи *O. lacteum*-В характеризуются большими значениями этих параметров по сравнению с *O. lacteum*-А. При этом значения признаков у конкретных особей значительно трансgressируют, а потому не

Таблица 1. Средние значения (М) и стандартные ошибки (m) морфологических параметров различных форм *O. lacteum*Table 1. Means (M) and standard errors (m) of different *O. lacteum* biotypes

Признак		Форма						
		А N = 471	В N = 94	С N = 11	Д N = 6	IIIa N = 12	IIIc N = 5	IIIe N = 10
D, мм	M	3,78	3,79	3,63	3,66	5,85	3,74	3,23
	m	0,03	0,08	0,22	0,16	0,18	0,11	0,11
L, мм	M	41,01	44,25	37,50	37,00	79,25	40,40	37,05
	m	0,53	1,17	3,91	2,13	8,41	0,93	1,69
l ₁ , мм	M	14,86	15,24	15,18	14,58	19,16	15,20	13,50
	m	0,10	0,21	0,88	0,39	0,32	0,25	0,16
l ₂ , мм	M	3,70	3,37	3,69	3,96	4,70	4,18	3,53
	m	0,09	0,10	0,20	0,20	0,39	0,11	0,18
n ₁	M	99,83	105,42	90,91	90,33	134,41	111,20	94,40
	m	0,93	2,05	6,57	7,40	6,10	3,55	3,97
L / n ₁	M	0,41	0,42	0,41	0,42	0,59	0,36	0,39
	m	0,00	0,01	0,02	0,01	0,05	0,01	0,01
l ₁ / n ₂	M	0,51	0,52	0,52	0,50	0,66	0,52	0,46
	m	0,00	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
D/L	M	9,63	8,81	10,13	9,98	7,81	9,25	8,80
	m	0,09	0,17	0,52	0,39	0,39	0,20	0,32
D/l ₁	M	25,66	24,90	23,98	25, 29	30,54	24,60	23,89
	m	0,18	0,40	0,50	1,49	0,73	0,58	0,62
l ₁ /L	M	38,00	35,80	42,31	40,40	25,93	37,64	36,91
	m	0,37	0,66	2,06	3,06	1,56	0,29	1,18
l ₂ /L	M	9,38	7,69	10,56	11,01	6,20	10,35	9,54
	m	0,25	0,20	0,85	1,13	0,55	0,28	0,34
l ₁ /l ₂	M	27,97	21,97	24,69	27,16	24,48	27,51	26,07
	m	0,67	0,61	1,16	0,99	1,94	0,702	1,15

Таблица 2. Достоверность отличий между триплоидными клонами *O. lacteum* по морфологическим параметрамTable 2. Significance of differences between triploid clones *O. lacteum* on morphological characters

Клоны	D (mm)	L (mm)	l ₁ (mm)	l ₂ (mm)	n	L / n	l ₁ /n ₁	D/L	D/l ₁	l ₁ /L	l ₂ /L	l ₁ /l ₂
Lact-IIIa — lact-IIIc	***	**	***			**	***		***	***	***	*
lact-IIIa — lact-IIIe	***		***		***	**	***		***	***	***	*
lact-IIIc — lact-IIIe		***	**				**					

Условные обозначения: * p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001

могут быть использованы при диагностике. Достоверное различие между *O. lacteum*-В и *O. lacteum*-С наблюдается также в количестве сегментов. Более информативной оказалась изменчивость пропорций тела. Различия обнаружены по четырем из пяти рассчитанных индексов для первой пары форм и по двум индексам — для второй пары (табл. 1). Таким образом, хотя уровень различий между субтриплоидными генетическими формами *O. lacteum* и недостаточен для их диагностики, они все же обладают определенными морфологическими особенностями.

Гораздо более существенные различия выявлены между клоновыми, вероятнее всего, триплоидными биотипами с юга Украины (табл. 2). Так, *O. lacteum*-IIIa (с. Мостовое, АР Крым), который характеризуется большими значениями размерных характеристик, достоверно отличается по большинству исследованных признаков от *O. lacteum*-IIIc (с. Малая Долина, Одесская обл.) и

Таблица 3. Надежность определения форм *O. lacteum* по морфологическим параметрам
 Table 3. The reliability of identification of forms *O. lacteum* based on morphological parameters

Форма	№	%	1	2	3	4	5	6	7
<i>O. lacteum</i> -А	1	99,15	467	1	0	1	1	0	1
<i>O. lacteum</i> -В	2	0,00	94	0	0	0	0	0	0
<i>O. lacteum</i> -С	3	0,00	11	0	0	0	0	0	0
<i>O. lacteum</i> -Da	4	16,67	5	0	0	1	0	0	0
<i>O. lacteum</i> -IIIa	5	83,33	2	0	0	0	10	0	0
<i>O. lacteum</i> -IIIc	6	0,00	5	0	0	0	0	0	0
<i>O. lacteum</i> -IIIe	7	0,00	10	0	0	0	0	0	0
В целом		78,49	594	1	0	2	11	0	1

O. lacteum-IIIe (с. Приморское, Херсонская обл.). В тоже время два последних обнаруживают значительное сходство и отличаются только по трем параметрам.

Анализ совокупной выборки субтриплоидных и триплоидных форм свидетельствует о существенной морфологической обособленности червей с территории Крыма (*O. lacteum*-IIIa) от всех остальных (дискриминируются на уровне 83%) (табл. 3). Уровень дискриминации других генетических форм, как субтриплоидных, так и триплоидных, оказался очень низким и большинство их экземпляров отнесены в результате анализа к *O. lacteum*-А. Следует отметить, что *O. lacteum*-IIIa имеет также некоторые отличия по качественным признакам. Так у него отсутствуют железистые поля вокруг мужских половых отверстий, а спинные поры начинаются с межсегментной бороздки 12/13, тогда как у всех остальных форм железистые поля четко выражены, а спинные поры начинаются с межсегментной бороздки 9/10, 10/11 или 11/12.

Обсуждение

О структурированности вида

Проведенное генетическое маркирование популяций с территории Украины показало, что *O. lacteum* (= *tyrtaeum*), как в Северной Америке, так и в Европе, хотя и представлен рядом генетических типов, по сравнению с другими партеногенетическими видами имеет невысокий уровень биотипического разнообразия. Причем полученный в данном исследовании уровень, базирующийся на среднем количестве особей на один биотип (31,9), является промежуточным по сравнению с оценками, приводимыми другими авторами. Так, исследование структуры популяций *O. lacteum*, интродуцированного из Европы в восточные штаты США, показало, что на 2000 ос. здесь встречается только 8 электрофоретических типов, то есть на один предполагаемый клон — 250 ос. Причем 90% всех особей приходится на два самых массовых. В Феноскандии разнообразие клонов гораздо выше: на 238 изученных особей обнаружено 24 клона (9,9 ос. на «клон»), причем резко доминирующие по численности генетические типы не обнаружены вообще. Такая выравненность отличает популяции Северной Европы не только от популяций Украины, но и США (Jaenike et al., 1980), Германии, Канады, где также имеются две явно доминирующие формы (Heethoff et al., 2003).

Разноплоидность *O. lacteum* и особенности гаметогенеза

Считается, что *O. lacteum* (= *tyrtaeum*) — это облигатный партеногенет. Причем эта точка зрения прочно сформировалась еще на заре кариологических исследований дождевых червей — в середине прошлого столетия (Muldal, 1952; Omodeo, 1955). В принципе этот факт подтверждает и структура поселений этого дождевого червя на юге Украины, который здесь представлен рядом триплоидных дискретных генетических типов. Хотя следует учесть, что наличие генетического полиморфизма в пределах северных самых массовых субтриплоидных типов, пусть

даже и сопровождающееся отклонениями в распределениях от модели случайных скрещиваний, не дает основание считать, что этот вид в целом является облигатным партеногенетом, поскольку у субтриплоидных северных форм нет ни строгого апомиксиса, ни типичного амфимиксиса.

Действительно у особой форм *O. lacteum*-А и *O. lacteum*-В имеет место изменчивость спектров эстераз, в частности локуса *Es-4*, которая не может быть проинтерпретирована ни как клоновая изменчивость, ни как типичный случай амфимиксиса. С одной стороны, основанием для такого, на первый взгляд, противоречивого заключения, является наличие соответствующих гомо- и гетерозиготных генотипов, которые распределяются в части исследованных выборок в соответствии с законом Харди-Вайнберга, как это имеет место у амфимиктических диплоидных видов дождевых червей (Janieke, Selander, 1985; Межжерин и др., 2008), тогда как при клоновой структуре поселений должны наблюдаться фиксации спектров, отвечающие определенным гомозиготным или же гетерозиготным сочетаниям аллелей (Terhivio, Saura, 1993; Власенко и др., 2007; Межжерин и др., 2008). С другой — в ряде популяций эмпирические распределения генотипов неравновесны. Так, по всей совокупности выборок *O. lacteum*-А наблюдается избыток гомозигот, причем с тенденцией его наибольшего проявления в восточных популяциях, а по *O. lacteum*-В, наоборот, — их дефицит с наибольшей выраженностью в западных популяциях.

Следует обратить также внимание и на то обстоятельство, что как самые массовые, так и спорадично встречающиеся формы этого вида обитают вместе, а значит, имеют надежную репродуктивную изоляцию, поскольку в противном случае превратились бы в одну достаточно полиморфную группу. Самым вероятным механизмом этой репродуктивной изоляции является апомиктическая форма размножения.

Таким образом, у субтриплоидных червей *O. lacteum*, обитающих в северных регионах Украины, как бы сочетается амфи- и апомиктическое размножение и их правильнее называть факультативными партеногенетами. Что касается спорадично встречающихся форм, например *O. lacteum*-С и *O. lacteum*-D, то у них, несмотря на их субтриплоидную природу, партеногенез, очевидно, имеет облигатный характер.

Типичный партеногенез у червей характерен для три- или тетраплоидов с неравными соотношениями геномов родительских видов (Викторов, 1993), тогда как у диплоидного вида это явление, по определению, должно быть невозможным. В принципе, в какой то степени это подтверждает и проведенное исследование, поскольку в южных популяциях, в которых выявлена триплоидия, соблюдается клоновость структуры. Тогда как на севере ситуация гораздо сложнее. У самых массовых форм *O. lacteum*-А и *O. lacteum*-В, которые являются субтриплоидами ($2n + x$), картина сперматогониального мейоза в общем напоминает таковой триплоидного апомиктического *A. trapezoides* (Межжерин и др., 2008). Таким образом, аномальный мейоз является одним из путей ограничения амфимиксии у этого вида. Хотя, судя по наличию гомо- и гетерозигот, в ряде случаев все же образуются жизнеспособные мужские гаметы, которые обеспечивают оплодотворение и частичный амфимиксис.

Различия в размерах и форме трех наиболее крупных хромосом в субтриплоидном наборе может свидетельствовать о негомологичности хромосомных наборов предковых видов. В этом случае возникает закономерный вопрос о механизме редукции числа хромосом с $3n = 54$ до 38. Существующие данные не позволяют однозначно на него ответить. В связи с этим значительный интерес представляет кариологическая структура близкого к *O. lacteum* вида *O. suaneum*. Базовое число хромосом полиплоидных форм, обнаруженных у этого вида ($7n$ и

9n), — $n = 18$ (Vedovini, 1973). У него же обнаружена и субтриплоидная форма ($2n + x = 40$) (Vedovini, 1973). Митотический набор хромосом еще одной полиплоидной расы *O. suaveum*, обнаруженной С. Мюльдалем (Muldal, 1952), состоял из 190 хромосом. Автор предположил, что это декаплоид с базовым числом хромосом $n = 19$. Однако, если базовым принять число $n = 18$, то и эту расу следует рассматривать как анеуплоидную ($10n + x$). Учитывая значительное морфологическое сходство обсуждаемых видов (у *O. lacteum* пояска сдвинут на 1 сегмент дальше по сравнению с *O. suaveum*) и наличие промежуточных форм между ними по этому параметру логичным является предположение, что они являются членами единого политипичного вида (Omodeo, 1955), представленного серией викарных полиплоидных и анеуплоидных форм. Поскольку обнаружены практически только нечетноплоидные расы этих видов, их полиплоидия, вероятно, имеет гибридную природу. При этом анеуплоидные расы также могли образоваться в результате гибридизации близких форм, сопровождавшейся элиминацией большей части хромосом одного из гаплоидных наборов. Поскольку два обнаруженных субтриплоидных «вида» отличаются по числу хромосом, можно предположить, что в их образовании принимали участие различные предковые формы. В любом случае гибридизация и связанная с ней нечетноплоидность должны приводить к существенным нарушениям мейоза, а раз так, то решение проблемы может осуществляться только за счет апомиксиса, что очевидно и имеет место в южных популяциях *O. lacteum*. У северных же форм, хромосомный набор которых хотя и субтриплоиден, но все же ближе к диплоидному. Поэтому наблюдается факультативный партеногенез, который, с одной стороны, приводит к формированию ряда генетических форм, а с другой — к полиморфизму в пределах этих форм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований Украины (проект Ф25.5/054).

- Бызова Ю. Б., Гиляров М. С. Количественные методы в почвенной зоологии. — М.: Наука, 1987. — 288 с.
- Викторов А. Г. Разнообразие полиплоидных рас в семействе дождевых червей Lumbricidae // Успехи современной биологии. — 1993. — 113, вып. 3. — С. 304–312.
- Власенко Р. П., Гарбар А. В., Межжерин С. В. Клональная структура, кариологический и морфологический анализ изолированного поселения гипервариабельного вида дождевых червей *Aporrectodea rosea* (Oligochaeta: Lumbricidae) // Наук. вісник Ужгород. ун-ту. Сер. Біол. — 2007. — Вип. 21. — С. 187–191.
- Гарбар А. В., Онищук И. П. Хромосомный гетероморфизм *Octolasion lacteum* (Xrley, 1885) (Oligochaeta, Lumbricidae) как результат гибридогенеза // Доп. НАН України. — 2007. — № 9. — С. 136–140.
- 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 // Доп. НАН України. — 2007. — № 8. — С. 151–156.
- Межжерин С. В., Власенко Р. П., Гарбар А. В. Особенности генетической структуры комплекса дождевых червей Aporrectodea (superspecies) caliginosa (Oligochaeta: Lumbricidae) на территории Украины // Цитология и генет. — 2008. — 42, № 4. — С. 50–57.
- Перель Т. С. Географические особенности размножения дождевых червей сем. Lumbricidae (Oligochaeta) // Журн. общ. биол. — 1982. — 43, № 5. — С. 649–658.
- Перель Т. С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР. — М.: Наука, 1979. — 271 с.
- Ситникова Т. Я., Островская Р. М., Побережный Е. С., Козлова С. А. Новые результаты исследований полиплоидии у байкальских эндемичных моллюсков рода *Benedictia* (Gastropoda, Pectinibranchia, Benedictiidae) // Морфология и эволюция беспозвоночных. — Новосибирск: Наука, 1990 — С. 266–281.
- Garbar A. V., Vlasenco R. P. Karyotypes of three species of the genus Aporrectodea (Oligochaeta, Lumbricidae) of Ukrainian fauna // Comparative Cytogenetics. — 2007. — 1, № 1. — P. 59–62.
- Heethoff M., Etzold K., Scheu S. Mitochondrial COII sequences indicate that the parthenogenetic earthworm *Octolasion tytaeum* (Savigny 1826) constitutes of two lineages differing in body size and genotype // Pedobiologia. — 2003. — 47. — P. 9–13.

- Jaenike J., Parker E. D., Selander R. K.* Clonal niche structure in the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* // *Am. Nat.* — 1980. — № 116. — P. 196–205.
- Jaenike J., Selander R. K.* On the coexistence of ecologically similar clones of parthenogenetic earthworms // *Oikos.* — 1985. — **44**. — P. 512–514.
- Jaenike J., Selander R. K.* Evolution and ecology of parthenogenesis in earthworms // *Am Zool.* — 1979. — **19**. — P. 729–737.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A.* Nomenclature for centromeric position on chromosomes // *Hereditas.* — 1964. — **52**. — P. 201–220.
- Muldal S.* The chromosomes of the earthworms I. The evolution of polyploidy // *Heredity.* — 1952. — **6**. — P. 55–76.
- Omodeo P.* Cariologia dei Lumbricidae. II. Contributo // *Caryologia.* — 1955. — **8**. — P. 135–178.
- 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.
- Terhivuo J., Saura A.* Clonal and morphological variation in marginal populations of parthenogenetic earthworms *Octolasion tyrtaeum* and *O. cyaneum* (Oligochaeta, Lumbricidae) from eastern Fennoscandia // *Boll. Zool.* — 1993. — **60**. — P. 87–96.
- Vedovini A.* Systematique, caryologie et ecologie des Oligochètes Terrestres de la région Provençale. Ph. D. Dissertation, University Provence. — 1973. — 150 p.