

УДК 594.38:575.1+577.1

## СИСТЕМАТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА *PLANORBARIUS CORNEUS* S. L. (GASTROPODA, PULMONATA): АНАЛИЗ АЛЛОЗИМНЫХ МАРКЕРОВ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

С. В. Межжерин<sup>1</sup>, Д. А. Гарбар<sup>2</sup>, А. В. Гарбар<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины,  
ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев, 01601 Украина

<sup>2</sup> Житомирский государственный университет им. Ивана Франко,  
ул. Б. Бердичевская, 40, Житомир, 10002 Украина

Получено 12 марта 2004

**Систематическая структура комплекса *Planorbarius corneus* s. l. (Gastropoda, Pulmonata): анализ аллозимных маркеров и морфометрических признаков.** Межжерин С. В., Гарбар Д. А., Гарбар А. В. — Методом электрофореза в полиакриламидном геле исследованы ферменты и структурные белки мышц (всего 13 локусов) 4 предполагаемых видов легочных моллюсков рода *Planorbarius* из водоемов окр. Житомира, Сум и Вилково. Доказано не только отсутствие различий в аллельных пулах, но и четкое соответствие аллельных частот полиморфных локусов у этих видов в пределах каждой из выборок, вследствие чего в совокупных выборках из Вилково и Житомира, состоящих из 3 и 4 видов, имело место полное совпадение наблюдаемого и теоретического распределений генотипов полиморфных локусов (Es-1, Gpi), что отвечает модели панмиксной популяции. Таким образом, результаты генного маркирования доказывают конспецифичность *P. corneus*, *P. banaticus*, *P. purpura* и *P. grandis* и некорректность выделения в его пределах симпатрических видов, основываясь на некоторых конхологических признаках. Сравнение изменчивости аллозимных маркеров и морфологических признаков между тремя географическими выборками показало, что изоляция дистанцией гораздо существеннее дифференциации 4 предполагаемых видов. Более того, значимость генетических отличий моллюсков из Сум от житомирских и вилковских доказывает возможность аллоидовой структуры *P. corneus* (Linnaeus, 1758) s. l.

**Ключевые слова:** систематика, моллюски, *Planorbarius*, биохимическое генное маркирование.

**Systematic Structure of the *Planorbarius corneus* s. l. Complex (Gastropoda, Pulmonata): Analysis of Allozyme Markers and Morphometric Traits.** Mezherin S. V., Garbar D. A., Garbar A. V. — Enzymes and structural proteins from the muscles (13 loci in total) of the four assumed species of pulmonary mollusks *Planorbarius* from the reservoirs in vicinity of Zhitomir, Sumy and Vilkovo were analyzed electrophoretically in polyacrylamide gels. Not only the absence of differences in allele frequencies pooled across the assumed species, but also strong correlation of the allele frequencies within populations are proved. As a result, the observed distribution of genotypes at Es-1 and Gpi loci in the samples pooled from Vilkovo and Zhitomir, composed of 3 and 4 assumed species, respectively, equaled the distribution expected in panmictic population. Therefore, our results, obtained by gene marking, unambiguously prove that *P. corneus*, *P. banaticus*, *P. purpura* and *P. grandis* are conspecific, and subdivision into sympatric species, based on conchological characters only is incorrect in this complex. A comparison of allozyme and morphological variation across the three geographic samples has shown that their isolation by distance is much greater than differentiation across the four assumed species. Furthermore, significance of the genetic differences of the mollusks collected in Sumy from those collected in Zhitomir and Vilkovo proves possible allospecific structure of *P. corneus* (Linnaeus, 1758) s. l.

**Key words:** systematics, mollusks, *Planorbarius*, biochemical gene marking.

### Введение

Морфологическое определение вида, основывающееся на типологической концепции, господствовало в таксономии животных до середины XX в., хотя и в наши дни в исследованиях отдельных групп животных не утратило своего прежнего значения. В тот период развития систематики иссле-

дователи зачастую были склонны придавать видовой статус практически всем внешне отличным формам живых организмов без учета их индивидуальной изменчивости. Такой подход в конечном итоге привел к описанию таксонов, определение которых вызывает серьезные затруднения. Именно это вызвало необходимость во введении в практику таксономии более строгих генетических критериев вида, на основе которых была сформирована биологическая концепция вида (Mayr, 1963). Ее стержнем стало представление о виде как о «генетической прерывистости», которая в упрощенной форме воспринималась как репродуктивная изоляция в природе. Позднее биологическая концепция плавно перешла в эволюционную, согласно которой вид — это не только единица репродукции, но и эволюции, а критерием эволюционно-генетической дискретности таксона является уникальность его генофонда, которая проявляется в фиксации видоспецифичных аллелей. Следует подчеркнуть, что значимость морфологических признаков как критериев выделения вида в эволюционной концепции не утратила своего значения, а скорее, дополнилась анализом признаков на молекулярно-генетическом уровне организации, проявление которых не зависит от среды обитания и возраста, а их индивидуальная изменчивость строго регламентируется законами наследования. На практике систематика подавляющего большинства групп животных была, есть и будет типологической, поскольку внедрение генетических методов из-за их трудоемкости целесообразно осуществлять только в исследованиях модельных групп, систематика которых вызывает особый интерес. В подобных случаях результаты генетического анализа выступают критерием истины.

К концу XX в. противоречивая ситуация сложилась в систематике некоторых моллюсков, среди которых и семейство Vulinidae, представленное в Украине родом *Planorbarius*. До начала 70-х годов в пределах рода признавалось наличие лишь *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758), который на основании конхологических признаков впоследствии ревизовали (Кривошеина, Старобогатов, 1973) с выделением 5 видов: *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758), *P. banaticus* (Lang, 1856), *P. purpura* (Müller, 1774), *P. grandis* (Dunker, 1856), *P. stenostoma* (Bourguignat, 1881). Однако дальнейшие попытки привлечь для подтверждения видового статуса этих форм данные исследований кариотипа и репродуктивной изоляции (Максимова, 1995) не принесли убедительных результатов, подтверждающих правильность ревизии.

В настоящее время мнения разделились. Одни специалисты придерживаются взглядов И. Я. Старобогатова (Стадниченко, 1990), тогда как другие (Gloer, 2002 и др.) объединяют все эти виды в один полиморфный вид *P. corneus* (Linnaeus, 1758), отмечая, что параметры раковины подвержены средовому влиянию и, следовательно, являются наиболее изменчивыми. Таким образом, ни одна из рассмотренных концепций не является на сегодняшний день достаточно обоснованной. Для окончательной таксономической ревизии этой группы необходимы дополнительные исследования, прежде всего — геномное маркирование особей сообществ этих видов в местах их совместного обитания.

## Материал и методы

Материалом исследования послужили одноразовые сборы моллюсков, проведенные авторами публикации в следующих местах: окр. г. Вилково (р. Дунай, август 2004 г., прибрежная зона на протяжении 400 м с песчаными донными отложениями и редкой водной растительностью); окр. г. Житомира (р. Тетерев, сентябрь–октябрь 2003 г., прибрежная зона на протяжении 200 м с илистыми донными отложениями и обильной водной растительностью); г. Сумы (оз. Дурова, август 2004 г., прибрежная зона с илистыми донными отложениями и обильной водной растительностью). В каждой из выборок на основе конхологических признаков (Кривошеина, Старобогатов, 1973) идентифицированы следующие виды: *P. corneus* (Вилково — 18 экз., Житомир — 37 экз., Сумы — 17 экз.), *P. banaticus* (Вилково — 10 экз., Житомир — 38 экз., Сумы — 18 экз.), *P. purpura* (Вилково — 1 экз., Житомир — 33 экз., Сумы — 15 экз.), *P. grandis* (Вилково — 21 экз., Житомир — 31 экз.). Кроме того, проведена серия промеров каждого моллюска: высота раковины, ширина раковины (по перпендикуляру к ее оси), высота устья, ширина устья, ширина последнего оборота сверху и снизу, ширина предпоследнего оборота, ширина третьего оборота, ширина внутренних оборотов сверху и снизу, радиус раковины. При определении видовой принадлежности учитывались и качественные характеристики: форма раковины и ее устья, характер нарастания оборотов и их выпуклость, рисунок шва между оборотами, форма базального и палатального краев устья, глубина и ширина пупка. Измерения проводили с помощью кронциркуля с точностью до 0,1 мм.

Электрофоретический анализ ферментов и белков мышц, печени и гемолимфы проведен в 7,5%-ном полиакриламидном геле (Peacock et al., 1965).

## Результаты

Генетический анализ. Методом электрофоретического анализа в выборке из окр. Житомира исследована изменчивость ферментов, кодируемых соответствующими локусами: аспаратаминотрансферазы (Aat-1), глюкозофосфатизомеразы (Gpi), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (G3pdh), малатдегидрогеназы (Mdh-1), лейцинаминопептидазы (Lap), супероксиддисмутазы (Sod-1),

кислой фосфатазы (AcPh), неспецифических эстераз (Es-1, -4, -5), структурных белков мышц (Pt-1, -4, -5). Из этих 13 локусов однозначно инвариантными оказались 10; локус Aat-1 имел только редкие электрофоретические варианты, Gri был представлен двумя аллелями, встречающимися практически в равной пропорции, а Es-1 – 4 аллелями, обозначенными в соответствии с увеличением электрофоретической подвижности в алфавитном порядке. Такая высокая степень генетической изменчивости локуса Es-1 и определила его использование в качестве основного маркера. Эффективное разрешение электроморф локуса Es-1 было получено в гемолимфе, где была ограниченная экспрессия локусов неспецифических эстераз, кодирующих медленно мигрирующие белки, которые в экстрактах из мышечной или печеночной ткани просто закрывали продукты аллелей локуса Es-1 и таким образом препятствовали интерпретации данных.

Сопоставление частот встречаемости аллелей локуса Es-1 не выявило ни видоспецифичных аллелей, ни достоверных различий между 4 предполагаемыми видами (табл. 1) в пределах каждой из трех изученных выборок. В результате в двух смешанных выборках (дунайской, где было идентифицировано 3 вида, и житомирской, включающей в себя предположительно 4 вида) имело место отличное соответствие наблюдаемых и ожидаемых на основании закона Харди–Вайнберга распределений генотипов (табл. 2), а это значит, что две проанализированные выборки являются не совокупностями особей разных видов, а панмиксными популяциями.

Этот вывод также подтверждает анализ распределений частот встречаемости аллелей и генотипов локуса Gri в житомирской популяции; и в данном случае отсутствовали видоспецифичные аллели и различия в частотах полиморфных локусах, а выборка в целом проявляла как единая панмиксная популяция, о чем свидетельствует соответствие наблюдаемых и ожидаемых (указаны в скобках) распределений генотипов: Gri<sup>s/s</sup> – 28 (30,8), Gri<sup>s/f</sup> – 63 (56,9), Gri<sup>f/f</sup> – 23 (26,2) при  $\chi^2 = 1,32$ ,  $p > 0,05$ .

**Таблица 1.** Аллельные частоты встречаемости локуса Es-1 у сравниваемых видов моллюсков рода *Planorbarius*

**Table 1.** Allelic frequencies of the Es-1 locus in compared species of mollusks of the genus *Planorbarius*

Аллель	Вилково			Житомир				Сумы		
	<i>P. c.</i>	<i>P. g.</i>	<i>P. b.</i>	<i>P. c.</i>	<i>P. g.</i>	<i>P. b.</i>	<i>P. p.</i>	<i>P. c.</i>	<i>P. b.</i>	<i>P. p.</i>
Es-1a	0,39	0,36	0,30	0,14	0,08	0,19	0,07	0	0	0
Es-1b	0,55	0,54	0,55	0,72	0,79	0,65	0,81	0	0	0
Es-1d	0,05	0,10	0,05	0,14	0,13	0,16	0,12	1	1	1
n	10	21	18	37	31	38	33	17	18	15

Примечание. *P. c.* – *P. corneus*; *P. g.* – *P. giganteus*; *P. b.* – *P. banaticum*; *P. p.* – *P. purpura*.

**Таблица 2.** Наблюдаемые и ожидаемые (в скобках) распределения генотипов локуса Es-1 в общих выборках предполагаемых видов *P. corneus* s. l.

**Table 2.** Observed (expected) genotypes distributions of the Es-1 locus in generalized samples of 4 assumed species of *P. corneus* s. l.

Выборка	Генотип							$\chi^2$
	Es-1 <sup>a/a</sup>	Es-1 <sup>a/b</sup>	Es-1 <sup>a/d</sup>	Es-1 <sup>b/b</sup>	Es-1 <sup>b/d</sup>	Es-1 <sup>d/d</sup>		
р. Дунай	4 (6,1)	22 (18,9)	4 (3,2)	14 (14,6)	5 (4,9)	0 (0,4)	1,64	
р. Тетерев*	2 (1,9)	24 (22,6)	3 (4)	61 (61,3)	23 (21,8)	2 (1,9)	0,41	

\* Редкие генотипы в расчеты не брались.

Таблица 3. Средние частоты встречаемости аллелей локуса Es-1 в трех выборках *P. corneus* s. l., %  
 Table 3. Mean frequencies of the Es-1 locus in three samples of *P. corneus* s. l., %

Аллель	Вилково	Житомир	Сумы
Es-1a	0,34 ± 0,05	0,12 ± 0,02	0
Es-1b	0,53 ± 0,05	0,72 ± 0,03	0
Es-1c	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0
Es-1d	0,09 ± 0,03	0,14 ± 0,02	1
n	50	139	50

В отличие от межвидовых сравнений сопоставление частот встречаемости аллелей разных географических выборок дает высоко достоверные различия (табл. 3). Так, моллюски дунайских и тетеревских выборок, хотя и имеют одинаковый генный пул, представленный 4 аллелями, но отличаются друг от друга частотами встречаемости аллелей Es-1<sup>a</sup> и Es-1<sup>b</sup>. Моллюски из Сум имеют фиксацию самого медленного аллеля Es-1<sup>d</sup>, чем они принципиально отличаются от двух других выборок. Такие различия, близкие к фиксации альтернативных аллелей, характерны для викарирующих видов с определенным уровнем интрогрессивной гибридизации. Наличие фиксаций альтернативных аллелей, обнаруженное по локусу Es-1, подтверждается качественными различиями в электрофоретических спектрах эстераз мышц и печени, полокусная интерпретация которых затруднена из-за перекрытий спектров. Таким образом, если различия между «видами» моллюсков в пределах выборок совершенно не выражены, то географические выборки, включающие в себя комплексы видов, имеют существенные различия, что совершенно исключено в случае, если бы они действительно представляли собой смесь видов, поскольку каждый из видов, по определению, обладает своим генофондом и, следовательно, должен иметь свой тренд географической изменчивости.

Морфометрический анализ. Вследствие проведенного сравнения межвидовой и географической изменчивости на уровне генных маркеров представляет интерес сопоставление морфологических различий «видов» внутри выборок и географических выборок между собой. Этот анализ проведен по совокупности морфометрических признаков методами многомерной статистики.

Дискриминантный анализ показал, что 4 предполагаемых вида в обобщенной выборке, составленной из особей всех трех географических популяций, дифференцированы очень слабо — в среднем на уровне 58%, а это значит, что практически половина особей каждого вида не поддается определению (табл. 4). Тогда как степень дискриминации особей в смешанной выборке по их принадлежности к географическому региону оказалась гораздо выше — на уровне 88% (табл. 5), а уже 4 моллюска из 5 можно достоверно отнести к одной из трех географических выборок.

Таблица 4. Надежность определения 4 «видов» комплекса *P. corneus* s. l.  
 Table 4. The reliability of discrimination of 4 assumed species of *P. corneus* s. l.

Вид	Надежность, %	<i>P. c.</i>	<i>P. g.</i>	<i>P. b.</i>	<i>P. p.</i>
<i>P. c.</i>	63,3	31	8	10	0
<i>P. g.</i>	53,3	11	32	8	9
<i>P. b.</i>	59,0	10	11	36	4
<i>P. p.</i>	58,9	1	9	6	23
В целом	58,4	53	60	60	36

Примечание. Сокращения названий видов такие же, как и в таблице 1.

Таблица 5. Надежность определения особей из 3 географических выборок *P. corneus* s. l.  
Table 5. The reliability of discrimination of specimens of 3 geographic populations of *P. corneus* s. l.

Локалитет	Надежность, %	Житомир	Сумы	Вилково
Житомир	91,3	126	8	4
Сумы	88,0	5	44	1
Вилково	61,9	6	2	13
В целом	87,6	137	54	18

Сходные результаты дают и методы многомерной статистики, согласно которым 4 предполагаемых вида не только существенно перекрываются в пространстве главных компонент, но и по первой компоненте не отличаются в принципе, так как имеют совершенно одинаковый характер векторизации (рис. 1), а имеющиеся различия, связанные со второй компонентой, представляют собой пошаговые сдвиги в морфологии, которые вполне можно ожидать, поскольку в идентификации предполагаемых видов катушек уже заложены определенные различия в пропорциях раковины.

Аналогичный анализ, проведенный для трех географических выборок, показывает не только гораздо меньшую степень трансгрессии их облаков, но и то, что характер изменчивости и ее векторизация проходит в географических группах по-разному (рис. 2). А это еще раз доказывает, что различий между географическими выборками моллюсков существенно больше, чем между предполагаемыми видами.

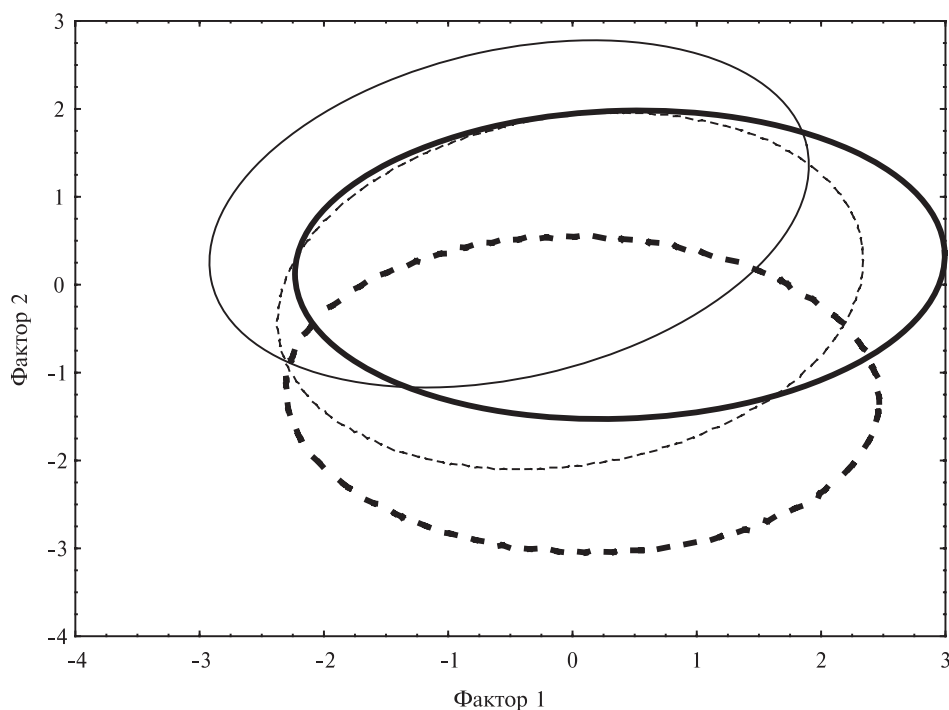


Рис. 1. Облака распределений четырех «видов» *P. corneus* s. l. в пространстве главных компонент (*P. corneus* – тонкая линия, *P. grandis* – пунктирная тонкая линия, *P. banaticus* – жирная линия, *P. purpura* – пунктирная жирная линия).

Fig. 1. Areas of distributions of 4 assumed species *P. corneus* s. l. specimens under the main components analysis (*P. corneus* – thin line, *P. grandis* – thin faltering line, *P. banaticus* – fat line, *P. purpura* – fat faltering line).

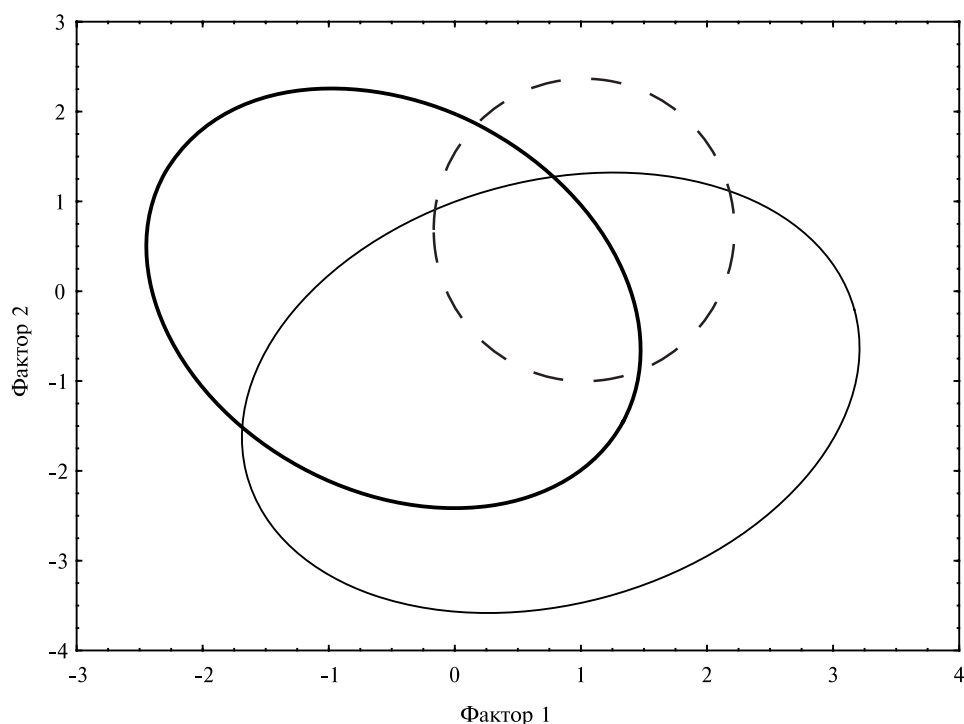


Рис. 2. Облака распределений особей *P. grandis* s. l. из трех географических популяций в пространстве главных компонент ( Вилково – тонкая линия, Житомир – жирная линия, Сумы – пунктирная).

Fig. 2. Areas of distributions of specimens of *P. grandis* s. l. from 3 geographic population under the main components analysis (Vilkovo – thin line, Zhytomir – fat line, Sumy – faltering line).

### Обсуждение

Таким образом, полученные результаты дают основания считать, что исследованные выборки моллюсков не являются группой, состоящей из 4 видов, а представляют собой один достаточно изменчивый вид. Эти симпатрические и даже симбиотопические «виды» не имеют эволюционно-генетической дискретности. Более того, все 4 «вида» имеют совершенно идентичный характер генотипической изменчивости, проявляющийся в единообразном распределении генотипов как в пределах, так и между географическими выборками.

Определенный интерес вызывает генетическая и в какой-то степени морфологическая обособленность моллюсков из Сум, для которых характерны фиксации альтернативных аллелей по ряду локусов неспецифических эстераз. Кроме того, моллюски этой серии отличались морфологическим единообразием на фоне гетерогенности дунайских и тетеревских популяций, что позволяет их легко отличить: для них характерна полупрозрачная желто-коричневая раковина, которая имеет наименьшие абсолютные значения всех измеренных параметров. Кроме того, моллюски сумской популяции характеризуются наименьшей скоростью нарастания оборотов и относительно большим устьем. Таким образом, вполне возможно, что *P. corneus* – это политипический вид (надвид), но только представленный серией викарирующих, замещающих аллоидов, возможно имеющих интрогрессивную гибридизацию друг с другом.

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.

- Макимова Т. И.* Морфологический и генетический анализ моллюсков семейства *Vulinidae* (*Gastropoda*, *Pulmonata*) фауны России и сопредельных территорий) : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб. : Зоол. ин-т РАН, 1995. — 28 с.
- Стадниченко А. П.* Прудовиковообразные (пузырчиковые, витушковые, катушковые). — Киев : Наук. думка, 1990. — 292 с. — (Фауна Украины; Т. 29, вып. 4).
- Старобогатов Я. И.* Класс *Gastropoda* // Определитель пресноводных беспозвоночных европейской части СССР (планктон и бентос). — Л. : Гидрометеиздат, 1977. — С. 166—169.
- Cracraft J.* Species concepts and speciation analysis // *Current ornithology*. — New York : Plenum Press, 1983. — Vol. 1. — P. 159—187.
- Glöer P.* Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. — Conch Books, 2002. — 327 p.
- Mayr E.* Animal species and evolution. — Cambridge : Belknap Press of Harvard University Press, 1963. — 432 с.
- McKittrick M. C., Zink R. M.* Species concepts in ornithology // *Condor*. — 1987. — **90**. — P. 1—14.
- Peacock A. C., Bunting S. L., Queen K. G.* Serum protein electrophoresis in acrylamide gel // *Science*. — 1965. — **147**. — P. 1451.