
doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.11.083>

УДК 597.551.2:593.61+575]

С.В. Межжерин, Т.В. Салий, А.А. Циба, А.А. Лосев

Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена НАН Украины, Киев

E-mail: mezh@izan.kiev.ua

Жизненные потенциалы амфимиктических и апомиктических щиповок (Cypriniformes, Cobitidae, *Cobitis*): сравнение по зараженности трипаносомами и числу ядерных фрагментаций

Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И.А. Акимовым

*Сравнительный анализ диплоидных и инвазионных полиплоидных щиповок рода *Cobitis* двух рек бассейна Среднего Днепра показал, что эти формы по степени устойчивости к инвазии кровяным паразитом *Trypanosoma cobitis* не отличаются, хотя доля фрагментированных ядер эритроцитов однозначно выше у полиплоидных форм (особенно тетраплоидных), чем у диплоидов. Тем не менее это негативное обстоятельство никак не сказывается на общей приспособленности триплоидных и тетраплоидных особей, представленность которых в водоемах Днепровского бассейна гораздо выше, чем диплоидов, и обусловлена экспансией, имевшей место в 1960-х гг. Исследованные показатели подвержены сезонной динамике. Максимальная зараженность достигается в первой декаде августа, а наибольшее число фрагментированных ядер эритроцитов приходится на сентябрь.*

Ключевые слова: *Cobitis*, диплоидно-полиплоидные формы, кровяные паразиты, микроядра.

Ответ на вопрос о причинах эволюционного замещения клонового способа воспроизводства половым размножением, связанным с мейозом и рекомбинацией, до сих пор не получен. Считается, что причинами эволюционного ухода от клоновости и приобретения генетической уникальности является способность амфимиктических организмов достигать более высокой приспособленности за счет удачного комбинирования генов [1]. Однако этот довод вызывает большие сомнения. Ведь период существования исключительно апомиктических организмов является самым длительным в истории жизни на Земле. Именно тогда произошли главные ароморфозы (образование эукариот, многоклеточность, фотосинтез и половой процесс), а значит клоновое размножение никак нельзя считать ненадежным и эволюционно бесперспективным. К тому же существует множество примеров того, что организмы, утратившие способность к амфимиксису и перешедшие на партеногенез, достигают биологического прогресса. Часто они многочисленнее амфимиктических предков и име-

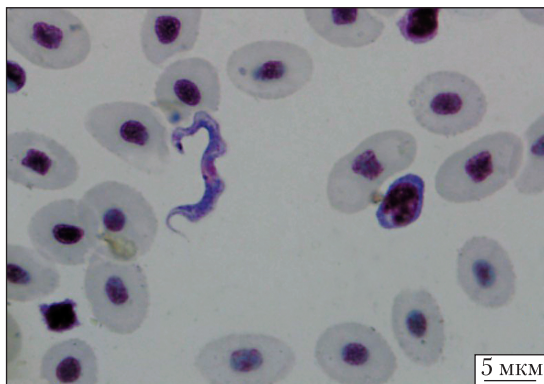


Рис. 1. Кровяной паразит *Trypanosoma cobitis* на мазке крови

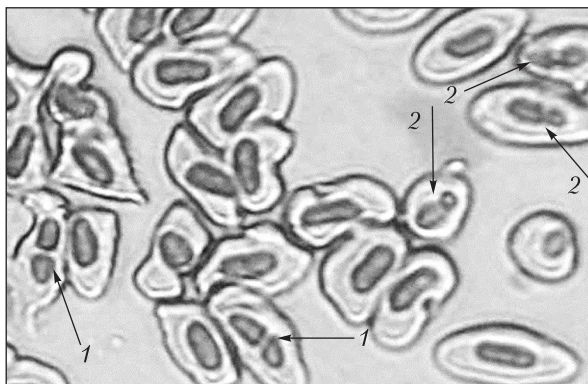


Рис. 2. Микрофотография эритроцитов с аномалиями ядер: 1 — двуядерные эритроциты; 2 — эритроциты с ядром с выраженной перетяжкой

ют более широкие ареалы [2]. К такого рода случаям можно отнести сосуществование амфимиктических диплоидных и апомиктических полиплоидных форм щиповок рода *Cobitis* в речных системах Центральной Европы. Причем в речных системах Азово-Черноморья (Дунае, Днепре, Днестре, Дону) численно преобладают полиплоиды (обычно триплоиды, тетраплоиды встречаются гораздо реже), которые являются гибридами щиповок обыкновенной *Cobitis taenia* Linnaeus, 1758 и донской *C. tanaitica* Băcescu, R. Mayer, 1969, с одной стороны, и дунайской *C. elongatoides* Băcescu, R. Mayer, 1969, с другой [3]. Размножаются полиплоиды гиногенезом, используя в качестве доноров сперматозоидов самцов диплоидных видов. Дунайская щиповка встречается исключительно в бассейне Дуная, поэтому есть все основания считать, что гибриды с участием этого вида первоначально образовались именно в этой речной системе, откуда распространились в соседние бассейны.

Известно, что вспышка численности полиплоидов на Среднем Днепре произошла в 1960-е гг. [4]. В результате полиплоиды дунайского происхождения преобладают по всем основным водотокам бассейна, вытеснив *C. taenia* на периферию жизненного пространства, в небольшие водоемы или верховья малых рек. Возникает вопрос о причине большей успешности инвазионных полиплоидов. Среди прочих причин ключевое значение могло иметь адаптивное преимущество полиплоидов, обусловленное высоким уровнем их гетерозиготности [5]. Можно предположить, что триплоиды будут более устойчивыми к инфекциям и инвазиям, также им должно быть свойственно более надежное функционирование генетического аппарата. С целью проверки этого предположения и проведено сравнительное исследование диплоидных и полиплоидных щиповок по таким характеристикам, как устойчивость к заражению кровепаразитическими жгутиконосцами *Trypanosoma cobitis* Mitrophanov, 1883 и проявления фрагментаций ядра. Последний показатель указывает на стабильность работы генетического аппарата и получил название микроядерного теста [6, 7].

Материалом для данного исследования послужили серии щиповок, собранные с мая по октябрь в 2015/16 гг. в р. Остер в пределах г. Нежин (51.0375, 31.9548) и в летний период в р. Стугна в окрестностях пгт Мотовиловка (50.1292, 30.1171). Разделение биотипов щи-

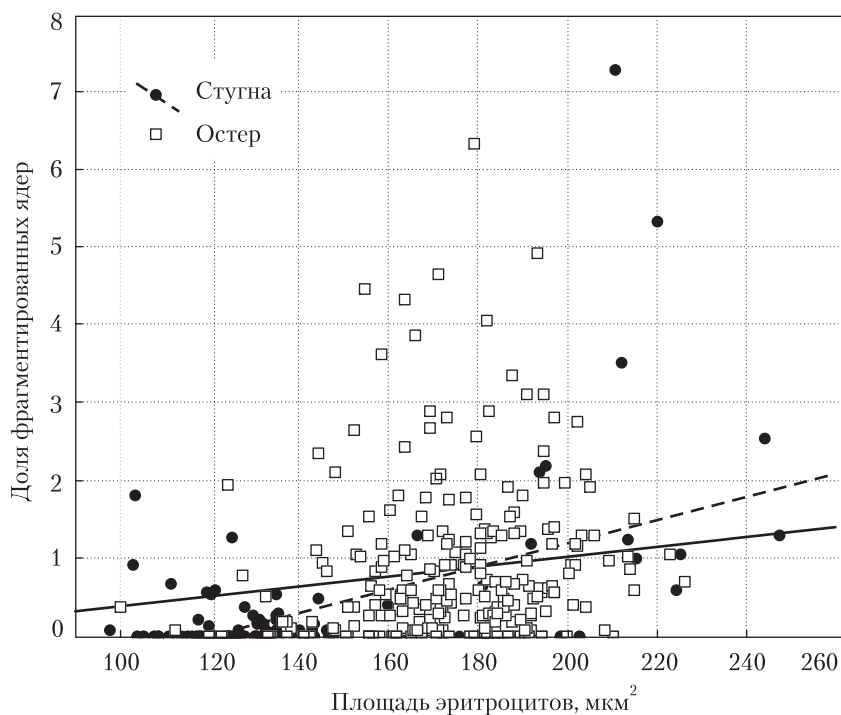


Рис. 3. Изменение доли фрагментированных ядер в мазках крови рыб в зависимости от площади эритроцитов в популяциях рек Стугна и Остер

повок по степени плоидности проводили двумя способами. С помощью аллозимного анализа путем выявления константных гетерозигот в локусах, определяющих белковые продукты, представленные в электрофоретических спектрах. Набор локусов и их описание приведены ранее [3]. Кроме того, был задействован цитометрический анализ — измерения эритроцитов на мазках крови. По размерам этих кровяных клеток можно четко определить степень плоидности генетического аппарата. Методика изготовления и анализа мазков крови, а также определения площади эритроцитов подробно описана ранее [8].

Таблица 1. Показатели зараженности щиповок рода *Cobitis* разного уровня плоидности трипаносомами *T. cobitis*

Река	Группа рыб	<i>N</i>	<i>Ex</i>	<i>M</i>	Max	SE
Остер	2 <i>n</i>	19	0,58	2,22	14	0,90
	3 <i>n</i>	216	0,69	6,68	176	1,22
	4 <i>n</i>	16	0,69	4,88	21	1,57
	В целом	251	0,68	6,21	176	1,08
Стугна	2 <i>n</i>	82	0,52	7,47	229	3,09
	3 <i>n</i>	22	0,32	0,77	7	0,35
	4 <i>n</i>	10	0,60	4,40	20	2,45
	В целом	114	0,49	5,91	229	2,24

Примечание. 2*n*, 3*n*, 4*n* — ди-, три- и тетраплоидные рыбы; *N* — число исследованных особей; *Ex* — экстенсивность заражения; *M* — средняя зараженность (среднее число паразитов на одну рыбу); Max — максимальная зараженность; SE — стандартная ошибка средней зараженности.

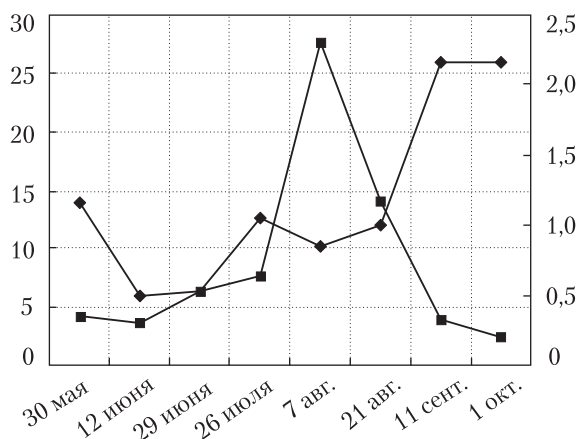


Рис. 4. Изменение адаптивных показателей в популяции щиповок р. Остер: левая шкала — среднее число трипаносом в мазке крови (трипаносомы) (■); правая — средняя доля микроядер (◆)

Степень зараженности щиповок кровяным паразитом *T. cobitis* устанавливали по препаратам сухих мазков крови, окрашенных по Гимза (рис. 1), которые были использованы и для цитометрического анализа, по методике, описанной ранее [9]. В качестве оценки зараженности рыб было принято общее число обнаруженных в мазке крови паразитов.

Фрагментацию ядер эритроцитов определяли по факту наличия клеток с двумя отдельными ядрами или с ядрами с четко видимой перетяжкой, делящей их пополам (рис. 2). Для определения степени фрагментации анализировали около 1000 недеформированных клеток.

В результате проведенного цитометрического и аллозимного анализа в каждой из речных систем были установлены группы щиповок трех уровней плоидности. В р. Остер преобладали триплоиды (87 %), с электрофоретическими спектрами, отвечающими генотипам *Aat-1*^{100-100/110}, *Mdh-1*^{100-100/110}, *Pt-2*^{aab}, *Pt-2*^{abb}, а также с размерами эритроцитов от 150 до 200 мкм², что свидетельствует об их принадлежности к клонам *C. elongatoides* — *taenia* — *tanaitica* или *C. elongatoides* — 2 *taenia*. Эти биотипы являются самыми обычными для среднеднепровского региона [3]. Около 6 % оказались тетраплоидами. Судя по электрофоретическим спектрам, они произошли от скрещиваний указанных выше триплоидов с самцами *C. taenia* и относятся либо к биотипу *C. elongatoides* — 2 *taenia* — *tanaitica*, либо к биотипу *C. elongatoides* — 3 *taenia*. Площадь их эритроцитов свыше 200 мкм². Диплоиды — особи *C. taenia*, у которых площадь эритроцитов до 145 мкм², составили около 7 %. В р. Стугна

Таблица 2. Показатели фрагментации ядер эритроцитов у щиповок рода *Cobitis* разного уровня плоидности

Река	Группа рыб	N	M	Max	SE
Остер	2n	19	0,57	2,35	0,19
	3n	216	0,85	6,34	0,07
	4n	16	1,13	2,78	0,18
	В целом	251	0,85	6,34	0,06
Стугна	2n	83	0,14	1,83	0,03
	3n	21	0,45	2,20	0,15
	4n	10	2,40	7,29	0,74
	В целом	114	0,39	7,30	0,09

Примечание. 2n, 3n, 4n — ди-, три- и тетраплоидные рыбы; N — число исследованных особей; M — средняя доля двуядерных эритроцитов; Max — максимальная доля двуядерных эритроцитов; SE — стандартная ошибка средней.

наблюдалась несколько иная ситуация. Здесь преобладали диплоиды *C. taenia* (73 %), следующими были триплоиды, причем в этой речной системе встречались как обычные *C. elongatoides* — *taenia* — *tanaitica* (15 %), так и редкие в бассейне Среднего Днепра *C. elongatoides* — 2 *tanaitica* (6 %). На тетраплоидов биотипов *C. elongatoides* — 2 *taenia* — *tanaitica* либо *C. elongatoides* — 3 *taenia* пришлось около 9 %.

Сравнение щиповок разных биотипов показало, что отличия по зараженности трипаносомой проявляются в обеих реках, однако направленность этих различий неоднозначна (табл. 1). Так, в р. Остер наибольшую степень заражения проявляют триплоиды. Отличия по средней зараженности статистически достоверны при сравнениях с диплоидами ($t = 2,94$; $p < 0,01$). Тетраплоиды заняли промежуточное положение и достоверно не отличались от диплоидов и триплоидов. Ситуация в р. Стугна была противоположной. В этой реке наибольшая степень заражения отмечалась у диплоидов, которые статистически достоверно отличались от триплоидов по показателю средней зараженности ($t = 2,15$; $p < 0,05$).

Анализ степени фрагментации ядра у щиповок разной пloidности дает явно более однозначные результаты, которые четко проявляются в увеличении доли фрагментированных ядер у полиплоидных особей (табл. 2). Если в р. Остер различия средних значений показателя фрагментации ядра были статистически достоверными только при сравнениях диплоидов и тетраплоидов ($t = 2,14$; $p < 0,05$), то в популяции р. Стугна достоверны все три возможных сравнения: диплоидов с триплоидами ($t = 2,03$; $p < 0,05$) и тетраплоидами ($t = 3,05$; $p < 0,01$), а также триплоидов с тетраплоидами ($t = 2,57$; $p < 0,05$). Эта тенденция нарастания числа фрагментированных ядер у полиплоидных организмов в зависимости от площади эритроцитов, отражающего пloidность генома, прослеживается и при регрессионном анализе (рис. 3). Ее достоверность также подтверждается корреляционным анализом, указывающим на положительную связь между изменчивостью этих двух показателей. Так, для популяции р. Остер положительная связь была невысока, хотя и достоверна ($r = 0,13$; $p < 0,05$), тогда как в поселении щиповок р. Стугна она существенно выше ($r = 0,50$; $p < 0,01$).

При этом определить какую-либо зависимость между зараженностью рыб и долей фрагментированных ядер не удалось. И это вполне естественно, поскольку в течение сезона эти два показателя меняются несинхронно (рис. 4). Так, максимальное заражение рыб наблюдается в первой декаде августа. В этот период все рыбы заражены, а среднее число паразитов на рыбу составляет 27,7. Осенью зараженность падает ниже весеннего уровня. Именно тогда резко возрастает доля эритроцитов с фрагментированными ядрами (см. рис. 3), что, вероятнее всего, связано с их старением.

Таким образом, подводя определенный итог проведенному исследованию, можно утверждать, что по таким важным адаптивным показателям, как резистентность к инвазиям и стабильность генетического аппарата, диплоидные и полиплоидные щиповки отличаются. Однако по устойчивости к трипаносомам различия не однозначны, поскольку в разных реках сильнее заражены либо диплоиды, либо триплоиды. Это указывает на одинаковую устойчивость диплоидных амфимиктических и полиплоидных апомиктических щиповок к жгутиконосцам крови. В то же время фрагментирование ядра у полиплоидных щиповок в обеих реках достоверно более выражено у полиплоидов, чем у диплоидов. Причем степень фрагментации ядра прямо пропорциональна повышению уровня пloidности. Тем не менее это обстоятельство, в конечном счете, никак не сказывается на общей приспособленности

полиплоидов, поскольку в целом по региону они явно более многочисленны, чем диплоиды. И более того, судя по тому, что полиплоиды имеют инвазионную природу, они активно вытеснили диплоидов в верховья мелких рек и изолированные небольшие водоемы.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ильинских Н. Н., Ильинских И. Н., Новицкий В. В., Ванчугова Н. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд.-во Томск. ун-та, 1992. 272 с.
2. Лосев А.А. Использование щиповки *Cobitis taenia* (Osteichthies: Cobitidae) для определения наличия кровяных паразитов рыб в водоеме. *Рybне господарство*. 2004. Вип. 63. С.139–142.
3. Межжерин С.В., Павленко Л.И. Генетическое разнообразие, происхождение и закономерности распространения полиплоидных щиповок (Cypriniformes, Cobitidae, *Cobitis*) в пределах Украины. *Цитология и генетика*. 2010. 44, № 5. Р. 65–77.
4. Межжерин С.В., Чудакорова Т.Ю. Экспансия триплоидных однополых щиповок *Cobitis taenia* L. 1758 (Cypriniformes, Cobitidae) в водотоках Украины. *Допов. Нац. акад. наук Укр*. 2001. № 9. С. 153–157.
5. Межжерин С.В., Чудакорова Т.Ю. Генетическая структура диплоидно-полиплоидного комплекса щиповок *Cobitis taenia* (Cypriniformes: Cobitidae) бассейна Среднего Днeпра. *Генетика*. 2002. 38, № 1. С. 86–92.
6. Мейнард Смит Дж. Эволюция полового размножения. Москва: Мир, 1981. 272 с.
7. Heddle J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res.* 1973. 18. Р. 187–190.
8. Vrijenhoek R.C., Angus R.A., Schultz R.J. Variation and heterozygosity in sexually vs. clonally reproducing populations of *Poeciliopsis*. *Evolution*. 1977. 31, № 4. Р. 767–781.
9. Vrijenhoek R.C., Parker J.E.D. Geographical parthenogenesis: general purpose genotypes and frozen niche variation. *Lost Sex: the Evolutionary Biology of Parthenogenesis*. Schön I., Martens K., Van Dijk P.J. (Eds). Springer: Dordrecht, 2009. Р. 99–131.

Поступило в редакцию 04.07.2017

REFERENCES

1. Il'inskih, N. N., Il'inskih, I. N., Novitskiy, V. V. & Vanchugova, N. N. (1992). Micronucleus analysis and cytogenetic instability. Tomsk: Izd-vo Tomsk. un-ty (in Russian).
2. Losev, A. A. (2004). Using of spined loach *Cobitis taenia* (Osteichthies: Cobitidae) for determination of fishes blood parasites in pond. *Rybne hospodarstvo*, Iss. 63, pp. 139-142 (in Russian).
3. Mezhzherin, S. V. & Pavlenko, L. I. (2010). Genetic diversity, origin and geographic distribution tendencies of polyploidy spined loaches in Ukraine body. *Cytology and Genetics*, 44, No. 5, pp. 65-77 (in Russian).
4. Mezhzherin, S. V. & Chudakorova, T. Yu. (2001). Expansion of triploid allfemalr spined loaches *Cobitis taenia* L. 1758 (Cypriniformes, Cobitidae) I water systems of Ukraine. *Dopov. Nac. acad. nauk Ukr.*, No. 9, pp. 153-157 (in Russian).
5. Mezhzherin, S. V. & Chudakorova, T. Yu. (2002). The Genetic structure of diploid-polyploid complex of the spined loach *Cobitis taenia* (Cypriniformes: Cobitidae) from the Middle Dnieper basin. *Rus. J. Genet.*, 38, Iss. 1, pp. 70-75.
6. Maynard, S. J. (1978). *The Evolution of Sex*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
7. Heddle, J. A. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res.*, 18, pp. 187-190.
8. Vrijenhoek, R. C., Angus, R. A. & Schultz, R. J. (1977). Variation and heterozygosity in sexually vs. clonally reproducing populations of *Poeciliopsis*. *Evolution*, 31, No. 4, pp. 767-781.
9. Vrijenhoek, R. C. & Parker, J. E. D. (2009). Geographical parthenogenesis: general purpose genotypes and frozen niche variation. In Schön I., Martens K., Van Dijk P.J. (Eds). *Lost Sex: the Evolutionary Biology of Parthenogenesis* (pp. 99-131). Springer: Dordrecht.

Received 04.07.2017

С.В. Межжерин, Т.В. Салий, О.О. Циба, О.О. Лосев

Інститут зоології ім. І.І. Шмальгаузена НАН України, Київ

E-mail: mezh@izan.kiev.ua

ЖИТТЄВІ ПОТЕНЦІАЛИ АМФІМІКТИЧНИХ І АПОМІКТИЧНИХ ЩИПОВОК
(CYPRINIFORMES, COBITIDAE, *COBITIS*): ПОРІВНЯННЯ ЗА ЗАРАЖЕНІСТЮ
ТРИПАНОСОМАМИ І ЧИСЛУ ЯДЕРНИХ ФРАГМЕНТАЦІЙ

Порівняльний аналіз диплоїдних та інвазійних поліплоїдних щиповок роду *Cobitis* двох річок басейну Середнього Дніпра показав, що ці форми за ступенем стійкості до інвазії кровопаразитичними джугутиконосцями *Trypanosoma cobitis* не відрізняються, хоча частка фрагментованих ядер еритроцитів однозначно вища у поліплоїдних форм (особливо тетраплоїдних), ніж у диплоїдів. Проте ця негативна обставина жодним чином не позначається на загальній пристосованості триплоїдних та тетраплоїдних особин, представленість яких у водоймах Дніпровського басейну набагато вища, ніж диплоїдів, і обумовлена експансією, що мала місце в 1960-х рр. Досліджені показники мають сезонну динаміку. Максимальна зараженість досягається в першій декаді серпня, а найбільше число фрагментованих ядер еритроцитів припадає на вересень.

Ключові слова: *Cobitis*, диплоїдно-поліплоїдні форми, кров'яні паразити, мікроядра.

S.V. Mezhzherin, T.V. Saliy, A.A. Tsyba, A.A. Losev

I.I. Schmalhausen Institute of Zoology of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: mezh@izan.kiev.ua

LIFE POTENTIAL OF AMPHIMICTIC AND APOMICTIC SPINED LOACHES
(CYPRINIFORMES, COBITIDAE, *COBITIS*): COMPARISONS BY THE INVASION
BY BLOODFISH PARASITES AND THE NUMBER OF NUCLEAR FRAGMENTATIONS

A comparative analysis of diploid and invasive polyploid spiny loaches of the genus *Cobitis* of two rivers of the Middle Dnieper basin showed that these forms do not differ in the degree of resistance to the invasion by bloodfish parasites *Trypanosoma cobitis*, although the fraction of fragmented nuclei of erythrocytes is unambiguously higher in polyploid forms (especially tetraploid forms) than in diploid forms. Nevertheless, this negative circumstance has no effect on the general fitness of triploid and tetraploid individuals, whose representation in the Dnipro basin is much higher than that of the diploids and is due to the expansion that took place in the 1960s. The studied indicators are subject to seasonal dynamics. The maximum contamination is achieved in the first decade of August, and the greatest number of fragmented nuclei of red blood cells falls in September.

Keywords: *Cobitis*, diploid-polyploid forms, blood parasite, micronucleus.