

УДК 595.142:575

## ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ *APORRECTODEA CALIGINOSA* (OLIGOCHAETA, LUMBRICIDAE)

Козиненко І. І., Заводникова Н. С., Жалай Е. І.

**Імуногенетичний аналіз дощових черв'яків *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta, Lumbricidae).** – І. І. Козиненко, Н. С. Заводникова, О. І. Жалай. – За допомогою методу трансплантації графтів шкіри проведено імуногенетичний аналіз двох популяцій амфіміктичних дощових черв'яків *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta, Lumbricidae). З'ясована варіабельність по антигенах гістосумісності. Виявлена група дощових черв'яків, у яких відсутня реакція відторгнення чужорідних тканин при алотрансплантації. За такими характеристиками цю групу дощових черв'яків можна вважати клоном.

**Ключові слова:** дощові черви, імуногенетичний аналіз, антигени гістосумісності, клони.

**Адреса:** Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України, вул. Б. Хмельницького 15, Київ 01601; e-mail: kozinenko@gmail.com, zhalai@ukr.net

**Immunogenetic analysis of earthworms *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta, Lumbricidae).** - I.I. Kozinenko, N.S. Zavodnikova, E.I. Zhalai. - The method of transplantation of dermal grafts was performed in order to accomplish an immunogenetic analysis of two populations of amphimictic earthworms *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta, Lumbricidae). The variability of histocompatibility antigens has been established. A group of earthworms has been identified in which there is no tissue rejection after the allografting. According to these features the earthworms in this group can be considered to be a clone.

**Keywords:** earthworms, immunogenetic analysis, histocompatibility antigens, clones.

**Address:** I.I. Schmalhausen Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Khmelnytsky 15, Kyiv 01601; e-mail: kozinenko@gmail.com, zhalai@ukr.net

### Введение

Вопросы гибридизации, полиплоидии, партеногенеза и клоновой структуры видов с апомиктическим размножением в последние десятилетия становятся наиболее актуальной темой систематической зоологии. Явление природного клонирования, размножения без рекомбинации, распространено от дафний до пресмыкающихся [1].

Наличие клоновой структуры доказано для многих видов животных - некоторых представителей свободноживущих плоских червей [28], брюхоногих моллюсков [25], разнообразных видов дафний [12; 20], равноногих ракообразных [29], разных видов насекомых [26], карповых рыб [4], саламандр [13] и ящериц [27].

В частности, при перекрестной трансплантации графтов была доказана генетическая идентичность особей некоторых ящериц. Установлено, что однополые виды – *Cnemidophorus velox*, *C. neomexicanus* (Teiidae), *Lacerta unisexualis* (Lacertidae) – являются клонами и ведут начало от одной или нескольких самок [2;

15; 16;]. Также доказано, что среди гибридных форм гольяна диплоидная (амфигаплоидная) форма, *Phoxinus eos-neogaeus*, размножается путем гиногенеза. Установлено, что все особи этой формы представляют клон [19; 21], в то время как триплоидные особи, отловленные в том же водоеме, генетически не идентичны. Об этом свидетельствует отторжение фрагментов трансплантированных плавников. Установлено, что эти особи произошли при повторном скрещивании клональной гибридной формы с самцами *Phoxinus eos* [18; 22; 23].

Изучение клональных форм проводят разными методами, как молекулярно-генетическими, так и иммуногенетическими.

Детальное изучение структуры поселений некоторых беспозвоночных, проведенное при помощи генного маркирования показало, что некоторые виды представлены однополыми популяциями, которые состоят из полиплоидных особей, размножающихся апомиктически, т. е. при помощи партеногенеза, что подтверждается клоновой структурой поселений. Причем, практически во всех случаях им присуща

поликлональность – наличие нескольких серий генетически идентичных особей [3; 6; 7; 8; 9; 10; 14; 24; 30].

Явление партеногенеза довольно распространено и среди дождевых червей. Приблизительно треть люмбрицид – партеногенетические виды [3]. Особый интерес вызывают партеногенетические виды дождевых червей, у которых изучена генетическая структура. Однако, несмотря на проведенный генетический анализ, остается неизвестным вопрос имеем ли мы дело с настоящими клонами, особи которых идентичны между собой. Подтверждением клональной структуры могут стать результаты иммуногенетического анализа, свидетельствующие об отсутствии реакции отторжения при перекрестной пересадке графтов между представителями группы.

Целью исследования и является проведение иммуногенетического анализа дождевых червей рода *Aporrectodea* для уточнения наличия у них клонов.

#### Материал и методы исследований

Проведен иммуногенетический анализ двух популяций дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta, Lumbricidae). Выборки получены из Киевской (с. Глеваха) и Житомирской (с. Ерчики) областей. Среди исследованных *A. caliginosa* Киевской обл. присутствуют две формы, различающиеся окраской покровов. Морфа 1 имеет светло бурый головной конец тела, а морфа 2 – темный. По этому признаку червей разделили на две группы. Всего исследовано 150 особей.

Выполнено два вида трансплантации – аллотрансплантация (пересадки кожных графтов между особями одной группы) и ксенотрансплантация (между представителями морфы-1 и морфы-2). Обмен графтами осуществляли по общепринятой методике, разработанной для дождевых червей [17]. Результаты трансплантации оценивали в баллах по скорости прохождения латентной фазы (период распознавания иммунокомпетентными клетками реципиента антигенов донора), появления признаков некроза и отторжения чужеродных тканей. Данные обработаны статистически.

#### Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования по аллотрансплантации свидетельствуют о неоднородности особей в изученных популяциях, что раньше было доказано при помощи генного маркирования [11]. Так в выборках из Киевской (морфа-1) и Житомирской обл., несмотря на кажущуюся разницу по продолжительности латентной фазы (разница не достоверна) дождевые черви гетерогенны по антигенам гистосовместимости (табл.1). Их различает только доля реагирующих по каждой выборке и скорость протекания процесса отторжения. Так среди *A. caliginosa* (морфа-1) доля особей отторгающих чужеродные ткани значительно ниже (более чем в два раза) по сравнению с житомирской выборкой. Свидетельствует ли этот факт о большей степени родства между дождевыми червями морфы-1 в киевской выборке? Возможно, поскольку для этих червей характерен затяжной период распознавания чужеродных антигенов, как и сам процесс отторжения графтов (min начало реакции на 13 и 30 сут. соответственно).

Таблица 1. Результаты алло- и ксенотрансплантации у дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta, Lumbricidae)

Вид (морфа)	Область	Трансплантация (вид)	Доля реагирующих особей	Длительность латентной фазы (в сутках)		
				Min	Max	M ± σ
<i>Ap. caliginosa</i>	Житомирская	Аллотрансплантация	0.833 p=0.0019	13	20	16.857±2.734
<i>Ap. caliginosa</i> , морфа 1	Киевская	Аллотрансплантация	0,375 p=0.0762	30	51	41.583±7.993
<i>Ap. caliginosa</i> , морфа 2	Киевская	Аллотрансплантация	0.000	0	0	0
<i>A. caliginosa</i>	Киевская	Ксенотрансплантация (между морфами 1 и 2)	0.920 p=0.0019	8	46	24.125±15.789

А для *A. caliginosa* (морфа-2) за весь период наблюдения (более трех месяцев) процесс отторжения чужеродных тканей так и не наступил. Этот факт может свидетельствовать о гомогенности особей по антигенам гистосовместимости. Также этот факт свидетельствует в пользу определения дождевых червей морфы-2 как клона. Ранее проведенные генетические исследования подтверждают такой вывод [9].

В то же время контрольный опыт по пересадке тканей между особями *A. caliginosa* морфы-1 и морфы-2 доказывает, что дождевые черви морфы-2 способны распознавать чужеродные антигены. Так при ксенотрансплантации доля ответивших особей превышала 90%, латентная фаза в среднем продолжалась 24 дня.

Значительные отличия наблюдаются у дождевых червей *A. caliginosa* при сравнении динамики процесса отторжения чужеродных тканей (рис. 1).

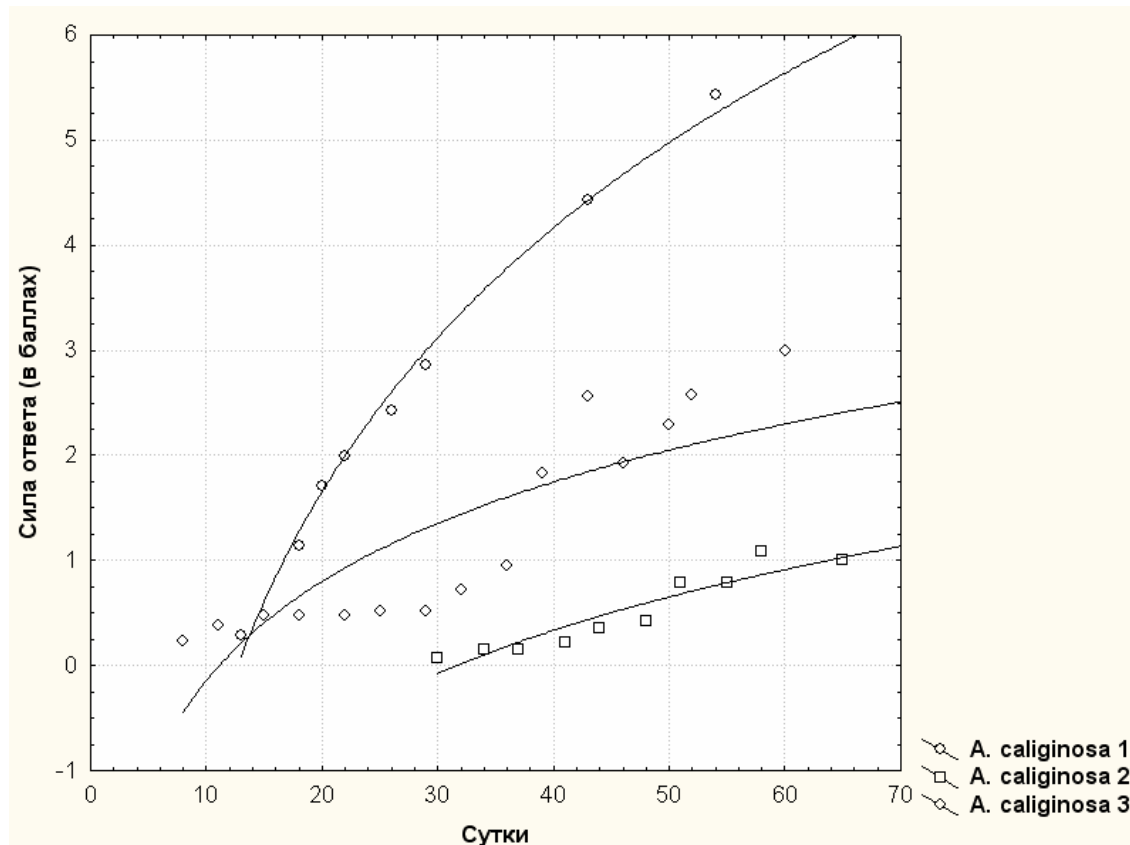


Рисунок 1. Динамика отторжения алло- и ксенотрансплантатов у дождевых червей *A. caliginosa*

Примечание: *A. caliginosa*-1 – аллотрансплантации житомирской популяции; *A. caliginosa*-2 – аллотрансплантации киевской популяции морфа-1; *A. caliginosa*-3 – ксенотрансплантации морфы-1 и морфы-2 киевской популяции

Данные по аллотрансплантации у дождевых червей разных выборок свидетельствуют, что они отличаются по скорости протекания отторжения чужеродных тканей. Так у червей из житомирской выборки латентная фаза проходит за короткий период времени (8 – 20 сут.). Напротив, у особей из киевской выборки (морфа-1) – продолжительность латентной фазы затягивается на 30 – 51 день, а доля ответивших не превышает 0,375%. Черви группы морфы-2 вообще не реагируют на пересаженные аллотрансплантаты, что с высокой степенью вероятности позволяет определить данную группу червей как клон. Для дождевых червей, которые характеризуются коротким латентным периодом распознавания

иммунными клетками реципиента чужеродных антигенов донора, также характерна и относительно высокая скорость процесса отторжения чужеродной ткани. Медленнее всего процесс отторжения проходит у червей *A. caliginosa* морфы-1. Для особей этой группы характерен не только затяжной латентный период распознавания чужеродных антигенов, но и очень медленное прохождение самого процесса отторжения. По нашему мнению, факт свидетельствует о некоторой степени родства тканевых антигенов у особей в данной группе. Но все же, дождевые черви морфы-1, в отличие от червей морфы-2, не являются клоном.

## Выводы

1. Установлена иммунногенетическая вариабельность некоторых популяций дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* (*Oligochaeta, Lumbricidae*).

2. Выявлена группа дождевых червей *Aporrectodea caliginosa*, у которых отсутствует реакция при аллотрансплантации, что характерно для идентичных по антигенам гистосовместимости особей и дает право считать их клоном.

1. Гребельный С. Д. Клонирование в природе. Роль остановки генетической рекомбинации в формировании фауны и флоры. – Санкт-Петербург, 2008. – 283 с.
2. Даревский И. С. Даниелян Ф. Д. Изучение степени генетической однородности однополого вида скальной ящерицы (*Lacerta unisexualis* Darevsky) методом приживления кожного трансплантата // Труды Зоол. ин-та АН СССР. – 1979. – Т. 89. С. 65 – 70.
3. Малинина Т. В., Перель Т. С. Характеристика хромосомных рас *Eisenia nordenskioldi* (*Oligochaeta, Lumbricidae*) с использованием биохимических маркеров // Доклады АН СССР. – 1984. – Т. 279, №5. – С. 1265–1269.
4. Межжерин С. В., Кокодий С. В. О полифилитичности европейского триплоидного карася *Carassius gibelio* // Доповіді Національної академії наук України. 2006. №7. С.169-174.
5. Межжерин С. В., Кокодий С. В. Поликлоновая структура европейских серебряных карасей *Carassius auratus s. lato* в водоемах Украины // Доповіді НАН України. – 2008. – № 7. – С. 162-169.
6. Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю., Некрасова О. Д. Устойчивое сохранение аберрантных электроморф в гибридных популяциях зеленых лягушек *Rana esculenta* L., 1758 complex // Доповіді Національної академії наук України. – 2001. – №12. – С. 138–141.
7. Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю., Пионтковская Е. А. Эволюционно-генетическая дифференциация таксонов амфибий // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123, – №1. – С. 24–30.
8. 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 // Доповіді НАНУ. 2007. №8. С.151-156.
9. Межжерин С. В., Власенко Р. П., Гарбар А. В. Особенности генетической структуры комплекса пашенных червей *Aporrectodea* (superspecies) *caliginosa* (*Oligochaeta, Lumbricidae*) на территории Украины // Цитология и генетика. 2008. Т.42, № 4. С. 50-57.
10. Межжерин С. В., Гарбар А. В., Онищук И. П., Власенко Р. П., Жалай Е. И. Клоновое разнообразие партогенетических видов дождевых червей в фауне Украины // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2008. – Т. 6. №1. – С. 88 – 92.
11. Межжерин С. В., Гарбар А. В., Онищук И. П., Коцюба И. Ю., Власенко Р. П., Жалай Е. И. Генетическая структура диплоидно-полиплоидных комплексов дождевых червей (*Oligochaeta: Lumbricidae*) фауны Украины // Факторы экспериментальной эволюции организмов. Киев. Логос. 2009. С.16-20.
12. Beaton M. J. and Hebert P.D.N. Geographical parthenogenesis and polyploidy in *Daphnia pulex* // Amer. Naturalist.- 1988.- Vol. 132.- P.837-845.
13. Bogart J. P., Lowcock L. A., Zeyl C. W., and Mable B. K. Genome constitution and reproductive biology of hybrid salamanders, genus *Ambystoma*, on Kelleys Island in Lake Erie // Canad. J. Zool.- 1987.- Vol.65.- P.2188-2201.
14. Christensen B. Animal cytogenetics V. 2. – Berlin; Stuttgart: Gebrüder Borntraeger, 1980. – 81 p.
15. Cuellar O. Interclonal histocompatibility in a parthenogenic lizard: Evidence of genetic homogeneity // Science. – 1976. – v.193. – P. 150 – 153.
16. Cuellar O. Genetic homogeneity and speciation in the parthenogenetic lizards *Cnemidophorus velox* and *C. neomexicanus*: Evidence from intraspecific histocompatibility // Evolution. – 1977. – v. 31. – P. 24 – 31.
17. Cooper E. L., Roch P. Earthworm leukocyte interactions during early stages of graft rejection // The Journal of experimental zoology. – 1984. – v. 232. – P. 67 – 72.
18. Dawley R. M., Goddard K. A. Diploid-triploid mosaics among unisexual hybrids of the minnows *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaetus* // Evolution. – 1988. – v. 42. – P. 649 – 659.
19. Dawley R. M., Schultz R. J., Goddard K. A. Clonal reproduction and polyploidy in unisexual hybrids of *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaetus* (Pisces; Cyprinidae) // Copeia. – 1987. – 2. – P. 275 – 283.
20. Dufresne F. and Hebert P.D.N. Hybridization and origin of polyploidy // Proc. Royal Soc. London. Ser. B.- 1994.- Vol.258.- P.141-146.
21. Elder J. F., Schlosser I. J. Extreme clonal uniformity of *Phoxinus eos/neogaetus* gynogens (Pisces: Cyprinidae) among variable habitats in northern Minnesota beaver ponds // Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington). - 1995. – v. 92. P.5001 – 5005.
22. Goddard K. A., Dawley R. M., Dowling T. E. Origin and genetic relationships of diploid, triploid and diploid-triploid mosaic biotypes in the *Phoxinus eos-neogaetus* unisexual complex // Dawley R. M., Bogart J. P. (Eds). Evolution and ecology of unisexual vertebrates. Bulletin 466. New York State Museum. Albany. New York – 1989. – P. 268 – 280.
23. Goddard K. A., Megwinoff O., Wessner L. L., Giaimo F. Confirmation of gynogenesis in *Phoxinus eos-neogaetus* (Pisces; Cyprinidae) // Heredity. – 1998. - v. 89. P. 151 – 157.
24. Jaenike J, Ausubel S, Grimaldi D. A. On the evolution of clonal diversity in parthenogenetic earthworms // Pedobiologia . – 1982. – Vol. 23, № 4. – P. 304–309.
25. Johnson A. G. and Leefe W. R. Clonal diversity and phylogenetic origin of hybrid and spontaneous partenogenetic *Campeloma* (Gastropoda: Viviparidae) from the south-eastern United States // Journ. of Evol. Biol.- 1999.- Vol.12.- P.1056-1068.
26. Lokki J., Saura A., Launinen P. and Suomalainen E. Genetic polymorphism and evolution in parthenogenetic animals. VI. Diploid and triploid *Polydrosus mollis* (Coleoptera: Curculionidae) // Hereditas.- 1976.- Vol. 82.- P.209-216.
27. Moritz C. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae): evidence for recent and localized origins of widespread clones // Genetics.- 1991.- Vol. 129.- No.1.- P. 211-219.
28. Pongratz N., Sharbel T.F., Beukeboom L.W. and Michiels N.K. Allozyme variability in sexual and parthenogenetic freshwater planarians; evidence for polyphyletic origin of parthenogenetic lineages through hybridization with coexisting sexuals // Heredity.- 1998.- Vol.81.-P.1075-1080.
29. Theisen B. F., Christensen B. and Arctander P. Origin and clonal diversity in triploid parthenogenetic *Trichoniscus pusillus* (Isopoda, Crustacea) based upon allozyme and nucleotide sequence data // Journ. of Evol. Biology.- 1995.- Vol.8.-P. 71-80.
30. Zhukovskaia E.A., Kodolova O.P., Pravdichina O.I. et al. Study of genetic diversity of earthworm *Lumbricus rubellus* Hoff. (*Oligochaeta, Lumbricidae*) // Izv. Akad. Nauk Ser. Biol. – 2005. – Vol. 5. – P. 625–627.

Отримано: 08 січня 2013 р.

Прийнято до друку: 12 жовтня 2013 р.