

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ЗООЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

Том LV

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

8

МОСКВА 1976

**О СИСТЕМЕ МЫШЕЧНЫХ ЭСТЕРАЗ У МОЛЛЮСКА
*LYMNAEA STAGNALIS***

Б. М. ЛОГВИНЕНКО, С. М. ГЕРМАН, О. П. КОДОЛОВА и В. М. МАКЕЕВА

*Лаборатория биологии развития животных Биологического факультета
Московского государственного университета*

Методом электрофореза в пластинах полиакриламидного геля исследованы 542 экз. моллюсков *Lymnaea stagnalis* (L.) из 4 пунктов Московской обл. На фоне постоянства системы миогенов обнаружены три типа мышечных эстераз, которые могут трактоваться как фены двухаллельной кодоминантной системы. При статистическом сравнении фенотипических групп не обнаружены различия между раковинами. Анализ мышечных эстераз и морфологическое сравнение фенотипических групп не позволяет рассматривать фены эстераз этого вида как видоспецифичные признаки, а колебание частот аллелей от 0 до 1 дает возможность применить эту систему для целей популяционного анализа.

Для изучения популяционной структуры видов все чаще привлекают современные биохимические методы, в частности, электрофоретическое исследование полиморфных ферментов (изоферментов). Это позволяет выявлять сравнительно простые, удобные для анализа, генетически детерминированные системы признаков.

При поисковых опытах с несколькими ферментами на ряде видов моллюсков нам удалось обнаружить достаточно удобную систему мышечных эстераз у широко распространенного вида *Lymnaea stagnalis* (L.).

Методом электрофореза в пластинах полиакриламидного геля были исследованы 542 экз. из следующих пунктов Московской обл.: два пруда в окрестностях г. Звенигород, ручей в окрестностях г. Жуковский, пруд в районе г. Реутово.

Моллюсков живыми доставляли в лабораторию. Отпрепарированную непосредственно перед опытом мышцу ноги промывали трисфосфатным буфером (рН — 6,7) и гомогенизировали с тем же буфером в соотношении 1 : 1. Гомогенат центрифугировали (15 тыс. оборотов в 1 мин) в течение 30 мин с охлаждением. Для анализа брали надосадочную жидкость, смешанную с 60%-ным раствором сахарозы. Электрофорез проводили в вертикальных двуслойных пластинах полиакриламидного геля с системой прерывистых буферов. Конструкция камеры (Трувеллер и Нефедов, 1974) позволяла одновременно проводить анализ 46 образцов белка в двух пластинах геля. Каждая пластина (170×75×3 мм) состояла из нижнего разделяющегося геля (концентрация акриламида 7,5%, высота слоя 55 мм), приготовленного на трисхлоридном буфере (рН — 8,9) и верхнего концентрирующего геля (концентрация акриламида 5%, высота слоя 20 мм), приготовленного на трисфосфатном буфере (рН — 6,9). При полимеризации в каждой пластине формировали по 23 лунки (3×1 мм). Пробы вносили в лунки путем подслаивания под буфер. При электрофорезе применяли электродный трисглициновый буфер (рН — 8,3). В качестве подвижной метки использовали бромфенол

голубой. До вхождения метки в разделяющий гель устанавливали напряжение 200 в при силе тока 65 ма, после вхождения — 400 в при 100 ма. Электрофорез заканчивали, когда метка достигала нижнего края геля. Одновременную окраску и фиксацию миогенов проводили слабым раствором кумаси в 20%-ной трихлоруксусной кислоте. При окрашивании мышечных эстераз использовали красный прочный TR и α -нафталин ацетат.

По морфологическим признакам *L. stagnalis* достаточно четко отличается от других представителей этого рода и поэтому выделяется в отдельный монотипический подрод или даже род. Чтобы убедиться в видовой гомогенности нашего материала, мы провели сравнение систем миогенов всех исследованных экземпляров. У *L. stagnalis* удалось выявить до 23 фракций миогенов. Видоспецифичность миогенов показана на многих видах животных, в том числе и на моллюсках (Логвиненко и Кодолова, 1971; Кодолова и Логвиненко, 1973, 1974). При сравнении систем миогенов всех исследованных экземпляров *L. stagnalis* различий обнаружить не удалось, что подтвердило принадлежность их к одному виду.

При анализе мышечных эстераз обнаружены три варианта (см. рисунок). Первый вариант имел только одну фракцию с электрофоретической подвижностью 0,45, второй — две фракции с электрофоретической подвижностью 0,40 и 0,36, третий — все три фракции.

Можно предположить, что полученные три варианта эстераз представляют собой фены двухаллельной кодоминантной системы, так как типы изоферментов обычно детерминированы генетически. В таком случае первый и второй типы следует рассматривать как гомозиготы A_1A_1 и A_2A_2 , контролируемые аллелями A^1 и A^2 , а третий — как гетерозиготу A_1A_2 .

Для проверки нашей гипотезы проведен анализ выборок на равновесность в соответствии с уравнением Харди — Вайнберга. Результаты этого анализа представлены в табл. 1.

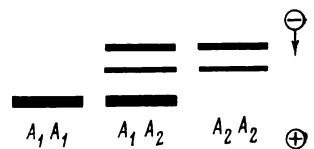


Схема обнаруженных типов мышечных эстераз у моллюска *L. stagnalis*

Таблица 1

Анализ на равновесность выборок *L. stagnalis* по системе мышечных эстераз

Места сбора	№ пробы	n	Фен	Наблюдаемая частота	Частота аллеля	Ожидаемая частота	χ^2
Пруд в районе г. Звенигород	1	117	A_1	50	0,641	46,6	0,596
			A_1A_2	50		51,9	
			A_2	17		14,5	
	2	92	A_1	32	0,594	32,5	0,014
			A_1A_2	45		44,4	
			A_2	15		15,2	
1+2	209	A_1	82	0,620	78,8	0,472	
		A_1A_2	95		96,6		
		A_2	32		29,6		
Ручей в районе г. Жуковский	47	A_1	28	0,766	27,6	0,156	
		A_1A_2	16		16,8		
		A_2	3		2,6		

Из разных участков пруда в районе Звенигорода были взяты две выборки *L. stagnalis* (117 и 92 экз.). Как видно из приведенных в таблице данных, каждая из них равновесна по системе мышечных эстераз. Равновесие сохраняется при объединении этих выборок, что указывает на

их возможную принадлежность к одному распределению. Такое же соответствие эмпирически наблюдаемого распределения фенотипов мышечных эстераз с теоретически ожидаемым получено при анализе выборок *L. stagnalis* из ручья в районе г. Жуковский (табл. 1).

Таким образом, анализ на равновесность показывает, что выявленные нами типы эстераз, по-видимому, составляют генетически детерминированную двухаллельную систему. В таком случае возникает возможность проводить сравнение выборок по частоте одного из аллелей с целью выяснения их принадлежности к той или иной генетически однородной популяции.

Сравнение двух проб из одного пруда в районе г. Звенигород по частоте аллеля A^1 показывает, что они достоверно не различаются (табл. 2). Это позволяет считать, что нет оснований относить их к раз-

Таблица 2

Сравнение разных выборок *L. stagnalis* по частоте аллеля A^1
(критерий Фишера с использованием ϕ -преобразования)

Места сбора	№ пробы		Частота аллеля A^1	F	F_p	Вероятность различия
Пруд в районе г. Звенигород	1	117	0,641	0,969	$F_{0,95} = 3,9$	Недостоверно
	2	92	0,594			
Там же	1+2	209	0,620	7,809	$F_{0,99} = 6,7$	$>0,99$
Ручей в районе г. Жуковский	1	47	0,766			

ным популяциям и можно рассматривать как одну выборку. Если сравнить эту выборку с выборкой из ручья в районе г. Жуковский по частоте аллеля A^1 , то обнаруживается достоверное различие, что указывает на принадлежность этих двух выборок к разным популяциям. Аналогичные результаты получаются при сравнении всех этих выборок по распределению фенотипов мышечных эстераз (табл. 3).

Таблица 3

Сравнение разных выборок *L. stagnalis* по распределению фенотипов мышечных эстераз

Места сбора	Проба №		Распределение фенотипов			χ^2	Вероятность различия
			A_1	A_1A_2	A_2		
Пруд в районе г. Звенигород	1	117	50	50	17	1,369	Недостоверно
	2	92	32	45	15		
Там же	1+2	209	82	95	32	7,084	$>0,95$
Ручей в районе г. Жуковский	3	47	28	16	3		

Выборка из лесной канавы в районе г. Звенигород (138 экз.) и выборка из пруда в районе г. Реутово (105 экз.) оказались мономорфными по фенотипам эстераз, причем первая была представлена только фенотипом A_2 , а вторая — только фенотипом A_1 . Можно считать, что в последних двух случаях мы имеем дело с популяциями гомозиготными по A^1 и A^2 .

Учитывая, что ряд авторов трактуют различия по эстеразам как видовые (Берч и др., 1971; Grossu et Tesio, 1972; Gudrun, 1973), определенный интерес представляет сравнение экземпляров с разными фенотипами эстераз по морфологическим признакам.

Для морфологического сравнения были использованы следующие общепринятые отношения (индексы): ширины раковины к ее высоте (шр/вр), высоты устья к высоте раковины (ву/вр), ширины устья к его

высоте (шу/ву). В табл. 4 представлены результаты статистического сравнения фенотипических групп по указанным морфологическим признакам. Как видно из приведенных данных, не удалось обнаружить статистически достоверных различий по исследованным признакам между фенотипическими группами внутри выборки.

Таблица 4

Сравнение некоторых морфологических признаков *L. stagnalis* из выборок, разделенных по фенам эстераз

Признаки (индекс)	Фен		$M \pm m$	Критерии различия, t	Вероятность различия, p
Пруд в районе г. Звенигород					
шр/вр	A_1	82	$48,82 \pm 0,40$	1,63	Недостаточно » »
	A_1A_2	95	$47,03 \pm 1,04$	0,16	
	A_2	32	$48,99 \pm 1,01$	1,39	
ву/вр	A_1	82	$53,08 \pm 0,42$	0,69	0,42
	A_1A_2	95	$52,57 \pm 0,64$	0,80	
	A_2	32	$53,52 \pm 0,40$	0,80	
шу/ву	A_1	82	$67,21 \pm 1,08$	1,06	0,17
	A_1A_2	95	$68,51 \pm 0,67$	0,89	
	A_2	32	$67,46 \pm 1,17$	0,89	
Пруд в районе г. Жуковский					
шр/вр	A_1	28	$48,07 \pm 0,63$	0,58	0,59
	A_1A_2	16	$47,49 \pm 0,80$	0,20	
	A_2	3	$47,16 \pm 1,47$	0,20	
ву/вр	A_1	28	$48,26 \pm 0,55$	0,44	1,46
	A_1A_2	16	$48,68 \pm 0,75$	0,80	
	A_2	3	$49,48 \pm 0,63$	0,80	
шу/ву	A_1	28	$68,08 \pm 0,65$	0,26	0,30
	A_1A_2	16	$68,40 \pm 1,06$	0,39	
	A_2	3	$67,16 \pm 2,99$	0,39	

Таким образом, анализ мышечных эстераз *L. stagnalis* и морфологическое сравнение фенотипических групп не позволяют рассматривать фены эстераз этого вида как видоспецифичные признаки. Система мышечных эстераз этого вида представляет собой генетически детерминированную двухаллельную систему, а колебание частот аллелей от 0 до 1 дает возможность применить эту систему для целей популяционного анализа.

ЛИТЕРАТУРА

- Берч Дж. Б., Линдсей Г. К. и Ловерде П., 1971. Сравнительное исследование некоторых польских и американских лимнейд (*Gastropoda*, *Basommatophora*): оценка филогенетических связей, Зоол. ж., 50, 8: 1158—1168.
- Кодолова О. П., Логвиненко Б. М., 1973. Сравнение разных популяций двусторчатых моллюсков *Unio pictorum* и *U. tumidus* (Unionidae) по системам миогенов и морфологии раковин, Зоол. ж., 52, 7: 987—998.— 1974. Сравнение разных популяций двусторчатых моллюсков рода *Anodonta* (Unionidae) по системам миогенов и морфологии раковин, Зоол. ж., 53, 4: 531—545.
- Логвиненко Б. М., Кодолова О. П., 1971. О возможности дифференцирования видов двусторчатых моллюсков путем сравнения электрофорграмм мышечных водорастворимых белков, Зоол. ж., 50, 6: 923—925.
- Трувеллер К. А., Нефедов Г. Н., 1974. Многоцелевой прибор для вертикального электрофореза в параллельных пластинках полиакриламидного геля, Научн. докл. высш. школы, сер. биол. наук, 9, 129: 137—140.
- Grossi A. V., Tesio C., 1972. Anatomical and electrophoretic studies of the amphidromic problem in some species of the genus *Alopiia*, Rev. roum. biol. Ser. Zool., 17, 5: 335—342.
- Gudrun W.-A. 1973. Electrophoretic studies on esterases of some african *Biomphalaria* spp. (Planorbidae), Malacologia, 12, 1: 115—122.