

УДК 594.382.5:575. 2(477)

Т. Н. ЧЕРНЫШОВА, А. В. ГАРБАР

Житомирский государственный университет им. Ивана Франко
ул. Большая Бердичевская, 40, Житомир, 10008, Украина

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *LIMAX CINEREONIGER* WOLF, 1803 (LIMACIDAE) НА ТЕРИТОРИИ УКРАИНЫ

В результате анализа аллозимной изменчивости установлено, что у *L. cinereoniger* амфимиксис характерен для природных популяций, тогда как синантропные популяции представлены генетическими линиями с фиксированными гомо- и гетерозиготными генотипами. Отсутствие промежуточных аллозимных спектров в условиях сосуществования доказывает репродуктивную изоляцию последних. Хромосомный набор *L. cinereoniger* характеризуется стабильностью и консервативностью ($2n=62$; $n=31$). Амфимиктическая форма существенно отличается от других по параметрам половой системы (уровень дискриминации 81,82%).

Ключевые слова: слизни, амфимиксис, генотип, биотип, кариотип

Limax cinereoniger Wolf, 1803, является типичным представителем наземной малакофауны Украины и распространен в северных, центральных и западных областях [1]. Это стенобионтный лесной вид, который преимущественно обитает в смешанных и широколиственных лесах, в городах встречается в лесопарках.

Генетические исследования рода *Limax* малочисленны [7]. Из представителей рода *Limax* генетически исследованы лишь несколько популяций *L. maximus* из Англии. Установлено, что характер генетической изменчивости в этом случае свидетельствует о размножении путем амфимиксиса, который является преобладающей системой размножения в семействе Limacidae [6, 7].

Хромосомные наборы слизней также практически не исследованы. На сегодня известны гаплоидные хромосомные числа (n) только около 20 видов из различных семейств [5, 8]. Лишь для двух видов – *Lehmania melitensis* [9] и *L. flavus* [5] определено диплоидное число ($2n$) и – хромосомная формула. Известно, что гаплоидный набор *L. cinereoniger* включает 31 бивалент [4]. Однако на территории Украины этот вид кариологически не исследован.

Учитывая вышеупомянутые факты, актуальным является комплексное исследование популяций *L. cinereoniger* с применением электрофоретических, кариологических и морфологических методов.

Материал и методы исследований

Исследовано семь выборок моллюсков, собранных на территории трех областей Украины (Житомирской, Тернопольской, Ровенской) в весенне-осенний периоды 2009–2010 г.г. Сбор и исследование моллюсков проводили по общепринятым методикам [3].

Для биохимического генного маркирования и морфологических исследований использовано 39 экз. слизней, идентифицированных как *L. cinereoniger* по определительным таблицам [3], причем от 15 экз. получены кариологические препараты, пригодные для анализа.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле с использованием ТРИС-ЭДТА-боратной системы буферов в экстрактах из хвостовой части тела исследована электрофоретическая изменчивость спектров ферментов: аспаратаминотрансферазы (Aat), малатдегидрогеназы (Mdh), лактатдегидрогеназы (Ldh), неспецифических эстераз (Es) и супероксиддисмутазы (Sod).

Препараты хромосом изготавливали из тканей гонады по методике, которая ранее успешно использовалась для исследования кариотипов дождевых червей [2].

Морфологические исследования проводили на слизнях, фиксированных в 70%-ном растворе этанола. Вскрытие слизней проводили под микроскопом МБС-1 в 70%-ном растворе этанола по общепринятой методике [3]. Измеряли длину тела моллюска (L), яйцевода (Lov), семяприемника (Lsp), резервуара семяприемника (Lrs), пениса (Lp).

Статистическая обработка материалов осуществлена с помощью пакета прикладных статистических программ STATISTICA 6.0.

Результаты исследований и их обсуждение

Биохимическое генное маркирование *L. cinereoniger*.

У *L. cinereoniger* спектры Aat, Sod и Mdh, кодирующие соответствующие ферменты, при данных условиях электрофореза были мономорфными. Тогда как спектры неспецифических эстераз (Es-1 и Es-3) были изменчивыми (рис. 1).

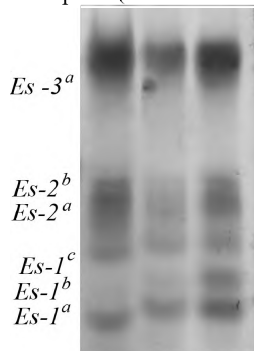


Рис. 1. Изменчивость неспецифических эстераз *L. cinereoniger*

В исследуемых семи выборках обнаружено четыре электроморфы локуса Es-1, три электроморфы локуса Es-2 и три электроморфы локуса Es-3. Полученные результаты доказывают, что шесть из семи исследованных популяций *L. cinereoniger* представлены моногенетическими линиями (биотипами). Только выборка из г. Кременец отвечает модели панмиктической популяции. Об этом свидетельствует низкое значение индекса фиксации и высокое соответствие фактического и ожидаемого по закону Харди-Вайнберга распределения генотипов в популяции *L. cinereoniger* из окрестностей г. Кременец (Тернопольская обл.).

Всего по характеру полиморфизма исследованных локусов можно выделить 8 биотипов *L. cinereoniger* (табл. 1).

Таблица 1

Генетическая структура и разнообразие биотипов *L. Cinereoniger*

Локус	Биотипы							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<i>Es-1</i>	ac	ab	ab	bb	ab	ab	ab	cc
<i>Es-2</i>	ab	ab	ab	aa	aa	ab	aa	aa
<i>Es-3</i>	ac	ac	ab	ac	ac	cc	ac	cc

Примечание. Мономорфные локусы – Mdh, Aat, Sod, Ldh.

Две из шести исследованных выборок были представлены одним биотипом. В четырех других выборках обнаружено по два биотипа, причем один из них явно преобладал, а другой был представлен единичным экземпляром.

Самыми многочисленными оказались биотипы *L. cinereoniger-VII* (36% исследованных особей), *L. cinereoniger-I* (20% исследованных особей) и *L. cinereoniger-III* (20% исслед. особей). Остальные биотипы были малочисленны, представлены единичными экземплярами и составляли всего 24% исследованных экземпляров.

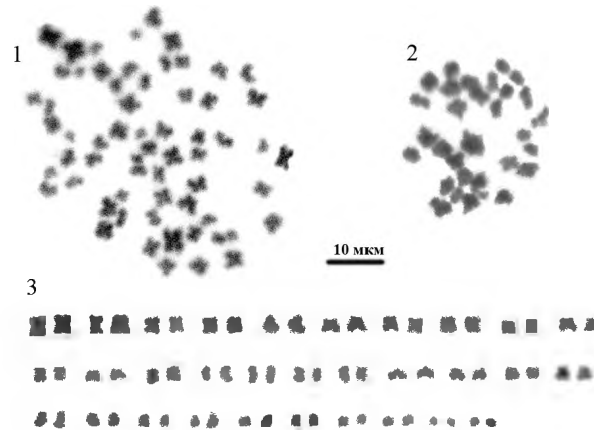


Рис. 2. Кариотип *L. cinereoniger*: 1 – митотическая метафаза ($2n=62$); 2–диакинез ($n=31$); 3 – кариограмма

В результате кариологического анализа впервые установлено, что диплоидный набор ($2n$) *L. cinereoniger* включает 62 хромосомы (рис. 2). Все хромосомы двуплечие и постепенно уменьшаются по размеру, основное число $NF = 124$. На стадии диакинеза мейоза наблюдался 31 бивалент ($n=31$), что подтверждает имеющиеся литературные данные [5].

Сравнительный анализ морфологических особенностей биотопов *L. cinereoniger*. Абсолютные значения исследуемых параметров трех биотипов *L. cinereoniger* в совокупной выборке из северо-западного региона страны варьируют в широких пределах, тогда как морфометрические индексы характеризуются большей консервативностью. Исследованные признаки не позволяют надежно идентифицировать выделенные биотипы, однако, результаты дисперсионного анализа (Lsd -тест) свидетельствуют о наличии достоверных различий ($p < 0,001$) между амфимиктическим (*L. cinereoniger*) и клоновыми биотипами (*L. cinereoniger-I* и *L. cinereoniger-VII*) по абсолютной (L_p) и относительной (L_p/L) длине пениса (рис. 3).

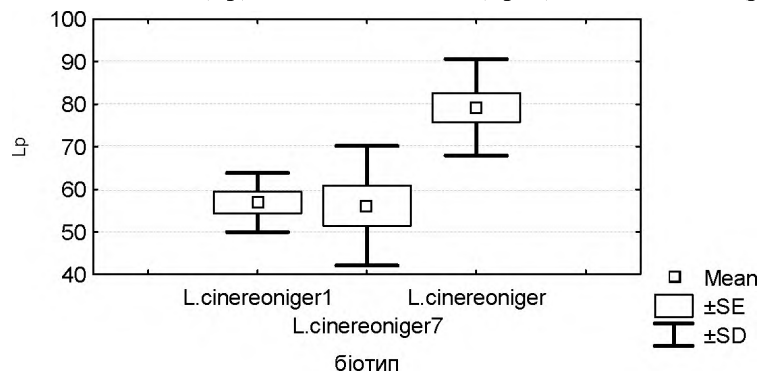


Рис. 3. Средние значения (M) и их стандартная ошибка (m) абсолютной длины пениса у биотипов *L. Cinereoniger*

Подобные результаты показывает дискриминантный анализ (табл. 2). Общий уровень дискриминации – 71,43% – невысокий, а, следовательно, по совокупности анализируемых признаков биотипы *L. cinereoniger* надежно не идентифицируются, хотя и имеют определенную морфологическую индивидуальность.

Надежность дискриминации наиболее массовых биотипов *L. cinereoniger*

Биотип	%	<i>L. cinereoniger</i> -I	<i>L. cinereoniger</i> -VII	<i>L. cinereoniger</i>
<i>L. cinereoniger</i> I	75	6	2	0
<i>L. cinereoniger</i> -VII	55,55	1	5	3
<i>L. cinereoniger</i>	81,82	1	1	9
В целом	71,43	8	8	12

Диаграмма рассеяния выборок наиболее массовых биотипов в поле первых двух канонических функций (рис. 4) также свидетельствует о наличии определенной морфологической обособленности этих групп. Облака рассеяния достаточно компактны, и почти не перекрываются. При этом значения первой канонической функции хорошо коррелируют со значениями абсолютной (L_p) и относительной (L_p/L) длины пениса, а значение второй - с длиной сперматеки (L_{sp}).

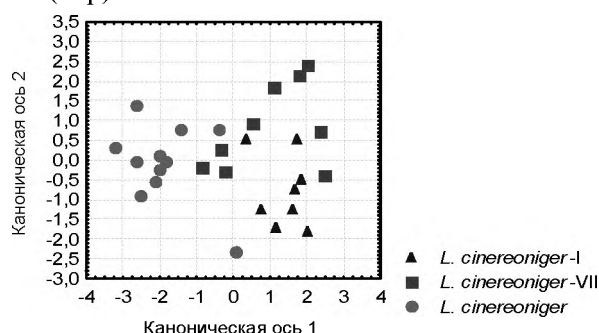


Рис. 4. Диаграмма рассеяния выборок наиболее массовых биотипов *L. cinereoniger* в поле первых двух канонических функций

Выводы

В результате проведенного исследования установлено, что *L. cinereoniger* в фауне Украины представлен амфимиктической формой, которая распространена преимущественно в естественных биотопах и популяциями, особи которых характеризуются фиксированными генотипами. Такие популяции распространены преимущественно в изолированных биотопах (погребов и подвалов) и представлены преимущественно одним, или, реже, несколькими биотипами.

В результате кариологического анализа впервые установлено число хромосом ($2n=62$) в диплоидном наборе *L. cinereoniger*. На стадии диакинеза мейоза число элементов было стабильным у всех исследованных экземпляров ($n=31$).

Анализ морфологических параметров биотипов *L. cinereoniger* показал, что исследованные признаки не позволяют надежно их идентифицировать, хотя общий уровень дискриминации достаточно высок (71,43%). Характерно, что клоновые биотипы хорошо дифференцируются от амфимиктического *L. cinereoniger* по параметрам половой системы.

В дальнейшем считаем целесообразным расширить географию исследований и спектр исследуемых ферментов с целью уточнения биотипической и таксономической структуры вида.

1. Байдашников А. А. Вертикальное распределение наземных моллюсков Украинских Карпат / А. А. Байдашников // Вестник зоологии. – 1989. – № 5. – С. 55–59.
2. Власенко Р. П. Клональная структура, кариологический и морфологический анализ изолированного поселения гипервариабильного вида дождевых червей *Aporrectodea rosea* (Oligochaeta : Lumbricidae) / Р. П. Власенко, А. В. Гарбар, С. В. Межжерин // Наук. вісник Ужгородського університету. Сер.: Біологія. – 2007. – Вип. 21. – С. 187–191.
3. Лихарев И. М. Слизни фауны СССР и сопредельных стран (Gastropoda terrestria nuda) / И. М. Лихарев, А. Й. Виктор // Фауна СССР. – Л.: Наука, 1980. – 438 с. – (Фауна СССР; т. 3; вып. 5).
4. Beeson G. Chromosome Numbers of Slugs / G. Beeson // Nature. – 1960. – № 186. – P. 257–258.

5. *Comparative cytogenetic analysis of three stylommatophoran slugs (Mollusca, Pulmonata) / M. Colomba [at el.] // Malacologia. – 2009. – Vol. 51, № 1. – P. 173–179.*
6. *Foltz D. Genetic diversity and breeding systems in terrestrial slugs of the families Limacidae and Arionidae / D. Foltz, H. Ochman and K. Selander // Malacologia. – 1984. – Vol. 25, № 2. – P. 593–605.*
7. *McCracken G. Self – fertilization and monogenic strains in natural populations of terrestrial slugs / G. McCracken, R. Selander // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1980. – Vol. 77, № 1. – P. 684 – 688.*
8. *Thiriout-Quievreux C. Advances in chromosomal studies of gastropod mollusks / C. Thiriout-Quievreux // J. Moll. Stud. – 2003. – Vol. 69. – P. 187–201.*
9. *Vitturi R. Spermatoocyte chromosome analysis of the *Lehmannia melitensis* (Lesson and Pollonera, 1891) (Mollusca, Pulmonata) using conventional, NOR – and C – banding techniques / R. Vitturi, I. Sparacio // Caryologia – 1993. – № 46. – P. 189–199.*

T. H. Чернишова, О. В. Гарбар

Житомирський державний університет ім. Івана Франка

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦІЙ І МОРФОЛОГІЧНА МІНЛИВІСТЬ *LIMAX CINEREONIGER* WOLF, 1803 (*LIMACIDAE*) НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

В результаті аналізу алозимної мінливості встановлено, що в *L. cinereoniger* амфіміксис характерний для природних популяцій, тоді як синантропні популяції представлені генетичними лініями з фіксованими гомо- і гетерозиготними генотипами. Відсутність проміжних алозимних спектрів в умовах співіснування доводить репродуктивну ізоляцію останніх. Хромосомний набір *L. cinereoniger* характеризується стабільністю і консервативністю ($2n=62$; $n=31$). Амфіміктічна форма істотно відрізняється від інших по параметрах статеві системи (рівень дискримінації 81,82%).

Ключові слова: слизні, амфіміксис, генотип, біотип, каріотип

T. N. Chernyshova, A. V. Garbar

Zhytomyr Ivan Franko State University

POPULATION GENETIC STRUCTURE AND MORPHOLOGICAL VARIABILITY OF *LIMAX L. CINEREONIGER*, 1803 (*LIMACIDAE*) ON THE TERRITORY OF UKRAINE

As a result of allozymic changeability analysis *L. cinereoniger* amphimixis is established to be characteristic for natural populations, while the synanthropic population are presented with genetic lines of fixed homo- and heterozygous genotypes. The absence of intermediate allozymic spectra in coexistence proves reproductive isolation of the latter. *L. cinereoniger* chromosome set is characterized with stability and conservatism ($2n=62$; $n=31$). Amphimictic form greatly differs from the other ones in reproductive system parameters (the discrimination level is 81,82 %)

Key words: slugs, amphimixis, genotype, biotype, karyotype