

Генетическая структура популяций и морфологическая изменчивость *Limax maximus* (Linnaeus, 1758) (Pulmonata, Limacidae) Правобережной Украины

А.В. ГАРБАР, Т.Н. ЧЕРНЫШОВА, Д.А. ГАРБАР

Житомирский государственный университет им. Ивана Франко, ул. Б. Бердичевская, 40,
Житомир, 10008, УКРАИНА, e-mail: saguaroklub@mail.ru

Genetic structure and morphological variability of *Limax maximus* (Linnaeus, 1758) (Pulmonata, Limacidae) populations in the Right-bank Ukraine

O. V. GARBAR, T. N. CHERNYSHOVA,
D. A. GARBAR

I. Franko Zhytomyr State University, U. Berdychivska str. 40,
Zhytomyr, 10008, UKRAINE, e-mail:
saguaroklub@mail.ru

SUMMARY. The analysis of *L. maximus* allozymic variability on the Dnieper right-bank Ukraine territory testifies to the balanced proportion of homo- and heterozygotic genotypes in populations in most cases. Thus, this species is reproduced mostly amphimictically. In some cases, probably, automixis takes place and leads to genotypes fixing in homozygotic state. This species is characterized with stable chromosome numbers ($n=31$, $2n=62$) and chromosome arms ($NF=124$). *L. maximus* morphometric parameters vary greatly but geographic tendencies in morphological variability of this species have not been found.

Слизень *Limax maximus* (Linnaeus, 1758) – космополитный вид, типичный представитель синантропной малакофауны Украины. Он распространен преимущественно в западных, северных и центральных регионах страны и был обнаружен в населенных пунктах, а также в лесополосах вблизи городов [Байдашников, 1992; Балашов, 2010]. Раньше существовало предположение, что *L. maximus* населяет естественные биотопы Западных Карпат [Лихарев, Виктор, 1980], но в настоящий момент этот вид рассматривают исключительно как синантропный.

Генетические исследования рода *Limax* малочисленны [Foltz *et al.*, 1984, McCracken, Selander, 1980]. Были попытки применения электрофореза в крахмальном геле для идентификации видов семейства Limacidae [Grossu, Tesio, 1975], но генетическая структура популяций этими авторами не была описана. В результате исследования популяций *L. maximus* из восточных штатов США с помощью электрофореза ферментов в полиак-

риламидном геле установлено, что 5 из 11 использованных локусов являются полиморфными. Наблюдаемая гетерозиготность составила 0,166, что свидетельствует об амфимиктичности данного вида [Foltz *et al.*, 1984; McCracken, Selander, 1980]. Генетические исследования *L. maximus* на территории Украины ранее не проводились.

Хромосомные наборы слизней рода *Limax* практически не исследованы. На сегодняшний день известны гаплоидные хромосомные числа ($n = 31$) трёх его представителей [Beeson, 1960]. Только для одного вида – *Limax flavus* (Linnaeus, 1758) определено диплоидное число ($2n$) и хромосомная формула [Colomba *et al.*, 2009]. Известно, что гаплоидный набор *L. maximus* включает 31 бивалент [Beeson, 1960]. Однако на территории Украины этот вид кариологически не исследован. Кроме этого явно недостаточно изучены остаются вопросы морфологической изменчивости *L. maximus*. В существующих работах обсуждаются в основном качественные признаки, и практически не уделяется внимание анализу изменчивости морфометрических параметров [Лихарев, Виктор, 1980; Сверлова, Гураль, 2005; Балашов, 2010 и др.].

Учитывая это, актуальным является комплексное исследование *L. maximus* с привлечением электрофоретических, кариологических, и морфологических методов.

Материал и методы

Для исследования использовано 38 выборок моллюсков, собранных в весенне-осенние периоды 2008-2010 годов на территории 10 областей Украины (Рис. 1).

Сбор и исследование моллюсков проводили по общепринятым методикам [Лихарев, Виктор, 1980].

Для биохимического генного маркирования и морфологических исследований использовано 481 экз. слизней, идентифицированных как *L. maximus* по определительным таблицам [Лиха-

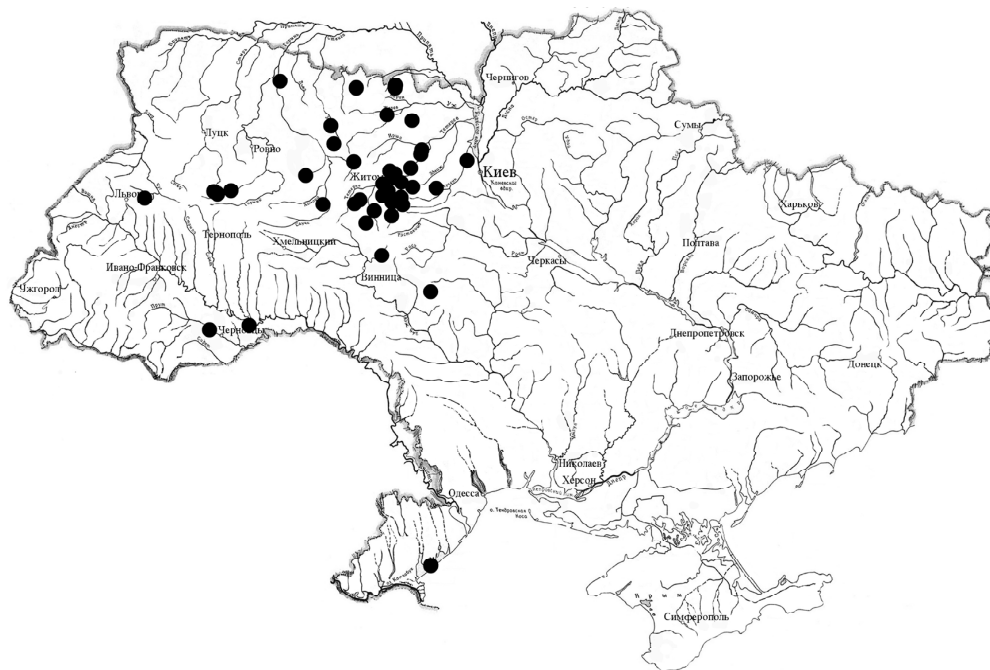


РИС. 1. Места сбора *Limax maximus* на территории Украины.

FIG. 1. Places of *Limax maximus* samples on the territory of Ukraine.

рев, Виктор, 1980; Wiktor, 1989], причем для 20 экз. получены кариологические препараты, пригодные для анализа.

Все морфологические исследования проводили на фиксированных в 70%-ном этаноле животных. Вскрытие слизней проводили под микроскопом МБС-1 в 70%-ном растворе этанола по общепринятой методике [Лихарев, Виктор, 1980; Wiktor, 1989]. Измеряли длину тела моллюска (L), ширину боковых (W1) и центральной полос (W2) подошвы, длину пениса (Lp), семяприемника (Lsp) и его резервуара (Lr), яйцевода (Lov) и его расширенной части (Lov1).

Методом электрофореза в полиакриламидном геле с использованием ТРИС-ЭДТА-боратной системы буферов [Peacock *et al.*, 1965] в экстрактах из гепатопанкреаса исследована электрофоретическая изменчивость спектров ферментов аспаргатаминотрансферазы (Aat), малатдегидрогеназы (Mdh), лактатдегидрогеназы (Ldh), неспецифических эстераз (Es) и супероксиддисмутазы (Sod).

Препараты хромосом готовили из тканей гонады по методике, которая ранее успешно использовалась нами для исследования кариотипов пресноводных моллюсков [Гарбар, Гарбар, 2007]. Животным делали инъекцию 0,05% колхицина за 23 часа до вскрытия. Материал гипотенировали 60 минут в дистиллированной воде и затем фиксировали в смеси 96%-го этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Хромосомные препараты готовили методом отпечатка. Высушенные препараты окрашивали в

течение 10 минут в 10%-ном растворе азур-эозина по Романовскому, приготовленном на 0,01M-ом фосфатном буфере (pH 6,8). Анализ препаратов осуществляли с помощью микроскопа "Микмед" (ок. 10, об. 90).

Статистическая обработка материалов осуществлена с помощью пакета прикладных статистических программ PAST.

Для географического анализа записей базы данных использовали программный ГИС пакет DIVA-GIS 5.2.0.2.

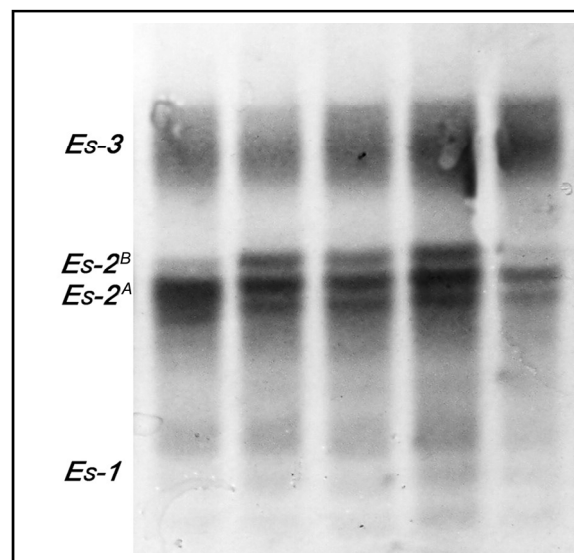


РИС. 2. Изменчивость неспецифических эстераз *Limax maximus*.

FIG. 2. *Limax maximus* non-specific esterases variability.

Результаты

Биохимическое генное маркирование. У *L. maximus* спектры Aat, Sod и Mdh, которые кодируют соответствующие ферменты, при данных условиях электрофореза были мономорфными. Полиморфными оказались только спектры неспецифических эстераз (Es). Для последующего анализа использован локус *Es-2*, который кодировался двумя аллелями (*Es-2^a* и *Es-2^b*) (Рис. 2).

По этому локусу в исследуемых выборках обнаружены три электроморфы, отвечающие условным генотипам *Es-2^{a/a}*, *Es-2^{b/b}* и *Es-2^{a/b}*.

Наиболее распространенным оказался гомозиготный генотип *Es-2^{a/a}*, который имели 75,5% исследованных особей. Гетерозиготный генотип *Es-2^{a/b}* имели 22,8% животных, а гомозиготный генотип *Es-2^{b/b}* является редким и обнаружен лишь у 1,7% исследованных экземпляров. Последний присутствовал лишь в трех выборках (с. Молочки и г. Коростень Житомирской области, с. Мрия Киевской области).

Три достаточно большие выборки были представлены исключительно гомозиготными особями

с генотипом *Es-2^{a/a}* (табл.1). Во всех остальных случаях наблюдалось высокое соответствие фактического и ожидаемого по закону Харди-Вайнберга распределений генотипов (табл. 1). Аналогичные данные получены для совокупной выборки *L. maximus*.

Определённых географических закономерностей в распределении аллелей локуса *Es-2* по исследованной территории не обнаружено (Рис. 3).

Кариотип. В результате кариологического анализа установлены хромосомные числа *L. maximus* в гаплоидном (n=31) и диплоидном (2n=62) наборе (Рис. 4). Полученные результаты подтверждают имеющиеся литературные данные [Weeson, 1960]. У всех исследованных экземпляров количество хромосом было стабильным. Все хромосомы двуплечие, основное число NF=124. По размерам четко выделяется первая пара наиболее крупных хромосом, длина остальных пар уменьшается постепенно.

Морфологический анализ. Средние значения основных количественных признаков и индексов, рассчитанных на их основе, для совокупной выборки вида представлены в табл. 2.

Таблица 1. Фактические и ожидаемые (в скобках) распределения генотипов локуса *Es-2* и χ^2 - тест для распределения Харди-Вайнберга в наиболее массовых выборках *L. maximus*.

Table 1. Read and expected (in brackets) of *Es-2* locus genotypes and χ^2 - test for Hardy – Weinberg distribution in *L. maximus* most numerous samples.

Популяция \ Генотип	N	Частота генотипов			χ^2	P
		<i>Es-2^{a/a}</i>	<i>Es-2^{a/b}</i>	<i>Es-2^{b/b}</i>		
пгт. Комсомольск (В.)	20	12(12,72)	8(6,56)	0(0,72)	1,07	0,30
с. Кашперовка (В.)	10	5(5,53)	5(3,95)	0(0,53)	0,857	0,35
с. Хуторы Кривошеинские (В.)	18	18				
г. Гайсин (В.)	13	11(11,04)	2(1,92)	0(0,04)	0,04	0,83
г. Житомир	39	29(29,58)	10(8,83)	0(0,58)	0,75	0,39
с. Волица (Ж.)	20	15(15,26)	5(4,49)	0(0,26)	0,32	0,57
с. Червонное (Ж.)	9	6(6,1765)	3(2,6471)	0(0,1765)	0,23	0,63
с. Райки (Ж.)	10	10				
с. Клитчин (Ж.)	12	11(11)	1(1)	0(0)	0,00	1,00
г. Коростень (Ж.)	15	8(6,55)	4(6,90)	3(1,55)	2,88	0,09
с. Писки (Ж.)	20	19(19)	1(1)	0(0)	0	1
г. Новоград-Волынский (Ж.)	12	10(10,04)	2(1,91)	0(0,04)	0,047	0,827
г. Овруч (Ж.)	14	11(11,11)	3(2,78)	0(0,11)	0,13	0,72
с. Остров (Ж.)	24	22(22,02)	2(1,96)	0(0,02)	0,02	0,88
с. Молочки (Ж.)	16	7(6,77)	7(7,45)	2(1,77)	0,06	0,80
с. Б. Низгорцы (Ж.)	23	23				
с. Мрия (К.)	12	7(6,65)	4(4,69)	1(0,65)	0,31	0,58
г. Вилково (О.)	18	13(13,28)	5(4,43)	0(0,28)	0,36	0,54
г. Сарны (Р.)	26	9(11,67)	17(11,67)	0(2,67)	5,71	0,02
с. Залесци (Т.)	11	10(10)	1(1)	0(0)	0	1
г. Шепетовка (Х.)	10	9(9)	1(1)	0(0)	0	1
г. Черновцы	12	10(10,04)	2(1,91)	0(0,04)	0,05	0,83
Совокупная выборка	364	275(275,14)	83(82,72)	6(6,14)	0,004	0,947

Примечание: В. – Винницкая обл., Ж. – Житомирская обл., К. – Киевская обл., О. – Одесская обл., Т. – Тернопольская обл., Р. – Ровенская обл., Х. – Хмельницкая обл.

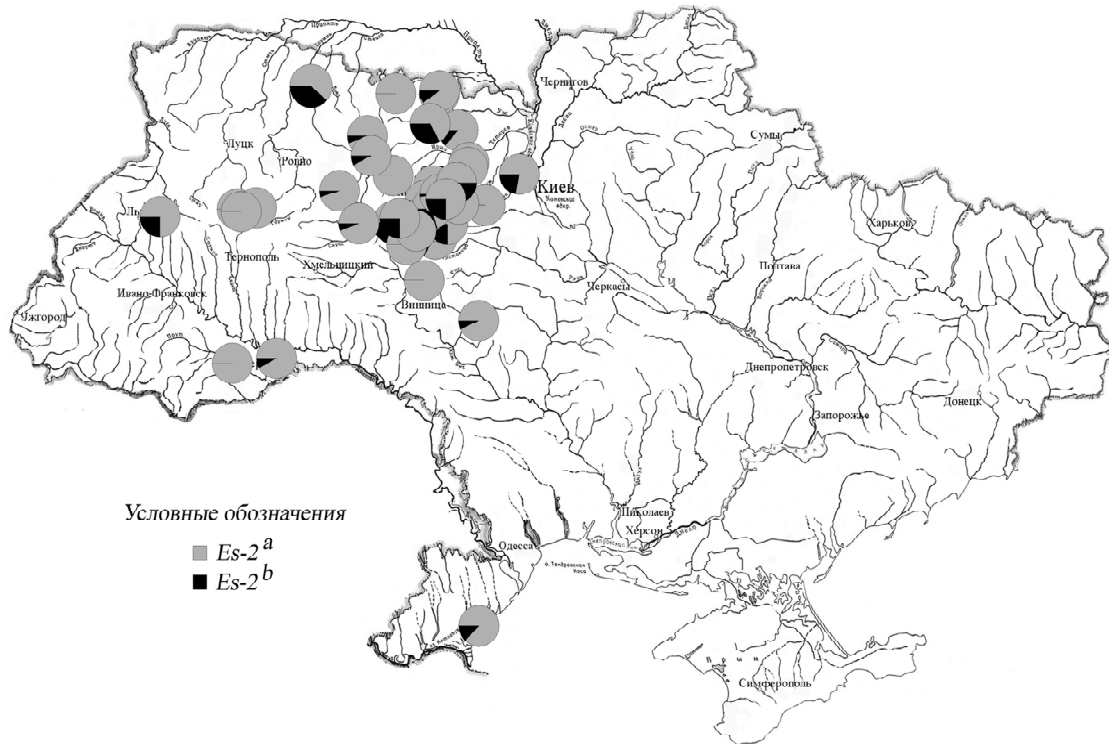


РИС. 3. Распределение аллелей локуса Es-2 *Limax maximus* по территории правобережной Украины.

FIG. 3. *Limax maximus* Es-2 locus alleles distribution on the Right-bank Ukraine territory.

Все исследованные параметры варьируют в широких пределах.

Анализ наиболее массовых отдалённых географически выборок *L. maximus* свидетельствует о наличии достоверных отличий между ними

Табл. 2. Основные морфометрические параметры *Limax maximus*

Table 2. *Limax maximus* main morphometric parameters.

Признаки	N	M	min	max	m	σ
L	270	49,18	31,50	82,45	8,21	0,50
W1	270	2,81	1,90	4,70	0,52	0,03
W2	270	2,73	1,60	4,95	0,60	0,04
W3	270	8,34	5,50	13,40	1,51	0,09
Lsp	102	6,90	3,45	13,05	1,90	0,19
Lr	89	4,36	2,20	7,45	1,06	0,11
Lov	102	17,02	9,02	25,65	3,55	0,35
Lov1	68	5,50	2,30	9,35	1,52	0,18
Lp	102	26,91	11,85	44,05	7,57	0,75
W1/W2	270	1,05	0,62	1,59	0,17	0,01
W3/L	270	0,17	0,13	0,24	0,02	0,01
Lr/Lsp	102	0,61	0,37	0,88	0,01	0,11
Lov1/Lov	68	0,30	0,17	0,48	0,06	0,01
Lov/L	102	0,30	0,13	0,80	0,08	0,01

Примечание: N – количество исследованных особей, M – средние значения, max – максимальное значение, min – минимальное значение, m – стандартная ошибка, σ – стандартное отклонение.

по абсолютным значениям исследованных параметров (табл. 3). По морфологическим индексам отличий обнаруживается значительно меньше. При этом определённые географические закономерности в морфологической изменчивости отсутствуют (Рис. 5). Вероятно, это связано с тем, что *L. maximus* населяет преимущественно погреба и подвалы, где условия обитания относительно стабильные и не зависят от географической изменчивости климатических факторов.

Обсуждение

Слизни являются гермафродитами и могут размножаться как амфимиктически, так и путём самооплодотворения (аутомиксиса). Обязательное или факультативное самооплодотворения характерно для некоторых видов слизней семейства Arionidae: *Arion circumscriptus* Johnston, 1828, *A. silvaticus* Lohmander, 1937, *A. fasciatus* (Nilsson, 1823) и др. [Foltz et al., 1984]. В популяциях этих видов отсутствуют гетерозиготы и наблюдается фиксация гомозиготных генотипов. В результате вид оказывается представлен серией гомозиготных линий. У ряда других видов рода *Arion* наблюдается сбалансированное соотношение гомо- и гетерозиготных генотипов, следовательно, они размножаются амфимиктически [Foltz et al., 1984]. Исследованные ранее виды слизней

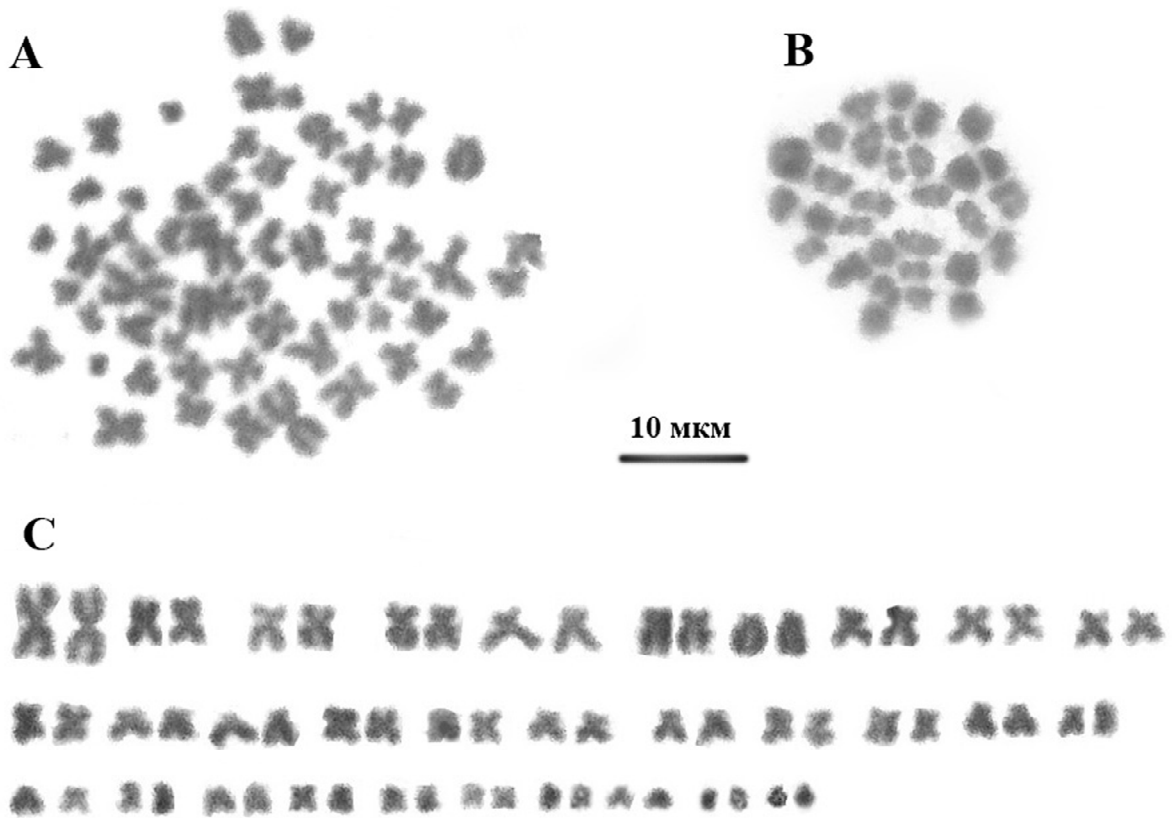


РИС. 4. Карниотип *Limax maximus*.
 А – митотическая метафаза (2n = 62); В – диакнез (n = 31); С – карниограмма

FIG. 4. *Limax maximus* karyotype.
 А – mitotic metaphase (2n=62); В – diakinesis (n=31); С – karyogram.

семейства Limacidae характеризуются средней гетерозиготностью и отсутствием фиксированных гомозиготных генотипов. Очевидно, что для них основным способом размножения является амфимиксис [McCracken, Selander, 1980].

Сбалансированное соотношение генотипов в большинстве исследованных нами популяций *L. maximus* подтверждает его амфимиксичность. Однако три достаточно крупные выборки оказались представлены исключительно гомозиготами (*Es-2^{a/a}*), что может быть следствием аутомик-

сиса или эффекта основателя. Поскольку слизни этого вида расселяются преимущественно антропохорно, в подходящие новые биотопы часто попадают единичные экземпляры, которые начинают размножаться аутомиктически. Только во втором поколении или при занесении в тот же биотоп экземпляров этого вида из других популяций появляется возможность амфимиксиса. В первом случае, если биотоп заселяется единичной гомозиготной особью, вся популяция будет представлена гомозиготами с генотипом, иден-

Таблица 3. Достоверные различия по морфологическим признакам между географически отдалёнными выборками *Limax maximus*

Table 3. True differences in morphological signs within geographically distant places of *Limax maximus* sample.

Выборка	Lsp	Lr	Lov	Lov1	Lp	L	W1	W2	W3
с. Залесци (Т) – с. Иршики (Х)	***	*		***	***	***	***	*	**
с. Залесци (Т) – с. Молочки (Ж)	***		*	***	***	*			
с. Залесци (Т) – с. Мрия (К)	*	*	**	***	***	*	*	*	**
с. Иршики (Х) – с. Молочки (Ж)						*	***		**
с. Молочки (Ж) – с. Мрия (К)							**		*
с. Иршики (Х) – с. Мрия (К)			*			*			

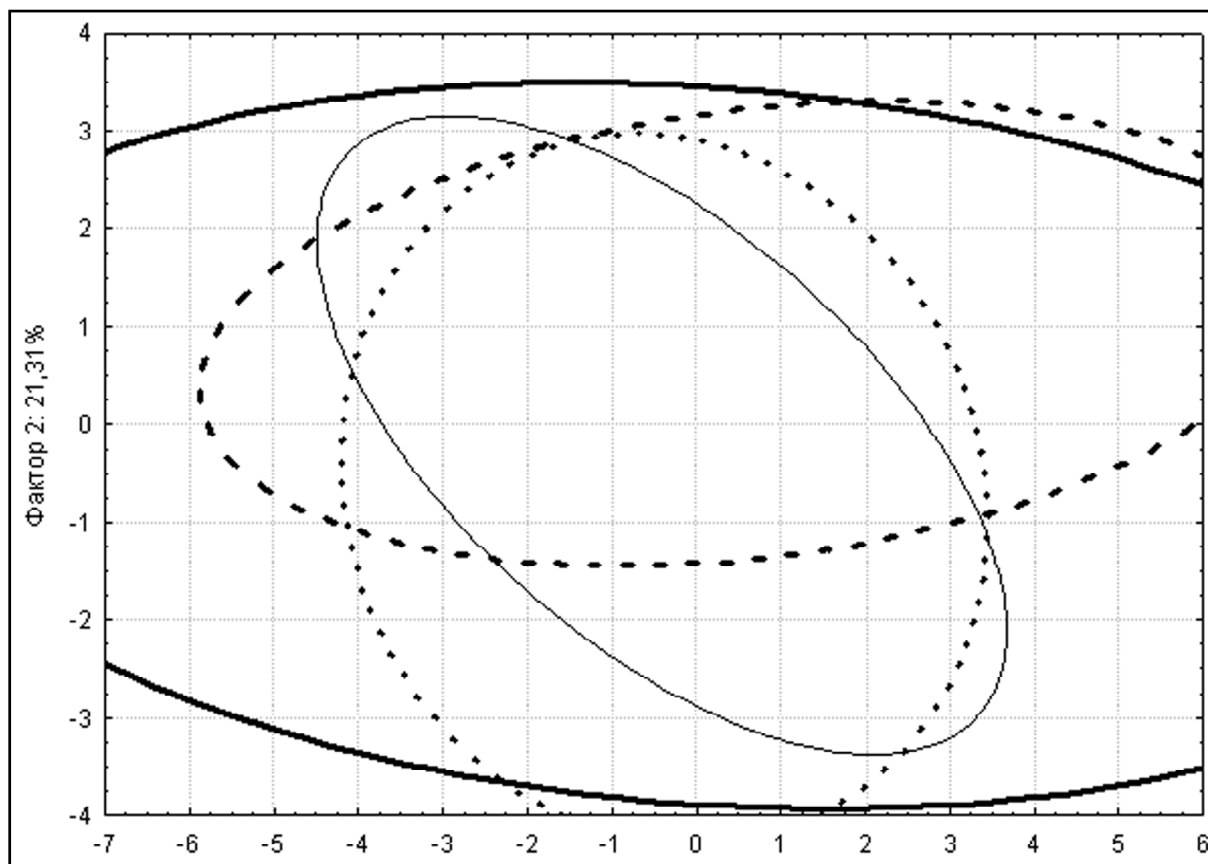


РИС. 5. Облака рассеяния географически отдалённых выборок *Limax maximus* в поле первых двух главных компонент, построенных на основании морфометрических параметров (— — — с. Молочки; — с. Мрия; с. Иршики; — с. Залесци).

FIG. 5. Diffusion of geographically distant *Limax maximus* samples within the field of first two main components constructed on morphometric parameters (— — — v. Molochky; — v. Mriya; v. Irshyky; — v. Zalesci).

тичным материнскому. Поскольку аллель $Es-2^b$ редок, гомозиготные особи с генотипом $Es-2^{b/b}$ в большинстве популяций отсутствуют. Следовательно, возможность основания новой популяции такой особью весьма незначительна. Возможно, именно поэтому в гомозиготных популяциях обнаруживается только наиболее распространённый генотип $Es-2^{a/a}$. Таким образом, для *L. maximus* амфимиксис является основным, но не единственным способом размножения. Вероятно, в некоторых случаях происходит аутомиксис и систему размножения этого вида можно охарактеризовать как смешанную.

Выводы

Анализ аллозимной изменчивости *L. maximus* на территории правобережной Украины в большинстве случаев показал сбалансированное со-

отношение гомо- и гетерозиготных генотипов, что свидетельствует о преимущественно амфимиктическом размножении этого вида. Однако в некоторых случаях, вероятно, происходит аутомиксис, что приводит к фиксации генотипов в гомозиготном состоянии и, следовательно, для *L. maximus* характерна смешанная система размножения.

Кариотип этого вида оказался консервативным, что характерно для большинства наземных моллюсков. Гаплоидное и диплоидное числа хромосом стабильны ($n=31$, $2n=62$, $NF=124$).

Морфометрические параметры *L. maximus* характеризуются высокой изменчивостью, однако географических закономерностей в морфологической изменчивости этого вида не обнаружено. Этот результат закономерен, поскольку *L. maximus* населяет преимущественно погреба и подвалы, микроклимат которых мало зависит от внешних климатических факторов.

Литература

- Байдашников А. А. 1992. Наземная малакофауна Украинского Полесья. Сообщение 1. Видовой состав и связь моллюсков с растительным покровом. *Вестник зоологии*, 4: 13-19.
- Балашов І. О. 2010. Наземні моллюски (Gastropoda, Pulmonata) Полтавської області. *Наукові записки Державного природознавчого музею*, 26: 191-198.
- Гарбар Д. А., Гарбар О. В. 2007. Кариологические особенности рода *Planorbarius* (Gastropoda, Pulmonata, Bulinidae) фауны Украины. *Цитология и генетика*, 2: 49-55.
- Лихарев И., М. Виктор А. Й. 1980. Слизни фауны СССР и сопредельных стран (*Gastropoda terrestria nuda*). Фауна СССР, 3, вып. 5. Нов. сер., № 122. Ленинград, Наука, 438 с.
- Сверлова Н.В., Гураль Р.І. 2005. *Визначник наземних моллюсків заходу України*. Львів, 218 с.
- Beeson G. 1960. Chromosome numbers of slugs. *Nature*, 186: 257-258.
- Colomba M., Vitturi R., Rampin M., Lannino A., Taravella A. Libertini A. 2009. Comparative cytogenetic analysis of three stylommatophoran slugs (Mollusca, Pulmonata). *Malacologia*, 51 (1): 173-179.
- Foltz D., Ochman H., Selander K. 1984. Genetic diversity and breeding systems in terrestrial slugs of the families Limacidae and Arionidae. *Malacologia*, 25(2): 593-605.
- Grossu A. V., Tesio G. 1975. Suggestions for species grouping within the family Limacidae (Gastropoda, Pulmonata) by biochemical methods. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 41: 321-329.
- McCracken G., Selander R. 1980. Selffertilization and monogenic strains in natural populations of terrestrial slugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 77(1): 684-688.
- Peacock F.C., Bunting S.L., Queen K.G. 1965. Serum protein electrophoresis in acrilamide gel patterns from normal human subjects. *Science*, 147: 1451-1455.
- Wiktor A. 1989. *Limacoidea et Zonitoidea nuda. Sli-maki pomrowickształtne (Gastropoda: Stylommatophora)*. Fauna Polski, 12. Warszawa, 207 s.

РЕЗЮМЕ. Анализ аллозимной изменчивости *L. maximus* на территории правобережной Украины свидетельствует о сбалансированном соотношении гомо- и гетерозиготных генотипов в его популяциях в большинстве случаев. Следовательно, этот вид размножается преимущественно амфимиктически. В некоторых случаях, вероятно, имеет место аутомиксис, что приводит к фиксации генотипов в гомозиготном состоянии. Этот вид характеризуется стабильным числом хромосом ($n=31$, $2n=62$) и хромосомных плеч ($NF=124$). Морфометрические параметры *L. maximus* варьируют в широких пределах, однако географических закономерностей в морфологической изменчивости этого вида не обнаружено.

This paper is published on a CD-ROM to comply with the Article 8.6 of the International Code of Zoological Nomenclature. The copies of the CD-ROM were mailed on the date mentioned on the front page to: Department of biological literature of the Library on Natural Sciences of Russian Ac. Sci., Library of Zoological Institution of Russian Ac. Sci., Malacology library of Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris, France), Malacology library of the Natural History Museum (London, UK), Library of the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (Washington, DC, USA); Thomson Reuters (publishers of Zoological Record).

Эта статья опубликована на CD-ROM, что соответствует требованиям статьи 8.6 Международного Кодекса Зоологической номенклатуры. Копии CD-ROM разосланы в день, указанный на первой странице в следующие библиотеки: Библиотеку биологической литературы РАН (Москва), которая является отделом Библиотеки по естественным наукам Российской академии наук (БЕН РАН); библиотеку Зоологического института РАН; малакологическую библиотеку Muséum National d'Histoire Naturelle (Париж, Франция); малакологическую библиотеку Natural History Museum (London, UK), библиотеку National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (Washington, DC, USA); Thomson Reuters (издатели Zoological Record).