

УДК 594.38:[575.1+577.1]

## КЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *LIMAX FLAVUS* (PULMONATA, LIMACIDAE): АЛЛОЗИМНЫЙ, КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

А. В. Гарбар, Т. Н. Чернышова

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

Получено 22 января 2010

Принято 21 апреля 2010

**Клональная изменчивость *Limax flavus* (Pulmonata, Limacidae): аллозимный, кариологический и морфологический анализ.** Гарбар А. В., Чернышова Т. Н. — В результате анализа аллозимной изменчивости *Limax flavus* (Linnaeus, 1758) установлено, что его популяции имеют клональную структуру, характерную для партеногенетических видов. Отсутствие промежуточных генотипов, совместное существование и морфологическая обособленность клонов подтверждают их репродуктивную изоляцию. Образование гаплоидных клеток ( $n = 31$ ) в мейозе свидетельствует о размножении путем мейотического партеногенеза.

Ключевые слова: *Limax flavus*, аллозимная изменчивость, клон, кариотип, морфология.

**Clonal Variability of *Limax flavus* (Pulmonata, Limacidae): Allozyme, Karyological and Morphological Analysis.** Garbar A. V., Chernyshova T. N. — As a result of allozyme variability analysis, populations of *Limax flavus* (Linnaeus, 1758) are shown to have clonal structure, typical for parthenogenetic species. The absence of intermediate genotypes, coexistence and morphological separation of clones confirm their reproductive isolation. Formation of haploid cells ( $n = 31$ ) in meiosis, indicates the reproduction by meiotic parthenogenesis.

Key words: *Limax flavus*, allozyme variability, clone, karyotype, morphology.

### Введение

Природный ареал *Limax flavus* (Linnaeus, 1758) охватывает средиземноморские страны Европы и Передней Азии. Однако вид широко расселился по всему миру и в настоящее время является космополитным (Лихарев, Виктор, 1980). На территории Украины *L. flavus* ранее был обнаружен в урбанизированных биотопах Крыма и южных областей страны (Лихарев, Виктор, 1980; Сверлова и др., 2000). Хотя, учитывая его широкое распространение в западной Европе, возможным является обнаружение этого вида и в более северных регионах.

Электрофоретические исследования генетической изменчивости слизней семейств Arionidae, Philomycidae и Limacidae показали, что амфимиксис является нормальной, но не единственной системой размножения у большинства видов наземных моллюсков (McCracken, Selander, 1980; Nicklas, Hoffmann, 1981). Так, у некоторых видов семейства Arionidae (*Arion fasciatus*, *A. circumscriptus* и *A. silvaticus*) факультативное или облигатное самооплодотворение является преобладающей системой размножения, и их популяции представлены одной или несколькими моногенетическими формами (биотипами). Хотя в этом случае нельзя исключить партеногенез, который приводит к подобным результатам (McCracken, Selander, 1980; Nicklas, Hoffmann, 1981; Backeljau et al., 1997; Jordens et al., 1998). Следует отметить, что анализ морфологических особенностей обнаруженных биотипов авторы не проводили. Для других видов этого семейства (*A. distinctus* и *A. hortensis*) характерен амфимиксис. Из рода *Limax* генетически исследованы несколько популяций *L. maximus* из Англии. Характер генетической изменчивости в этом случае свидетельствует об амфимиксисе, который считается преобладающим способом размножения в семействе Limacidae (McCracken, Selander, 1980; Foltz et al., 1984).

Электрофоретическое исследование *L. flavus* и *L. pseudoflavus* из Великобритании (Evans, 1985) показало наличие чётких различий между ними по спектрам неспецифических эстераз (Es), однако популяционно-генетический анализ не проводился.

Хромосомные наборы слизней практически не исследованы. На сегодня известны гаплоидные хромосомные числа ( $n$ ) около 20 видов из различных семейств (Beeson, 1960; Thiriot-Quievreux, 2003). Только для одного вида — *Lehmania melitensis* — определено диплоидное число ( $2n$ ) и хромосомная формула. Известно, что гаплоидный набор *L. flavus* включает в себя 31 бивалент (Beeson, 1960). Однако на территории Украины этот вид кариологически не исследован.

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

## Материал и методы

Исследовано 8 выборок моллюсков, собранных на территории 6 областей Украины в весенне-осенний период 2009 г. (табл. 1). Сбор и исследование моллюсков проводили по общепринятым методам (Лихарев, Виктор, 1980).

Для биохимического генного маркирования и морфологических исследований использовано 91 экз. слизней, идентифицированных как *L. flavus* по определительным таблицам (Лихарев, Виктор, 1980), причем от 12 экз. получены кариологические препараты пригодные для анализа.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле с использованием ТРИС–ЭДТА-боратной системы буферов (Reasock et al., 1965) 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 готовили из тканей гонады по методике, которую ранее успешно использовали для исследования кариотипов пресноводных моллюсков (Гарбар, Гарбар, 2007). Животным делали инъекцию 0,05%-ного колхицина за 23 ч до вскрытия. Материал гипотонировали 60 мин в дистиллированной воде и затем фиксировали в смеси 96%-ного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Хромосомные препараты готовили методом отпечатка. Высушенные препараты окрашивали в течение 10 мин в 10%-ном растворе азур-эозина по Романовскому, приготовленном на 0,01М-ном фосфатном буфере (рН 6,8). Анализ препаратов осуществляли с помощью микроскопа «Микмед» (ок. 10, об. 90).

На живом материале определяли характер фоновой окраски, рисунок на мантии и спине, цвет слизи. Дальнейшие 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 (Лихарев, Виктор, 1980). Измеряли длину тела моллюска (L), яйцевода (Lov), семяприемника (Lsp), резервуара семяприемника (Lrs), пениса (Lp).

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

## Результаты

### Биохимическое генное маркирование

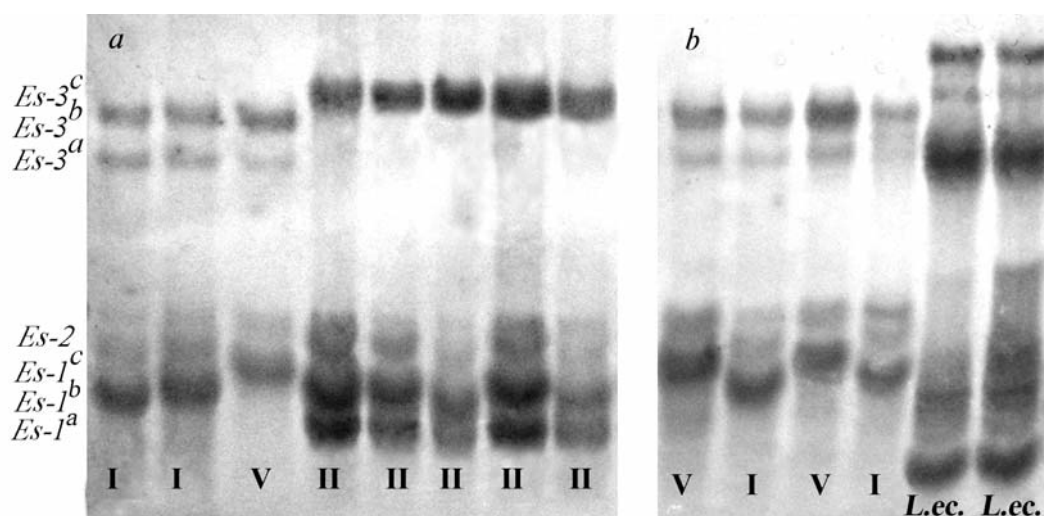
У *L. flavus* спектры Aat, Sod и Mdh, кодирующие соответствующие ферменты, при данных условиях электрофореза были мономорфными. Тогда как спектры неспецифических эстераз (Es-1 и Es-3) проявляли полиморфизм (рис. 1).

В исследованных выборках обнаружено три фиксированных электроморфы локуса Es-1, отвечающие условным генотипам Es-1<sup>b/b</sup>, Es-1<sup>c/c</sup> и Es-1<sup>a/b</sup> и четыре фикс-

Таблица 1. Места сбора *L. flavus*

Table 1. Places of *L. flavus* collection

Выборка	N, экз.	Географические координаты (децимальные градусы)	
		Широта	Долгота
с. Червоное (Андрушёвский р-н, Житомирская обл.)	28	49,9768	28,8659
г. Сарны (Сарненский р-н, Ровенская обл.)	2	51,3272	26,6260
с. Рубченки (Володарский р-н, Киевская обл.)	15	49,5608	29,7209
с. Рея (Бердичевский р-н, Житомирская обл.)	3	50,0223	28,6237
с. Корнин (Попельнянский р-н, Житомирская обл.)	12	50,0776	29,5513
с. Степок (Акимовский р-н, Запорожская обл.)	5	46,3023	35,3083
п. Малореченское (г. Алушта, АР Крым)	16	44,7587	34,5602
с. Ладьги (Староконстантиновский р-н, Хмельницкая обл.)	15	49,7489	27,4714

Рис. 1. Изменчивость неспецифических эстераз *L. flavus* (I, II, V — биотипы *L. flavus*).Fig. 1. *L. flavus* non-specific esterase variability (I, II, V — *L. flavus* biotypes).

сированных электроморфы локуса Es-3, отвечающие условным генотипам Es-3<sup>a/b</sup>, Es-3<sup>a/c</sup>, Es-3<sup>b/c</sup> и Es-3<sup>a/b/c</sup>. По характеру полиморфизма этих локусов на территории Украины можно выделить не менее 6 клонов *L. flavus*, отличающихся различными сочетаниями этих генотипов (табл. 2).

Характерно, что большинство выборок представлены одним клоном (табл. 3). Только в двух случаях выявлено по несколько генетических форм: Корнин (Житомирская обл.) — две и Малореченское (АР Крым) — три формы.

При этом два клона: *L. flavus*-I и *L. flavus*-II, являются массовыми и обнаружены в четырех и трех выборках соответственно (табл. 3). На них приходится 82,5% всех исследованных особей. Остальные четыре клона были представлены только в одной выборке каждый. В целом *L. flavus* характеризуется довольно высоким уровнем

Таблица 2. Генетическая структура и разнообразие клонов *L. flavus*Table 2. *L. flavus* genetic structure and clone variability

Локус	Клон <i>L. flavus</i>					
	I	II	III	IV	V	VI
Est-1	bb	ab	bb	ab	cc	bb
Est-3	ab	cc	abc	ab	ab	ac

Примечание. Мономорфные локусы — Mdh, Aat, Sod.

Таблица 3. Распределение клонов *L. flavus* по выборкамTable 3. *L. flavus* clone distribution in samples

Выборка	Клон <i>L. flavus</i>					
	I	II	III	IV	V	VI
Червоное	28					
Сарны	2					
Рубченки		15				
Рея				3		
Корнин	7				5	
Степок		5				
Малореченское	3		8			5
Ладыги		15				
Всего	40	35	8	3	5	5

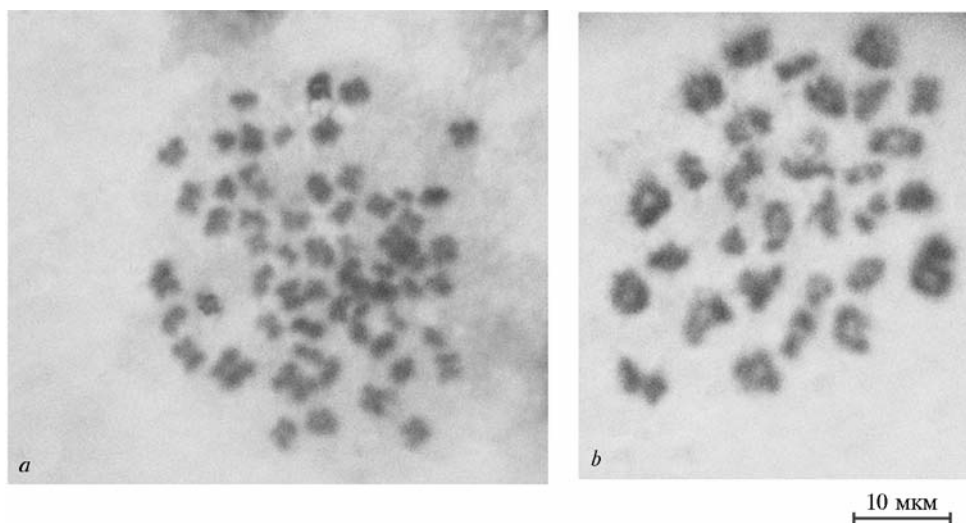


Рис. 2. Кариотип *L. flavus*: *a* — митотическая метафаза; *b* — диакинез.  
 Fig. 2. Karyotype of *L. flavus*: *a* — mitotic metaphase; *b* — diakinesis.

нем клонового разнообразия (15,2), который базируется на среднем количестве особей на один клон.

#### Кариотип

В результате кариологического анализа установлены хромосомные числа *L. flavus* в гаплоидном ( $n = 31$ ) и диплоидном ( $2n = 62$ ) наборе (рис. 2). У всех исследованных экземпляров количество хромосом было стабильным. Полученные результаты подтверждают данные предыдущих исследователей о хромосомном наборе данного вида (Beeson, 1960).

#### Морфологический анализ

Слизни, в отличие от других моллюсков, характеризуются ограниченным количеством диагностических морфологических признаков, что связано с практически полной редукцией раковины. Многие виды имеют характерные особенности в окраске, позволяющие их идентифицировать. Однако в пределах одного вида этот признак часто обнаруживает значительную изменчивость. Слизни *L. flavus* в этом отношении являются исключением и характеризуются однотипной окраской. Поэтому для дальнейшего анализа использованы преимущественно параметры половой системы, абсолютная длина тела моллюска и некоторые морфологические индексы.

Абсолютные значения исследованных параметров варьируют в широких пределах, тогда как морфометрические индексы характеризуются большей консервативностью (табл. 4).

Исследованные признаки не позволяют надежно идентифицировать выделенные клоны, однако результаты дисперсионного анализа (LSD-тест) свидетельствуют о наличии достоверных различий между наиболее массовыми из них по ряду параметров. Так, *L. flavus*-I и *L. flavus*-II отличаются только по абсолютной ( $Lrs$ ) и относительной ( $Lrs/Lsp$ ) длине резервуара сперматеки. Клон *L. flavus*-III от двух первых достоверно отличается не только по относительной длине резервуара сперматеки ( $Lrs/Lsp$ ), но и по абсолютной ( $Lov$ ) и относительной ( $Lov/L$ ) длине яйцевода.

Похожие результаты дает дискриминантный анализ (табл. 5). Общий уровень дискриминации низкий (69,23%), что свидетельствует о значительном сходстве клонов. Однако более 70% экземпляров *L. flavus*-I и *L. flavus*-II идентифицируют правильно по результатам анализа. Для вида с таким ограниченным набором диагностических признаков это довольно высокий уровень дискриминации.

Таблица 4. Средние значения (M) и стандартные ошибки (m) основных морфологических параметров клонов *L. flavus*Table 4. Estimates of mean (M) and standard error (m) in main morphological parameters of *L. flavus* clone

Признак		Клон					
		I N = 23	II N = 22	III N = 7	IV N = 2	V N = 2	VI N = 4
Lsp, mm	M	7,06	7,51	6,46	4,48	6,25	7,65
	m	0,33	0,43	0,71	1,08	0,65	0,77
Lrs, mm	M	3,81	4,55	4,46	2,90	3,90	5,14
	m	0,21	0,27	0,55	0,70	0,70	0,44
Lov, mm	M	14,83	14,69	11,47	11,05	10,53	10,03
	m	0,57	0,70	0,89	1,00	1,03	0,98
Lp, mm	M	13,30	12,53	13,16	10,83	13,43	14,70
	m	0,26	0,49	1,09	1,98	2,03	0,59
L, mm	M	42,32	43,46	46,26	44,65	35,98	40,35
	m	1,01	0,78	5,56	0,35	4,03	1,43
Lrs/Lsp	M	0,54	0,61	0,68	0,65	0,62	0,68
	m	0,02	0,02	0,03	0,00	0,05	0,04
Lov/L	M	0,35	0,34	0,26	0,25	0,30	0,25
	m	0,01	0,02	0,02	0,02	0,06	0,02
Lp/L	M	0,32	0,29	0,30	0,24	0,37	0,36
	m	0,01	0,01	0,03	0,05	0,01	0,01

Таблица 5. Надежность дискриминации наиболее массовых клонов *L. flavus*Table 5. The discrimination reliability in *L. flavus* most numerous clone

Биотип	%	<i>L. flavus</i> -I	<i>L. flavus</i> -II	<i>L. flavus</i> -III
<i>L. flavus</i> -I	73,91	17	6	0
<i>L. flavus</i> -II	72,73	5	16	1
<i>L. flavus</i> -III	42,86	1	3	3
В целом	69,23	23	25	4

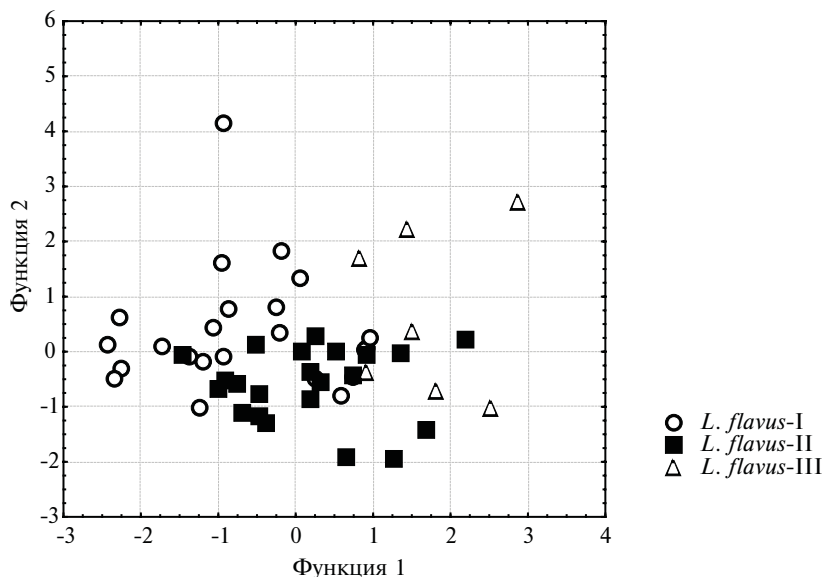


Рис. 3. Диаграмма рассеяния выборок наиболее массовых клонов в пространстве первых двух дискриминантных функций.

Fig. 3. The diagram of most numerous clone samples distribution in the space of first and second discriminant functions.

Диаграмма рассеяния выборок наиболее распространенных клонов в пространстве первых двух дискриминантных функций (рис. 3) также свидетельствует о наличии определенной морфологической обособленности этих групп. Облака рассеяния довольно компактны и перекрываются только частично.

### Обсуждение

Известно, что при полном самооплодотворении популяции разделяются на серии линий, которые быстро становятся гомозиготными. Подобная ситуация обнаружена у ряда видов слизней семейства *Arionidae* (Foltz et al., 1984; Baskeljaun et al., 1997). Для представителей семейства *Limacidae* такая генетическая структура популяций считается нехарактерной. Из 12 исследованных видов только в популяциях *Deroceras agreste* наблюдали нулевую гетерозиготность, на основании чего был сделан вывод о том, что этот вид размножается путем самооплодотворения (Foltz et al., 1984). Заслуживает особого внимания еще один вид из этой группы — *Deroceras laeve*. Большинство исследованных популяций этого вида характеризовались нулевой гетерозиготностью и только в нескольких был обнаружен небольшой процент гетерозигот, что, по мнению авторов, свидетельствует о смешанной системе размножения (McCracken, Selander, 1980).

Генетическая структура популяций *L. flavus* существенно отличается от ранее описанных случаев. Обнаруженные клоны, как правило, гомозиготны только по одному из двух исследованных полиморфных локусов, а по второму гетерозиготны. Один клон (*L. flavus*-IV) оказался гетерозиготным по обоим локусам. При этом почти все популяции представлены отдельными клонами. Только в двух случаях наблюдали сосуществование нескольких генетических форм. Так, два клона из с. Корнина были гетерозиготами по локусу *Est-3* (*Est-3<sup>a/b</sup>*) и гомозиготами по локусу *Est-1*. При этом у *L. flavus*-I наблюдали фиксацию аллеля *Es-1<sup>b/b</sup>*, тогда как *L. flavus*-V характеризовался фиксированным аллелем *Es-1<sup>c/c</sup>*. У моллюсков из Крыма (п. Малореченское) наблюдается противоположная ситуация. По локусу *Est-1* все исследованные экземпляры были гомозиготными (*Es-1<sup>b/b</sup>*), а по локусу *Est-3* отмечены три фиксированных гетерозиготных генотипа (табл. 2). При этом *L. flavus*-III характеризуется тригетерозиготным генотипом этого локуса (*Es-3<sup>a/b/c</sup>*). Такая структура более присуща полиплоидным организмам, но уже обнаружена нами ранее в некоторых популяциях диплоидного пресноводного моллюска *Planorbarius corneus* (Межжерин и др., 2006). Описанные особенности генетической структуры популяций *L. flavus* больше напоминают структуру популяций партеногенетических видов дождевых червей (Межжерин и др., 2007; Terhivuo, Sauga, 2006), которые представлены многочисленными клонами с фиксированными генотипами.

Вопрос о происхождении моногенетических линий у слизней до сих пор является предметом дискуссии. На основании результатов экспериментов по скрещиванию *D. leave* (Nicklas, Hoffmann, 1981) авторы сделали вывод о размножении этого вида путем партеногенеза. Однако другие исследователи (Foltz et al., 1984) склонны считать подобную структуру популяций слизней следствием самооплодотворения, хотя возможность партеногенеза полностью не исключают, справедливо отмечая, что ясность в этот вопрос могли бы внести цитогенетические исследования (Foltz et al., 1984).

Проведенный нами кариологический анализ свидетельствует о нормальном протекании мейоза у *L. flavus*. Следовательно, классический апомиксис можно исключить. Маловероятными являются также формы партеногенеза с восстановлением диплоидности путем премейотического удвоения хромосомного набора и блокировки первого или второго деления мейоза, поскольку в этих случаях в мейозе количество хромосом должно быть диплоидным. Однако существует, по крайней мере, две модели, в соответствии с которыми диплоидность хромосомного набо-

ра восстанавливается после мейоза (De Meeus et al., 2007). В первом случае происходит удвоение генома гаметы, что ведет к снижению гетерозиготности. Во втором — восстановление диплоидности происходит в результате слияния полярных тел, что приводит к полному восстановлению материнского генома. Этот вариант более соответствует генетической структуре популяций *L. flavus*.

## Выводы

Таким образом, *L. flavus* является поликлональным видом, большинство популяций которого представлены отдельными клонами и только в некоторых случаях наблюдается сосуществование нескольких генетических форм. Отсутствие промежуточных генотипов в последнем случае свидетельствует об их репродуктивной изоляции. В пользу этого свидетельствует и некоторая морфологическая обособленность этих генетических форм. Подобная генетическая структура популяций характерна для партеногенетических организмов. Поскольку в результате мейоза у этого вида образуются гаплоидные клетки ( $n = 31$ ), наиболее вероятным является партеногенетическое размножение с восстановлением диплоидности после мейоза.

- Гарбар Д. А., Гарбар О. В. Кариологические особенности рода *Planorbarius* (Gastropoda, Pulmonata, Bulinidae) фауны Украины // Цитология и генетика. — 2007. — № 2. — С. 49–55.
- Лихарев И. М., Виктор А. И. Слизни фауны СССР и сопредельных стран (Gastropoda terrestria nuda) // Фауна СССР. Сер. Нов. — Л.: Наука, 1980. — 3, вып. 5, № 122. — 438 с.
- Межжерин С. В., Власенко Р. П., Гарбар А. В. Анализ клонового разнообразия двух видов апомиктических дождевых червей (Lumbricidae: Aporrectodea) и проблемы изменчивости мелких и крупных организмов // Доп. НАН України. — 2007. — № 8. — С. 151–156.
- Межжерин С. В., Гарбар Д. А., Гарбар О. В. Ресистематика моллюсков рода *Planorbarius* (Gastropoda, Pulmonata) фауны Украины: опыт решения проблемы на основе геногеографического подхода // Доп. НАН України. — 2006. — № 9. — С. 170–175.
- Сверлова Н. В., Крамаренко С. С., Шкарлюк А. Н. Наземная малакофауна Северо-Западного Причорномор'я: основные результаты и перспективы исследований // Чтения памяти А. А. Браунера: Материалы междунар. конф. — Одесса: АстроПринт, 2000. — С. 29–34.
- Backeljau T., Bruyn L., Wolf H., Jordaens K., Dongen S., Winnepenninckx B. Allozyme diversity in slugs of the Carinarion complex (Mollusca, Pulmonata) // Heredity. — 1997. — N 78. — P. 445–451.
- Beeson G. Chromosome Numbers of Slugs // Nature. — 1960. — N 186. — P. 257–258.
- De Meeus T., Prugnolle F., Agnew P. Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects // Cell. Mol. Life Sci. — 2007. — 64, N 11. — P. 1355–1372.
- Evans N. J. The use of electrophoresis in the separation of two closely related species of terrestrial slugs // Biochemical Systematic and Ecology. — 1985. — 13, N 3. — P. 325–328.
- Foltz D., Ochman H., Selander K. Genetic diversity and breeding systems in terrestrial slugs of the families Limacidae and Arionidae // Malacologia. — 1984. — 25 (2). — P. 593–605.
- McCracken G., Selander R. Self — fertilization and monogenic strains in natural populations of terrestrial slugs // Proc. Natl. Acad. Sci.(USA). — 1980. — 77, N 1. — P. 684–688.
- Nicklas N., Hoffmann R. Apomictic parthenogenesis in a hermaphroditic terrestrial slug *Deroceras* leave (Muller) // Reference: Biol. Bull. — 1981. — N 160. — P. 123–135.
- Peacock F. C., Bunting S. L., Queen K. G. Serum protein electrophoresis in acrilamide gel patterns from normal human subjects // Science. — 1965. — 147. — P. 1451–1455.
- Terhivuo J., Saura A. Dispersal and clonal diversity of North-European parthenogenetic earthworms // Biol. Invasions. — 2006. — 8. — P. 1205–1218.
- Thiriot-Quievreux C. Advances in chromosomal studies of gastropod mollusks // J. Moll. Stud. — 2003. — 69. — P. 187–201.