

БІОХІМІКО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СЛИЗНІВ

Т. Чернишова

Житомирський національний агроекологічний університет
Старий бульвар, 7, Житомир 10008, Україна
e-mail: taya21@inbox.ru

В оглядовій статті узагальнено останні літературні відомості щодо досліджень генетичної структури популяцій видів деяких родин слизнів (Arionidae, Philomycidae і Limacidae) методом біохімічного генного маркування (електрофорезу в поліакриламідному гелі). Також було встановлено, що досліджувані види родини Arionidae виявилися досить мономорфними генетично. Генетична структура популяцій і способи розмноження представників родини Limacidae залишаються практично недослідженими. На території України подібні дослідження проводили при вивченні генетичної структури популяцій і способів розмноження чотирьох видів роду *Limax*: *L. maximus*, *L. cinereoniger*, *L. flavus* і *L. ecarinatus*.

Ключові слова: слизні, алозимні спектри, електрофорез.

Як відомо, наземні молюски, в тому числі й слизні, є гермафродитами і розмножуються шляхом амфіміксису. Водночас опубліковано дані щодо можливості у них самоzapліднення та партеногенезу [12, 13]. Тому для дослідження генетичної структури популяцій тепер застосовують метод біохімічного генного маркування (електрофорез у поліакриламідному гелі), оскільки він дає можливість визначити характер генетичної мінливості популяцій [11, 14, 19, 21].

Біохіміко-генетичні дослідження різноманітних груп молюсків, у тому числі і слизнів, почали використовувати для дослідження генетичної структури популяцій з 80-х років ХХ ст. Але на даний період таких досліджень для різних родин слизнів, на жаль, небагато, а на території України вони представлені лише епізодично.

Виходячи з цього, метою даної роботи є огляд і аналіз результатів біохіміко-генетичних досліджень різних родин слизнів.

У результаті електрофоретичних досліджень малакологами 80 популяцій 14 видів слизнів, які належать до трьох родин (Arionidae, Philomycidae і Limacidae) на території східних штатів США, було встановлено, що явище самоzapліднення характерне для деяких видів досліджуваних тварин [12]. Доведено, що для *Arion hortensis*, *Philomycus carolinianus*, *Limax maximus*, *Lehmannia valentiana* і *Deroceras reticulatum* характерний поліморфізм генів та наявність гетерозигот, що свідчить про амфіктичне розмноження. У *Arion subfuscus*, *Arion intermedius*, *Arion fasciatus*, *Arion circumscriptus* і *Arion silvaticus* гетерозигот не виявлено, що може свідчити про самоzapліднення [12]. Досить складна ситуація виникла з *Deroceras leave*, при генному маркуванні якого виявилось, що цей вид може розмножуватись як автономіктично, так і амфіктично [12]. У результаті пізніших досліджень цього виду з Пітсбурга, Пенсільванії та двох штатів США [13] було зроблене припущення, що цей вид переважно розмножується шляхом апоміктичного партеногенезу. Аналіз алозимної мінливості 17 локусів показав, що більшість із досліджених популяцій представлені одним клоном. Однак наявність незначної частки гетерозигот свідчить про обмежений амфіміксис у деяких популяціях *D. Leave* [13].

При дослідженні генетичної мінливості популяцій 24 видів слизнів родин Arionidae і Limacidae з країн Європи (Великобританії, Франції, Ірландії та інших) і Північної Америки [6] було виявлено, що показник гетерозиготності широко варіює у різних видів: від 0 у *A. circumscriptus*, *A. silvaticus*, *A. fasciatus*, *A. intermedius* і *Deroceras agreste* до 0,19 у *Arion distinctus* і *Deroceras reticulatum*. Наявність гомозиготних ліній у деяких видів родин Arionidae свідчить, що факультативне або облігатне самозапліднення є переважаючою системою їх розмноження. При аналізі популяцій *L. maximus* виявилось, що лише один із проаналізованих 13 локусів є поліморфним. Середня гетерозиготність – 0,027, середній індекс фіксації 0,005. Решта 12 локусів (α -Gpd, Mdh, Ipo, Got, Pgm-1, Pgm-2, Es-1, Es-2, Pep, Lap-2, Mpi, Pgi) із 13 досліджених виявилися мономорфними. Отримані генетичні дані свідчать, що у родині Limacidae переважає амфіміксис. Отже, амфіміксис є звичайною, але не єдиною системою розмноження у більшості видів слизнів [6].

Електрофоретичні дослідження представників підроду *Limacus* проводили у Великобританії [5]. Аналіз електрофоретичних спектрів двох видів *Limax flavus* і *Limax pseudoflavus* показав наявність чітких відмінностей між ними за спектрами неспецифічних естераз (Es), однак популяційно-генетичний аналіз не проводився.

Методом біохімічного генного маркування досліджено ряд видів родини Arionidae: *A. fasciatus*, *A. circumscriptus* та *A. silvaticus* (підрід *Carinarion*), а також *Arion distinctus*, *A. hortensis* і *Arion intermedius* з країн Європи (Великобританії, Швеції та Франції) [4, 7, 9]. Результати ізоелектричного фокусування протеїнів та електрофорезу естераз у поліакриламідному гелі показали, що три види підроду *Carinarion* представлені трьома різними майже мономорфними лініями, при цьому *A. silvaticus* займає проміжну позицію між *A. fasciatus* і *A. circumscriptus*. У *A. circumscriptus* спостерігалися рідкісні гетерозиготи. Автори зазначають, що для цих видів характерне самозапліднення або партеногенез. У *A. distinctus* і *A. hortensis* виявлено по кілька поліморфних ліній, що свідчить про амфіміксис і чітку міжвидову диференціацію.

Подібні результати отримані при аналізі видів підроду *Carinarion* з Європи (Великобританія, Швеція, Бельгія, Австрія, Норвегія, Нідерланди) [4]. Ідентифіковано три гомозиготних генотипи *A. fasciatus*, два – *A. circumscriptus* і п'ятнадцять – *A. silvaticus*, що теж свідчить про самозапліднення. У *A. circumscriptus* виявлено гетерозиготний генотип, що свідчить про можливість амфіміксису в представників підроду *Carinarion*.

Дослідження *A. silvaticus* і *A. circumscriptus* із Бельгії з десяти різних біотопів [9] свідчить про наявність п'ятнадцяти генотипів для першого та двох для другого. Автори встановили, що *A. silvaticus* характеризується більшою генетичною мінливістю і займає ширшу екологічну нішу. У результаті генного маркування виявлено тільки один гетерозиготний генотип за лактатдегідрогеназою у *A. silvaticus*. Отже, в цілому, для цих видів характерне самозапліднення, однак у деяких випадках можливий амфіміксис.

Оскільки дослідники використовують різні методи електрофорезу для встановлення генетичної структури популяцій слизнів, то значний інтерес становить порівняльний аналіз результатів, отриманих цими методами. Так досліджено алозимну мінливість трьох видів підроду *Carinarion* із Пн. Америки: *A. fasciatus*, *A. circumscriptus* та *A. silvaticus* із застосуванням двох методів електрофорезу: в поліакриламідному та крохмальному гелі [7]. Виявилось, що ці два методи дають подібні результати і за ними досліджувані види чітко відрізняються.

Відомо, що молекулярно-генетичні методи, а особливо дослідження структури ДНК, забезпечують дослідників новою інформацією щодо розмежування різних видів слизнів, географічного поширення їх біотипів і встановлення філогенетичних відстаней між ними.

В останні роки з'явилася низка робіт, присвячених вивченню структури ДНК слизнів роду *Arion* [10, 15–18, 20].

Так, європейськими дослідниками було встановлено послідовність мітохондріальної (16гДНК) та ядерної ДНК для видів роду *Arion*: *Arion subfuscus* і *Arion fuscus* з Бельгії та Німеччини [10]. Авторами було виділено дві еволюційні лінії *A. fuscus* і п'ять алопатричних еволюційних ліній для *A. subfuscus*, дві з яких, можливо, гібридизують між собою.

Аналіз мітохондріальної (16гДНК) видів *A. subfuscus* і *A. fuscus* з північно-східної континентальної Європи підтвердив дані морфологічного й алозимного аналізів, щодо їх видової самостійності [15–18]. У межах *A. subfuscus* у результаті аналізу ДНК було виділено три таксони. Однак у зв'язку з парасимпатичним розподілом цих таксонів, відсутністю алозимної й морфологічної диференціації та високого ступеня внутрішньовидової мінливості ДНК автори не розглядають ці таксони як окремі види з точки зору сучасної біологічної концепції виду. Подібні результати були отримані при дослідженні 51 популяції *A. subfuscus* із 3х. Європи [16]. На основі аналізу мітохондріальної ДНК було виділено п'ять гаплотипів цього виду з рівнем дивергенції 9–21%.

Як відомо, *A. subfuscus* був інтродукований у Пн. Америку [17]. Європейські дослідники намагалися встановити, які саме таксони *A. subfuscus* із Європи розселилися в США. Встановлено, що *A. subfuscus* у Європі представлений п'ятьма (S1-S5) моногенетичними лініями. Всі популяції цього виду на території США виявилися представлені єдиною лінією – *A. subfuscus* S1, і, отже, втрата генетичної різноманітності є наслідком ефекту засновника, що не завадило широкому розповсюдженню *A. subfuscus* у новому середовищі [17].

Цими ж дослідниками [18] проведено філогенетичний аналіз 88 популяцій *A. fuscus* з Європи, який показав наявність двох еволюційних ліній. Одна з них приурочена до Балканського регіону, а інша – до Альп і решти Європи. Відмінності між цими лініями низькі (3,3%), однак потік генів відсутній. Вчені припускають, що два ареали були ізольовані з кінця пліоцену або раннього плейстоцену. Алозимна диференціація між географічними вибірками та лініями, виділеними на основі мітохондріальної ДНК, є низькою. Отримані в результаті досліджень дані показали, що гаплотипна й нуклеотидна різноманітність *A. fuscus* невисока у північній Європі, що є результатом швидкого розселення єдиного гаплотипу. Обмежений діапазон розподілу виявлених гаплотипів дав змогу припустити, що потік генів був низький і генетична різноманітність в Альпах є вищою ніж у інших регіонах. За оцінками цих дослідників, потік генів зі східних Альп у минулому був високим. Вчені зробили припущення, що у плейстоцені це були зони рефугіумів.

Подібні дослідження проводили польські малакологи [20]. У результаті дослідження двох видів роду *Arion*: *Arion lusitanicus* (Mabille, 1868) та *Arion rufus* (Linnaeus, 1758) з різних частин Польщі ними виявлено вісім гаплотипів. Генетична різноманітність *A. lusitanicus* варіює у межах 0,5–2,1%, а у *A. rufus* – 0,4–1%. Відмінності між двома видами перебувають на рівні 12%. Три популяції *A. lusitanicus* і дві популяції *A. rufus* виявились мономорфними, але у кожного виду спостерігалася широка міжпопуляційна мінливість. Вчені припускають, що польські популяції *A. lusitanicus* походять від окремих повторних вселень із різних частин Європи.

Отже, види родини Arionidae виявились досить мономорфними генетично. У ряду представників виявлені видоспецифічні алелі, по яких відсутній внутрішньовидовий поліморфізм. Однак у деяких випадках спостерігаються одиничні гетерозиготи. Встановлено, що деякі види слизнів насправді є видовими комплексами, кожен із членів яких представлений серією моногенетичних ліній, що суттєво ускладнює їх ідентифікацію.

Цілий ряд видів родини Arionidae та *D. leave* характеризуються клоновою структурою популяцій, що свідчить на користь розмноження шляхом самозапліднення, хоча не виключений і партеногенез.

Щодо генетичних досліджень родини Limacidae, то вони взагалі епізодичні [6, 12]. Були спроби застосування електрофорезу в крохмальному гелі для ідентифікації видів родини Limacidae [8], але генетична структура популяцій і способи розмноження представників родини Limacidae залишаються практично недослідженими. На території України подібні дослідження проводилися при вивченні генетичної структури популяцій і способів розмноження чотирьох видів роду *Limax*: *L. maximus*, *Limax cinereoniger*, *L. flavus* та *Limax escarinatus* [1–3].

Так, проведений аналіз алозимної мінливості *L. maximus* із 10 областей України в більшості випадків показав збалансоване співвідношення гомо- і гетерозиготних генотипів (рис. 1) та відсутність фіксації окремих алелей, що свідчить про переважно амфіміктичний спосіб розмноження цього виду [2].

Однак у деяких випадках спостерігається фіксація генотипів у гомозиготному стані, що може бути наслідком автоміксису, а отже, для *L. maximus* характерна змішана система розмноження.

При дослідженні генетичної структури популяцій *L. cinereoniger* з пн.-зх. регіону України [3] було встановлено, що шість із семи досліджених популяцій *L. cinereoniger* представлені моногенетичними лініями (біотипами) (рис. 2).

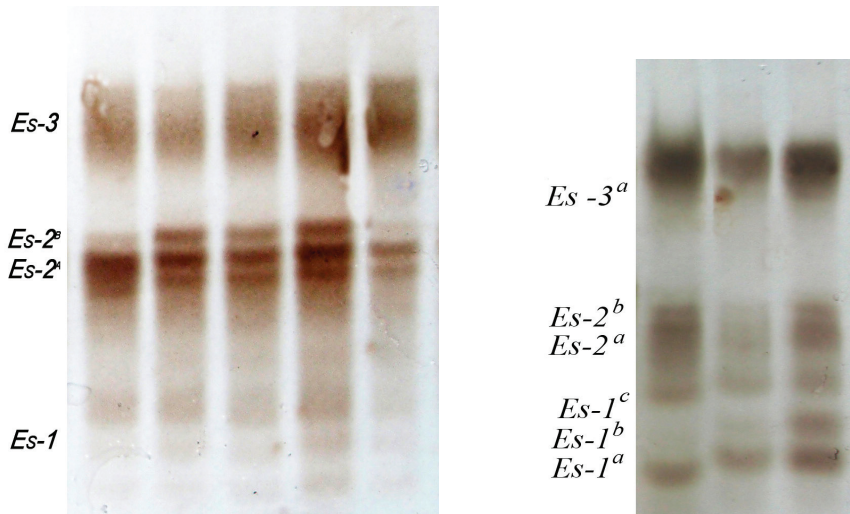


Рис. 1. Мінливість неспецифічних естераз *L. maximus*. Рис. 2. Мінливість неспецифічних естераз *L. cinereoniger*.

Всього за характером поліморфізму досліджених локусів було виділено 8 біотипів *L. cinereoniger*. Лише одна популяція із м. Кременець виявилась амфіміктичною. Результати проведеного дослідження доводять, що популяції *L. cinereoniger* на території України представлені амфіміктичною формою та популяціями, особини яких характеризуються фіксованими генотипами [3].

У результаті аналізу алозимної мінливості *L. flavus* встановлено, що в особин більшості популяцій *L. flavus* на території України спостерігається фіксація гомо- та гетерозиготних генотипів за окремими локусами [1]. У вибірках із цих популяцій за характером

поліморфізму досліджених локусів було виділено 9 біотипів *L. flavus*, що характеризуються фіксованими генотипами локусів *Es-2* та *Es-3* (рис. 3).

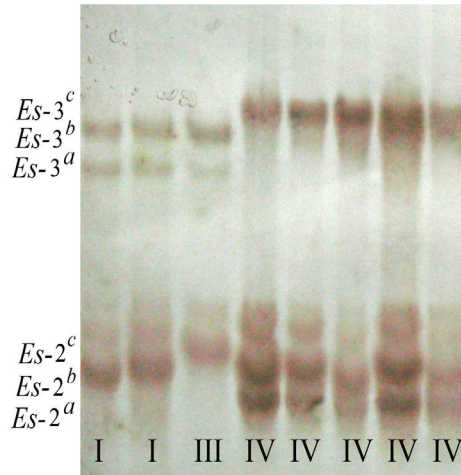


Рис. 3. Мінливість неспецифічних естераз *L. flavus*.

Унаслідок цього кожна популяція виявляється представлена переважно однією, а іноді кількома генетичними формами (біотипами). При цьому проміжні генотипи між біотипами відсутні, що свідчить про їхню репродукційну ізоляцію. Така, по суті, клонова структура популяцій характерна для партеногенетичних організмів і не може бути наслідком автоміксису. Лише у кількох вибірках із півдня країни генетична структура відповідала моделі панміктичної популяції, а отже, молюски у цих випадках розмножуються амфіміктично [1].

У результаті каріологічних досліджень українських популяцій слизнів роду *Limax*: *L. maximus*, *L. cinereoniger* та *L. flavus* встановлено їхні диплоїдні ($2n=62$) та гаплоїдні ($n=31$) хромосомні числа, а також число хромосомних плеч ($NF=124$) [1–3]. Усі вони виявились однаковими.

У результаті проведеного аналізу й огляду результатів біохіміко-генетичних досліджень деяких родин слизнів (*Arionidae*, *Philomycidae* і *Limacidae*) методом біохімічного генного маркування (електрофорезу в поліакриламідному гелі) з різних країн світу, було встановлено, що досліджувані види родини *Arionidae* виявились досить мономорфними генетично. Також встановлено, що деякі види слизнів (*A. subfuscus* та *A. fuscus*) насправді є видовими комплексами, кожен із членів яких представлений серією моногенетичних ліній, що суттєво ускладнює їх ідентифікацію. Ціла низка видів родини *Arionidae* та *D. leave* характеризуються клоновою структурою популяцій, що свідчить на користь розмноження шляхом автоміксису, хоча не виключений і партеногенез.

Щодо біохіміко-генетичних досліджень родини *Limacidae*, то вони є епізодичними. Генетична структура популяцій і способи розмноження представників родини *Limacidae* залишаються практично недослідженими. На території України подібні дослідження проводили при вивченні генетичної структури популяцій і способів розмноження чотирьох видів роду *Limax*: *L. maximus*, *L. cinereoniger*, *L. flavus* та *L. ecarinatus*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Чернышова Т. М., Гарбар А. В. Клональная изменчивость *Limax flavus* (Linnaeus, 1758) (Pulmonata, Limacidae): аллозимный, кариологический и морфологический анализ // Вестник зоологии. 2011. Т. 45. № 1. С. 3–9.
2. Чернышова Т. М., Гарбар А. В., Гарбар Д. А. Генетическая структура популяций и морфологическая изменчивость *Limax maximus* (Linnaeus, 1758) (Pulmonata, Limacidae) Правобережной Украины // Ruthenica. 2011. Vol. 21. No. 1. P. 1–8.
3. Чернышова Т. М., Гарбар А. В. Генетическая структура популяций и морфологическая изменчивость *Limax cinereoniger* Wolf, 1803 (Limacidae) на территории Украины // Наук. записки Тернопіль. нац. пед. ун-ту. Сер. біол. 2012. С. 300–304.
4. Backeljau T., Bruyn L., Wolf H. et al. Allozyme diversity in slugs of the *Carinarion* complex (Mollusca, Pulmonata) // Heredity. 1997. N 78. P. 445–451.
5. Evans N. J. The use of electrophoresis in the separation of two closely related species of terrestrial slugs // Biochem. Syst. Ecol. 1985. Vol. 13. N 3. P. 325–328.
6. Foltz D., Ochman H., Selander K. Genetic diversity and breeding systems in terrestrial slugs of the families Limacidae and Arionidae // Malacologia. 1984. N 25 (2). P. 593–605.
7. Geenen S., Jordaens K., Castilho R., Backeljau T. Congruence between starch gel and polyacrylamide gel electrophoresis in detecting allozyme variation in pulmonate land slugs // Electrophoresis. 2003. N 24. P. 622–627.
8. Grossu A. V., Tesio G. Suggestions for species grouping within the family Limacidae (Gastropoda, Pulmonata) by biochemical methods // Proc. malac. Soc. Lond. 1975. N 41. S. 321–329.
9. Jordaens K., Scheirs J., Verhagen R., Backeljau T. Ecogenetic comparison of the selfing terrestrial slugs *Arion silvaticus* and *A. circumscriptus* in Belgium (Mollusca: Pulmonata: Arionidae) // Hereditas. 1998. N 129. P. 27–36.
10. Jordaens K., Pinceel J., Kriekemans H., Backeljau T. Accurate identification of cryptic slug taxa of the *Arion subfuscus/fuscus* complex by PCR-RFLP (Pulmonata: Arionidae) // Research notes. 2006. P. 323–325.
11. Lokki J., Saura A. Genetic polymorphism and evolution in parthenogenetic animals. XI. Genetic differentiation in parthenogenetic populations // Hereditas. 1980. Vol. 92. P. 275–278.
12. McCracken G., Selander R. Self – fertilization and monogenic strains in natural populations of terrestrial slugs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. Vol. 77. No. 1. P. 684–688.
13. Nicklas N., Hoffmann R. Apomictic parthenogenesis in a hermaphroditic terrestrial slug *Deroceras leae* (Müller) // Biol. Bull. 1983. N 160. P. 123–135.
14. Parker E. D., Nicklasson M. Genetic structure and evolution in parthenogenetic animals // Evolutionary genetics from molecules to morphology. Cambridge: Cambridge University Press. 1999. P. 456–474.
15. Pinceel J., Jordaens K., Van Houtte N. et al. Molecular and morphological data reveal cryptic taxonomic diversity in the terrestrial slug complex *Arion subfuscus/fuscus* (Mollusca, Pulmonata, Arionidae) in continental north-west Europe // Biol. J. Linn. Soc. 2004. N 83. P. 23–38.
16. Pinceel J., Jordaens K., Backeljau T. Extreme mtDNA divergences in a terrestrial slug (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae): accelerated evolution, allopatric divergence and secondary contact // J. Evol. Biol. 2005. N 18. P. 1264–1280.
17. Pinceel J., Jordaens K. N., Van Houtte et al. Van Houtte Population genetics and identity of an introduced terrestrial slug: *Arion subfuscus* s.l. in the north-east USA (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae) // Genetica. 2005. T 125. P. 155–171.
18. Pinceel J., Jordaens K., Pfenninger M., Backeljau T. Rangewide phylogeography of a terrestrial slug in Europe: evidence for Alpine refugia and rapid colonization after the Pleistocene glaciations // Mol. Ecol. 2005. N 14. P. 1133–1150.

19. Pongratz N. T., Sharbel L. W., Beukeboom N. K. Allozyme variability in sexual and parthenogenetic freshwater planarians: evidence for polyphyletic origin of parthenogenetic lineages through hybridization with coexisting sexual // *Heredity*. 1998. Vol. 81. N 1. P. 38–42.
20. Soroka M., Kozłowski J., Wiktor A., Kałuski T. Distribution and Genetic Diversity of the Terrestrial Slugs *Arion lusitanicus* Mabille, 1868 and *Arion rufus* (Linnaeus, 1758) in Poland Based on Mitochondrial DNA // *Folia Biologica*. Kraków. 2009. Vol. 57. No 1–2. P. 71–81.
21. Stenberg P., Lundmark M. Distribution, mechanisms and evolutionary significance of clonality and polyploidy in weevils // *Agr. For. Entomol.* 2004. Vol. 6. P. 1–8.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 20.11.14

прийнята до друку 02.12.14

BIOCHEMICAL GENETIC STUDIES OF SLUGS AND SELF-FERTILIZATION'S (AUTOMIXIS) PROBLEM

T. Chernyshova

National Agroecological University of Zhytomyr
7, Staryi Blvd., Zhytomyr 10008, Ukraine
e-mail: taya21@inbox.ru

The review article summarizes recent literature data on studies of the genetic structure of some slug families' populations (Arionidae, Philomycidae and Limacidae) by biochemical gene marking (electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis). It was found that investigating species of the Arionidae family were rather genetically monomorphic. The genetic structure of populations and methods of Limacidae family reproduction remain virtually unexplored. In Ukraine, these studies were conducted to reveal the genetic structure of populations and methods of reproduction of the *Limax* genus four species: *L. maximus*, *L. sinereoniger*, *L. flavus* and *L. ecarinatus*.

Keywords: slugs, allozymic ranges, electrophoresis.

БИОХИМИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛИЗНЕЙ И ПРОБЛЕМА АУТОМИКСИСА

Т. Чернышова

Житомирский национальный агроэкологический университет
Старый бульвар, 7, Житомир 10008, Украина
e-mail: taya21@inbox.ru

В обзорной статье обобщены последние литературные сведения об исследованиях генетической структуры популяций видов некоторых семейств слизней (Arionidae, Philomycidae и Limacidae) методом биохимической геной маркировки (электрофореза в полиакриламидном геле). Также было установлено, что исследованные виды семейств Arionidae оказались достаточно мономорфными генетически. Генетическая структура популяций и способы размножения представителей семейства Limacidae остаются практически неисследованными. На территории Украины подобные исследования проводились при изучении генетической структуры популяций и способов размножения четырех видов рода *Limax*: *L. maximus*, *L. cinereoniger*, *L. flavus* и *L. ecarinatus*.

Ключевые слова: слизни, аллозимные спектры, электрофорез.