

ЗООЛОГІЯ

УДК [594.382.5:575. 2(477)]

**МІНЛИВІСТЬ ВИДІВ РОДУ *LIMAX* (LINNAEUS, 1758)
(PULMONATA, LIMACIDAE) ФАУНИ УКРАЇНИ**

Т. Чернишова

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

У результаті комплексного аналізу біохіміко-генетичних, морфологічних і анатомічних ознак чотирьох видів роду *Limax* фауни України встановлено чіткі відмінності між ними за алозимними спектрами та морфометричними параметрами. Розподіл популяцій досліджених видів на три чіткі кластери як за генетичними дистанціями, так і за сукупністю морфологічних ознак свідчить про морфологічну неоднорідність *L. cinereoniger* та складну структуру роду *Limax*, яка потребує подальшого вивчення.

Ключові слова: слизні, алозимні спектри, електрофорез.

Види роду *Limax*, що трапляються у фауні України, характеризуються чіткими відмінностями за низкою морфологічних ознак (будова дистальних відділів статеві системи; форма і положення органів мантийного комплексу; відмінності в будові радули), тому зазвичай не виникає проблем із їх ідентифікацією. Однак дослідження, проведені в останні десятиліття із застосуванням біохімічних та генетичних методів [2–4], показали, що принаймні деякі види слизнів насправді є видовими комплексами, кожен із членів яких представлений серією амфіміктичних і аутоміктичних ліній (біотипів), що суттєво ускладнює їх ідентифікацію [5, 8–10]. У цих випадках використання традиційних ознак дає змогу ідентифікувати лише видові комплекси, а для розділення видів у межах одного комплексу часто доводиться шукати нові ознаки. Так, виявилось, що види комплексу *Arion fuscus/subfuscus*, виділені на основі генетичних даних, надійно ідентифікуються лише за морфологією гонади [5, 8], а види комплексу *L. cinereoniger* диференціюються лише за пропорціями копулятивного апарату [6, 12]. Слід зазначити, що слизні роду *Limax* фауни України у цьому аспекті залишаються недослідженими.

Враховуючи вищезазначені факти, актуальним є дослідження генетичної структури популяцій видів роду *Limax*, а також проведення комплексного аналізу біохіміко-генетичних, зовнішньоморфологічних і анатомічних ознак видів роду *Limax* з метою уточнення їх діагнозів та систематичного положення.

Матеріали та методи

Досліджено 60 вибірок моллюсків роду *Limax*: 22 – *L. maximus*; 7 – *L. cinereoniger*; 16 – *L. flavus*; 5 – *L. ecarinatus*, зібраних з території 21 області України і АР Крим у весняно-осінній період 2008–2010 рр. Моллюски роду *Limax* виявлено на території 14 областей (Вінницької, Житомирської, Запорізької, Київської, Кіровоградської, Львівської, Одеської, Рівненської, Тернопільської, Херсонської, Хмельницької, Черкаської, Чернівецької, Чернігівської) й Автономної Республіки Крим. Збір і дослідження моллюсків проводили за загальноприйнятими методиками [1].

Для біохімічного генного маркування та морфологічних досліджень використано всього 512 екз. слизнів, 364 ідентифікованих як *L. maximus*; 40 – як *L. cinereoniger*; 120 – як *L. flavus* та 12 – як *L. ecarinatus* за визначниковими таблицями [1, 11].

Методом електрофорезу в поліакриламідному гелі з використанням ТРИС-ЕДТА-боратної системи буферів [7] в екстрактах із хвостової частини тіла досліджено електрофоретичну мінливість спектрів ферментів аспартатамінотрансферази (*Aat*), малатдегідрогенази (*Mdh*), лактатдегідрогенази (*Ldh*), неспецифічних естераз (*Es*) і супероксиддисмутази (*Sod*).

На живому матеріалі визначали характер фонового забарвлення, малюнок на мантиї та спині, колір слизу. Подальші дослідження проводили на слизнях, фіксованих у 70%-вому розчині етанолу. Розтин слизнів проводили під мікроскопом МБС-1 у 70%-вому розчині етанолу за загальноприйнятими методиками [1]. Вимірювали довжину тіла молюска (*L*), яйцеводу (*Lov*), сім'яприймача (*Lsp*), резервуара сім'яприймача (*Lrs*), пеніса (*Lp*).

Статистична обробка даних здійснена за допомогою пакету прикладних статистичних програм STATISTICA 6.0.

Результати і їхнє обговорення

Здійснене генетичне маркування на основі електрофорезу в поліакриламідному гелі свідчить про наявність чітких відмінностей у генетичних маркерах між усіма дослідженими видами (табл. 1).

Таблиця 1

Генетичні відмінності між видами роду *Limax*

Ферменти Вид	<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh-2</i>	<i>Mdh-3</i>	<i>Sod</i>	<i>Aat</i>	<i>Es-3</i>
<i>L. maximus</i>	0	bb	aa	bb	bb	ab
<i>L. cinereoniger</i>	0	aa	bb	aa	aa	ab, ac, cc
<i>L. flavus</i>	aa	aa	bb	aa	bb	ab, cc
<i>L. ecarinatus</i>	aa	aa	bb	aa	bb	ad

Примітка. *Mdh* – малатдегідрогеназа; *Aat* – аспартатамінотрансфераза; *Es* – неспецифічні естерази; *Sod* – супероксиддисмутази.

Так, за спектрами малатдегідрогенази спостерігається фіксація альтернативних алелей у *L. maximus* та *L. cinereoniger* видів підроду *Limacus* (*L. flavus* та *L. ecarinatus*). Електрофоретичний спектр супероксиддисмутази (*Sod*) є діагностичним для *L. maximus*, а спектр аспартатамінотрансферази (*Aat*) – для *L. cinereoniger*. Представники підроду *Limacus* виявилися дуже подібними за алозимними спектрами, однак у *L. ecarinatus* спостерігається фіксований генотип локусу *Es-3 – Es-3^{ad}*, не характерний для *L. flavus* (табл. 1).

Досліджені популяції роду *Limax* на фонограмі, побудованій за генетичними дистанціями Нея [119], утворюють три чіткі кластери (рис. 1). При цьому популяції видів підроду *Limacus* (*L. flavus* та *L. ecarinatus*) об'єднуються на незначній відстані. Однак *L. cinereoniger* за генетичною структурою виявився ближчим до підроду *Limacus*, ніж до *L. maximus*. Популяції останнього виду утворюють окремий кластер, який приєднується на максимальній відстані. Отже, отриманий на фенограмі розподіл досліджених популяцій не відповідає прийнятому у роді *Limax* підродовому поділу.

У табл. 2 подано абсолютні та відносні параметри дистальних відділів статевої системи, за якими відрізняються між собою види роду *Limax*.

Аналіз основних морфологічних параметрів досліджуваних видів свідчить про наявність чітких вірогідних відмінностей між ними (табл. 3).

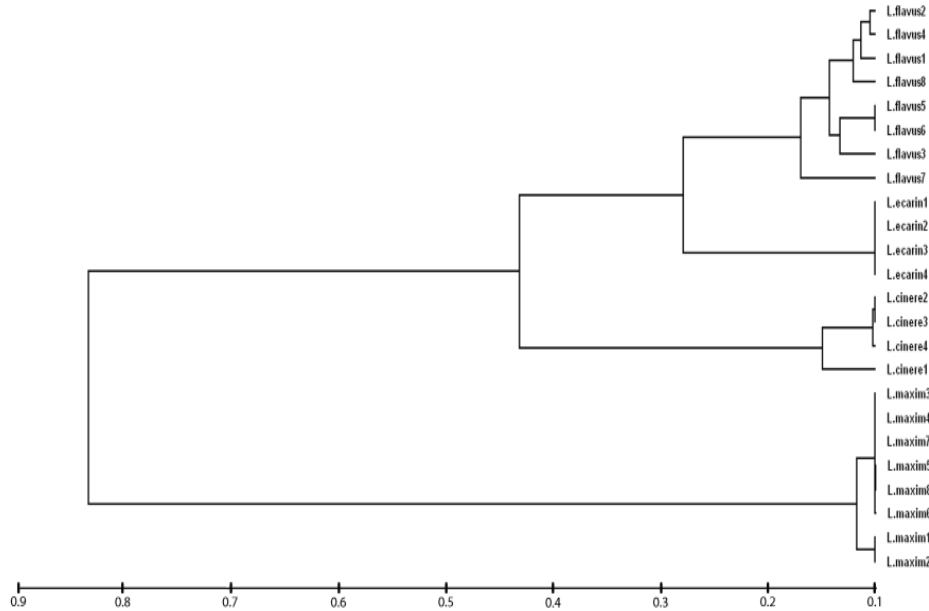


Рис. 1. Фенограма розподілу найбільш масових популяцій роду *Limax* за генетичними дистанціями Нея.

Таблиця 2

Мінливість морфологічних параметрів видів роду *Limax*

Вид \ Ознаки	Lsp	Lov	Lov/L	Lp	Lp/L
	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m
<i>L. maximus</i>	4,36±0,11	17,52±0,35	0,31±0,01	28,11±0,74	0,49±0,01
<i>L. cinereoniger</i>	5,93±0,31	14,73±0,82	0,3±0,02	66,12±2,76	1,37±0,06
<i>L. flavus</i>	4,18±0,13	14,17±0,3	0,33±0,01	11,03±0,49	0,26±0,01
<i>L. ecarinatus</i>	3,37±0,46	8,98±1,4	0,21±0,03	8,12±0,79	0,2±0,02

Примітка. Lsp – абсолютна довжина резеруара сім’яприймача (mm), Lov – абсолютна довжина овідукта (mm), Lov/L – відносна довжина овідукта, Lp – абсолютна довжина пеніса (mm), Lp/L – відносна довжина пеніса.

Таблиця 3

Вірогідні відмінності за морфологічними ознаками між видами роду *Limax*
(ANOVA, LSD - test)

Вид	Lsp	Lrs	Lov	Lp	L	Lp/L	Lov/L	Lrs/Lsp
<i>L. maximus</i> - <i>L. cinereoniger</i>	*	***	***	***	***	***	—	—
<i>L. maximus</i> - <i>L. flavus</i>	—	—	***	***	***	***	—	—
<i>L. maximus</i> - <i>L. ecarinatus</i>	—	—	***	***	***	***	**	—
<i>L. cinereoniger</i> - <i>L. flavus</i>	*	***	—	***	***	***	—	—
<i>L. cinereoniger</i> - <i>L. ecarinatus</i>	*	***	***	***	*	***	*	—
<i>L. flavus</i> - <i>L. ecarinatus</i>	—	—	***	—	—	—	***	—

Примітки. Умовні позначення див. табл. 2; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; “—” відсутні вірогідні відмінності.

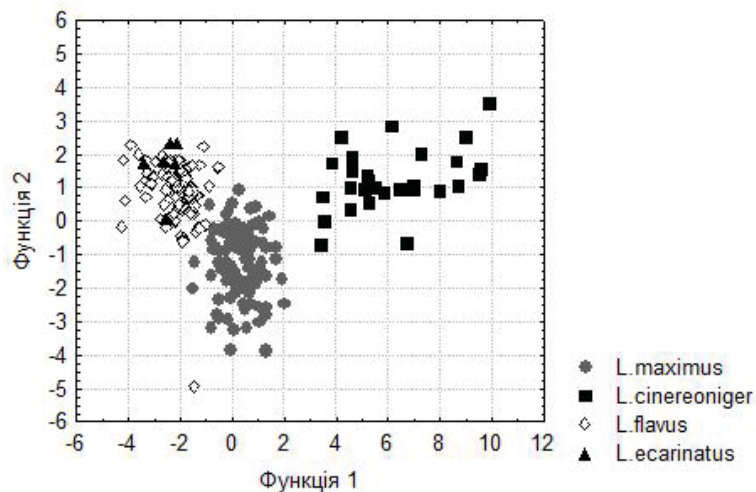
Усі пари видів (за винятком *L. flavus* та *L. ecarinatus*) надійно ідентифікуються за абсолютною та відносною довжиною пеніса. Види підроду *Limacus* – *L. flavus* та *L. ecarinatus* за цими ознаками виявилися подібними, однак вони добре диференціюються за абсолютною та відносною довжиною яйцевода.

Подібні результати дає дискримінантний аналіз видів роду *Limax* (табл. 4, рис. 2). У табл. 4 наведено кількість особин кожного виду, взятого для аналізу, та його рівень дискримінації. Загальний рівень дискримінації високий (96,65%), однак *L. ecarinatus* практично не дискримінується (точність дискримінації 33,33%), і більшість його екземплярів віднесено до *L. flavus*. Найвищий рівень кореляції з канонічними функціями виявляють ознаки, пов'язані з довжиною пеніса й овідукта.

Таблиця 4

Надійність дискримінації видів роду *Limax*

Вид	%	<i>L. maximus</i>	<i>L. cinereoniger</i>	<i>L. flavus</i>	<i>L. ecarinatus</i>
<i>L. maximus</i>	98,89	89	0	1	0
<i>L. cinereoniger</i>	96,43	1	27	0	0
<i>L. flavus</i>	98,82	1	0	84	0
<i>L. ecarinatus</i>	33,33	0	0	4	2
В цілому	96,65	91	27	89	2

Рис. 2. Діаграма розсіяння вибірок видів роду *Limax* у полі перших двох канонічних функцій.

Кластерний аналіз досліджених популяцій видів роду *Limax* (рис. 3) свідчить про їхній чіткий розподіл на три кластери. Всі популяції *L. maximus* утворюють компактний кластер, який на значній відстані об'єднується із кластером, утвореним популяціями видів підроду *Limacus*. Проте два види цього підроду не утворюють окремих кластерів, що свідчить про їхню значну морфологічну подібність. На ще більшій відстані приєднується кластер, утворений популяціями *L. cinereoniger*. При такому дослідженні популяції цього виду на дендрограмі утворюють два чітких кластери, дистанція об'єднання яких навіть перевищує дистанцію між кластерами *L. maximus* та кластерами підроду *Limacus*. Слід зазначити, що характер об'єднання досліджених популяцій за сукупністю морфологічних параметрів на дендрограмі (рис. 3) майже збігається із розподілом цих популяцій за генетичними дистанціями (рис. 1). Цей результат свідчить, з одного боку, про морфологічну неоднорідність *L. cinereoniger*, а з іншого – про невідповідність структури роду *Limax* існуючому поділу

на два підроди. Судячи із дендрограми, доцільним є виділення також у окремий підрід *L. cinereoniger*, що добре узгоджується із останніми даними про збірний характер цього таксону. Однак для остаточних таксономічних висновків із приводу підродової структури роду *Limax* необхідні дослідження інших видів європейської фауни, яких, за сучасними даними, налічується близько 30 видів.

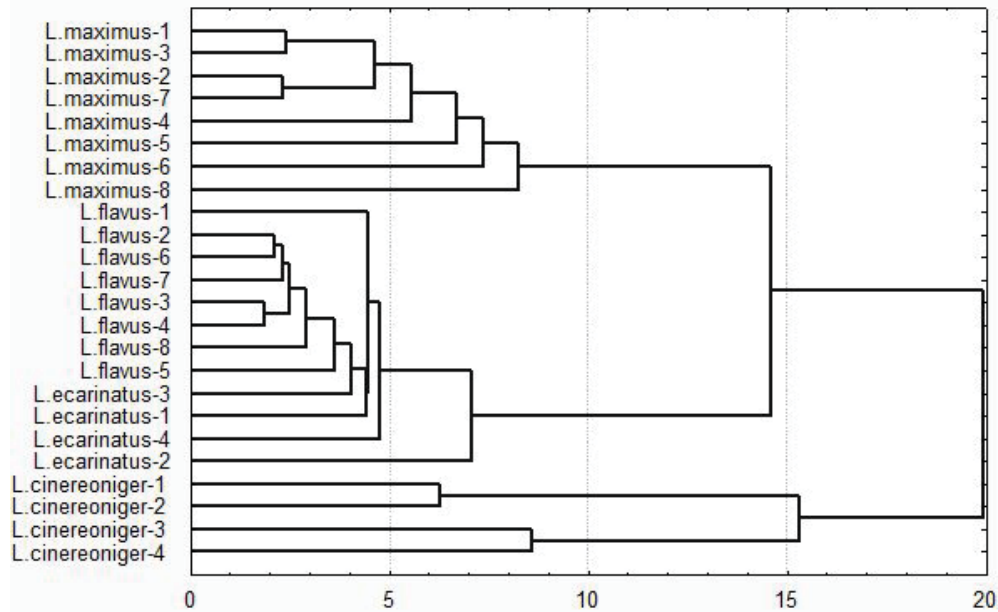


Рис. 3. Дендрограма об'єднання видів роду *Limax* за сукупністю морфологічних параметрів (кластерний аналіз, евклідові дистанції).

Отже, досліджені види роду *Limax* чітко диференціюються за алозимними спектрами та морфометричними параметрами. При цьому всі пари видів надійно ідентифікуються за абсолютною та відносною довжиною пеніса, за винятком *L. flavus* і *L. ecarinatus*, які відрізняються за абсолютною та відносною довжиною яйцевода.

Розподіл популяцій досліджених видів на три чіткі кластери як за генетичними дистанціями, так і за сукупністю морфологічних ознак свідчить про морфологічну неоднорідність *L. Cinereoniger* і складну структуру роду *Limax*, яка потребує подальшого вивчення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Лухарев И. М., Виктор А. Й. Слизни фауны СССР и сопредельных стран (Gastropoda terrestria nuda) // Фауна СССР. Л.: Наука, 1980. Т. 3. Вып. 5. 438 с.
2. Backeljau T., Ahmadyar S. Z., Sekens M. et al. Comparative electrophoretic analyses of three European *Carinarion* species (Mollusca, Pulmonata, Arionidae) // Zool. Scr. 1987. Vol. 16. No. 3. P. 209–222.
3. 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.
4. 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.

5. *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.
6. *Nitz B., Heim R., Schnepf U.* et al. Towards a new standart in slugs species descriptions: the case of *Limax sarnensis* Heim & Nitz n.sp. (Pulmonata: Limacidae) from the western central Alps // J. Molluscan Studies. 2009. N 75. P. 279–294.
7. *Peacock F. C., Bunting S. L., Queen K. G.* Serum protein electrophoresis in acrilamylde gel patterns from normal human subjects // Science. 1965. Vol. 147. P. 1451–1455.
8. *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. Linnean Society. 2004. N 83. P. 23–38.
9. *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.
10. *Soroka M., Kozłowski J., Wiktor A., Kałuski T.* Distribution and Genetic Diversity of the Terrestrial Slugs *Arion lusitanicus* Mabilie, 1868 and *Arion rufus* (Linnaeus, 1758) in Poland Based on Mitochondrial DNA // Folia biologica – Kraków 2009. Vol. 57. No 1–2. P. 71–81.
11. *Wiktor A.* Limacoidea et Zonitoidea nuda. Slimaki pomrowickszaltne (Gastropoda: Stylommatophora) // Fauna Polski. T. 12. Warszawa. 1989. 207 s.
12. *Wiktor A., Bossneck U.* *Limax (Limax) seticus n. sp.* From high mountains in Nepal (Gastropoda: Pulmonata: Limacidae) // Folia malacologica. Poznan. 2004. Vol. 12(4). P. 183–187.

Стаття: надійшла до редакції 07.02.13

доопрацьована 06.03.13

прийнята до друку 22.03.13

VARIABILITY OF SPECIES OF THE *LIMAX* GENUS (LINNAEUS, 1758) (PULMONATA, LIMACIDAE) MOLLUSCS OF THE FAUNA OF UKRAINE

T. Chernyshova

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

As a result of the complex analysis biokhimiko-genetic, morphological and anatomic signs of four species of the *Limax* genus of the fauna of Ukraine, accurate differences between them according to allozymic ranges and morphometric parameters were established. On the one hand distribution of populations of the studied types into three accurate clusters both behind genetic distances and behind set of morphological signs testifies to morphological heterogeneity of *L. cinereoniger* about difficult structure of the *Limax* genus which needs further studying.

Keywords: slugs, allozymic ranges, electrophoresis.

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИДОВ РОДА *LIMAX* (LINNAEUS, 1758)
(PULMONATA, LIMACIDAE) ФАУНЫ УКРАИНЫ**

Т. Чернышова

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

В результате комплексного анализа биохимико-генетических, морфологических и анатомических признаков четырех видов рода *Limax* фауны Украины установлены четкие отличия между ними по алозимным спектрам и морфометрическим параметрам. Распределение популяций исследованных видов на три четких кластера как по генетическим дистанциям, так и по совокупности морфологических признаков свидетельствует о морфологической неоднородности *L. cinereoniger* и сложной структуре рода *Limax*, которая требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: слизни, алозимные спектры, электрофорез.