

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 575.22; 502.4

Э.А. Снегин, О.Ю. Артемчук

Белгородский государственный

Национальный исследовательский университет, г. Белгород, Россия

Оценка состояния популяционных генофондов виноградной улитки (*Helix pomatia* L.) урбанизированных территорий с помощью *ISSR*-маркеров ДНК

На основе метода полимеразной цепной реакции с использованием *ISSR*-маркеров ДНК проанализировано состояние генофондов пяти адвентивных популяций *Helix pomatia* L. (248 особей), обитающих в условиях урбанизированных территорий юго-восточной части современного ареала. Исследования были проведены в г. Белгороде и его окрестностях, а также в городах Харьков, Киев и Житомир. Согласно полученным данным, в большинстве изученных групп отмечается высокий уровень гетерозиготности ($H_e = 0,273 \pm 0,150$) и, несмотря на сильную изоляцию адвентивных популяций, степень генетической дифференциации между ними оказалась невысока. Согласно модели М. Неи (1975) индекс дифференциации $G_{st} = 0,166$, а средний поток генов $Nm = 2,5$ особи за поколение. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) также выявил большое сходство между популяциями *H. pomatia*: $\Phi_{st} = 0,210$, $Nm = 4,1$. Такое генетическое сходство вызвано, вероятно, родственным происхождением или похожими микроклиматическими условиями в городской среде, обуславливающими аналогичные векторы естественного отбора. Это может быть также следствием эффекта «генетической революции», когда в условиях изоляции, т.е. в условиях, в которых сегодня находятся все изучаемые нами популяции *H. pomatia*, селективную ценность получили одни и те же гены, особенно жизнеспособные в гомозиготном состоянии и редкие в открытых популяциях.

Ключевые слова: ПЦР; наземные моллюски; популяционный генофонд; урбанизированный ландшафт.

Введение

Данная работа посвящена изучению популяционной структуры виноградной улитки (*Helix pomatia* Linnaeus, 1758), которая является одним из самых крупных наземных моллюсков Европы. Исходный ареал этого вида приходится на Среднюю и Юго-Восточную Европу, однако в настоящее время, благодаря интродукции, виноградная улитка успешно освоила западные

районы Белоруссии, Украину, Прибалтику, включая г. Калининград [1, 2]. Кроме того, моллюск был отмечен в таких городах, как Санкт-Петербург, Курск, Москва, Харьков и др. [3–5]. Есть информация об интродукции *H. pomatia* на территории Финляндии [6] и США [7]. Такое искусственное расселение объясняется тем, что виноградная улитка издавна считалась ценным пищевым объектом, в связи с чем на территориях, ранее представлявших собой частные парки, поместья, усадьбы и т.п., проводились зачастую успешные попытки акклиматизации *H. pomatia* с целью введения вида в культуру. Возникшие изолированные адвентивные популяции в настоящее время стали хорошими моделями для изучения эволюционных процессов, происходящих в урбанизированных ландшафтах.

В наших предыдущих исследованиях популяционная структура этого вида была изучена с помощью анализа конхиологических признаков и аллозимов [8, 9]. Но использование этих маркеров генетической структуры имеет ряд ограничений. Во-первых, морфометрические параметры раковины у этого моллюска не дискретны и подвержены модификационной изменчивости, что не позволяет проследить за генетическими процессами, протекающими в исследуемых группах. Во-вторых, известно, что белковые маркеры отражают изменчивость только в кодирующей части генома, которая по разным оценкам составляет около 10% от общего количества ДНК, а остальная, так называемая «молчащая» ДНК, остается вне поля зрения. В связи с этим дальнейший анализ состояния популяционных генофондов *H. pomatia* был проведен нами на основе *ISSR*-маркеров ДНК, применение которых основано на использовании одного праймера, имеющего множественные комплементарные участки, разбросанные по всему геному.

Цель работы: на основе межмикросателлитных маркеров ДНК (*ISSR*) оценить состояние генофондов адвентивных популяций *H. pomatia*, обитающих в условиях урбанизированных территорий юго-восточной части современного ареала.

Материалы и методики исследования

Материалом для исследования послужили образцы тканей особей *H. pomatia*, хранящиеся в криобанке, созданном при лаборатории популяционной генетики и генотоксикологии НИУ «БелГУ». Выборки из популяций были сделаны во время экспедиций в период с 2010 по 2013 г. Моллюсков собирали вручную с поверхности почвы, со стеблей и листьев растений, иногда в подстилке. Чтобы избежать умерщвления особей, для анализа были взяты небольшие образцы ткани ноги животных. Всего было исследовано 248 особей из пяти популяций *H. pomatia* (табл. 1).

Анализ изменчивости проводили с использованием полимеразной цепной реакции – методы *ISSR* (*Inter simple sequence repeats*) [10]. Для анализа использовали два праймера (табл. 2). Амплификацию осуществляли в тер-

моциклерах MJ Mini и MyCycler (*Bio-Rad, USA*). Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, ПЦР-буфер (67 мМ трис-НСI (рН 8,8), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 7 мМ ЭДТА, 3 мМ MgCl₂), 0,25 мМ dNTP, 0,5 мкМ праймера, 1 единицу Taq ДНК полимеразы (ингибированной для горячего старта). Реакция проходила в следующих условиях: «горячий старт» – 2 мин / 94°C, 40 циклов (денатурация – 30 с / 94°C, отжиг праймера – 30 с / 55°C, синтез – 2 мин / 72°C), дополнительный синтез – 10 мин / 72°C, охлаждение до 4°C. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле с использованием ТАЕ буфера (охлажденного до +4°C), 100 В – 45 мин. Блоки окрашивали бромистым этидием.

Таблица 1 / Table 1

**Описание пунктов сбора /
Description of collection points**

Пункт / Point	Описание биотопа / Description of biotope	Координаты / Coordinates
1. Белгород / Belgorod	г. Белгород (Россия), ивовый лес в пойме р. Везёлка, вблизи от комплекса зданий НИУ БелГУ, вдоль ул. Левобережная / Belgorod city (Russia), willow forest in the floodplain of the river Vezelka, near Belgorod state university, along Levoberegnaia street	50°35'39.1" с. ш. / north 36°34'04.49" в. д. / east
2. Майский / Maisky	Белгородский район, пос. Майский (Россия). Лесополоса между пшеничным полем и трассой Белгород – Харьков напротив Белгородской сельскохозяйственной академии / Belgorod region, settlement Maisky (Russia). Forest belt between the wheat field and Belgorod-Kharkov highway, opposite Belgorod Agricultural Academy	50°31'28.65" с. ш. / north 36°27'10.69" в. д. / east
3. Харьков / Kharkov	г. Харьков (Украина), городской парк им. Т.Г. Шевченко, пойма р. Лопань / Kharkov city (Ukraine), T.G. Shevchenko city park, the Lopan' river floodplain	50°00'15.72" с. ш. / north 36°13'31.31" в. д. / east
4. Киев / Kiev	г. Киев (Украина), ботанический сад им. А.В. Фомина / Kiev city (Ukraine), A.V. Fomin Botanical Garden	50°24'52.38" с. ш. / north 30°33'29.29" в. д. / east
5. Житомир / Zhitomir	г. Житомир (Украина), лесопарковая зона поймы реки Тетерев, на противоположной стороне реки городской парк культуры и отдыха им. Ю.А. Гагарина / Zhitomir city (Ukraine) Parks floodplain, on the opposite side of the Teterev river, Yuri Gagarin city recreation park	50°14'19.27" с. ш. / north 28°40'07.79" в. д. / east

По электрофореграммам амплифицированных фрагментов составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось как «1» (аллель *p*), отсутствие – «0» (аллель *q*).

У данного вида в диапазоне от 3 тыс. п. о. до 200 п.о. нами обнаружено 18 локусов с использованием праймера *SAS 1* и 12 локусов с использованием праймеров и *UBC 827*.

Обработка полученных данных проводилась с применением программ GenAlEx [11], POPGENE 32 [12], MEGA5 [13], StatSoft STATISTICA 6.0.

Таблица 2 / Table 2

Характеристика используемых праймеров /
Characteristics of used primers

Обозначение праймера / Primer designation	Нуклеотидная последовательность / Nucleotide sequence	Количество локусов / Number of loci
<i>UBC 827</i>	5'-(AC) ₈ G-3'	12
<i>SAS 1</i>	5'-(GTG) ₄ GC-3'	18

Результаты исследования и обсуждение

Одним из ключевых моментов в описании популяционной структуры вида является оценка уровня внутривидового и межвидового генетического разнообразия, а также выяснение степени дифференциации популяций.

На рис. 1 приведены данные об уровне ожидаемой гетерозиготности 30 выявленных локусов. Результаты демонстрируют, что наиболее изменчивыми являются локусы *SAS1-4*, *-5*, *-6*, а также *UBS827-7*. Самыми мономорфными оказались низкомолекулярные локусы *SAS1-18*, *UBS827-11*, *-12*. При этом средние уровни ожидаемой гетерозиготности, вычисленные по отдельным праймерам, достоверно не отличаются друг от друга: по *SAS1* $He = 0,269 \pm 0,016$; по *UBS827* $He = 0,279 \pm 0,043$.

Показатели генетической изменчивости, а также графические полигоны исследуемых популяций приведены в табл. 3 и на рис. 2. Согласно полученным данным в большинстве изученных популяций отмечается довольно высокий уровень гетерогенности. Из всех групп наиболее мономорфной оказалась популяция из пос. Майский. Это явление можно объяснить двумя причинами. С одной стороны, данная группа, находясь на границе агроландшафта и оживленной автомобильной трассы, систематически подвергается действию пестицидов и выхлопных газов. В результате она чаще других групп могла проходить через эффект так называемого «бутылочного горлышка», что в конечном итоге привело к потере генетического разнообразия [14]. С другой стороны, в таких жестких условиях, вероятно, действует стабилизирующий отбор, приводящий к гомозиготности по определенным локусам, обеспечивающим устойчивость организмов к действию токсинов. Подобное явление мы наблюдали ранее при изучении популяций кустарниковой улитки (*Bradybaena fruticum*), обитающих в условиях влияния горно-обогатительных комбинатов [15].

Построенные полигоны Дебеца (рис. 2) и результаты кластерного анализа на основе генетических расстояний [16] невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA, рис. 3) демонстрируют, что популяция из пос. Майский (2) явно дистанцируется от остальных групп.

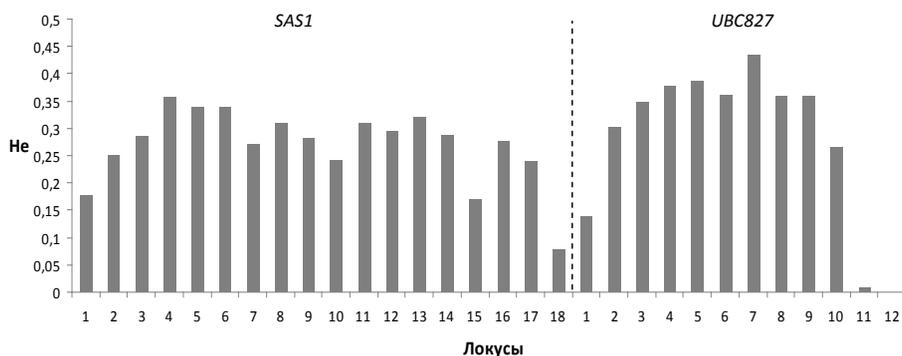
Рис. 1. Уровни ожидаемой гетерозиготности ISSR локусов *H. pomatia* /Fig. 1. Levels of expected heterozygosity ISSR of loci *H. pomatia*

Таблица 3 / Table 3

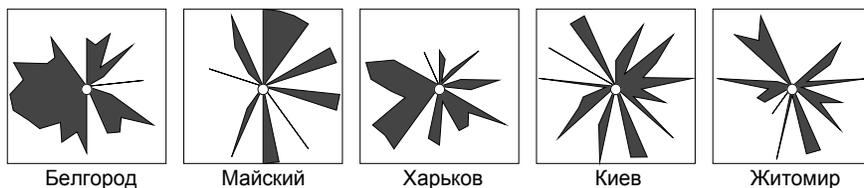
**Усредненные по совокупности ДНК-локусов меры генетической гетерогенности
в популяциях *H. pomatia* /**

Genetic heterogeneity measures in populations of *H. pomatia* averaged on the basis of DNA-loci

Пункт / Point	<i>N</i>	<i>P%</i>	<i>A</i>	<i>Ae</i>	<i>I_{sh}</i>	<i>He</i>
1. Белгород / Belgorod	61	96,67	1,967 ±0,183	1,485 ±0,273	0,465 ±0,180	0,303 ±0,136
2. Майский / Maisyky	67	66,67	1,667 ±0,479	1,292 ±0,357	0,267 ±0,277	0,174 ±0,194
3. Харьков / Kharkov	59	96,67	1,967 ±0,183	1,528 ±0,267	0,490 ±0,176	0,324 ±0,133
4. Киев / Kiev	28	93,33	1,933 ±0,254	1,381 ±0,272	0,397 ±0,191	0,250 ±0,141
5. Житомир / Zhitomir	33	93,33	1,933 ±0,254	1,516 ±0,283	0,477 ±0,193	0,314 ±0,144
Среднее / Average		89,33 ±5,71	1,893 ±0,271	1,440 ±0,290	0,419 ±0,203	0,273 ±0,150

Примечание. *N* – количество проанализированных особей; *P%* – процент полиморфных локусов; *A* – среднее число аллелей на локус; *Ae* – эффективное число аллелей; *I_{sh}* – индекс Шеннона; *He* – ожидаемая гетерозиготность.

Note: *N* – number of analyzed individuals; *P%* – percentage of polymorphic loci; *A* – mean number of alleles per locus; *Ae* – effective number of alleles; *I_{sh}* – Shannon index; *He* – expected heterozygosity.

Рис. 2. Полигоны Дебца, построенные по совокупности частот *q*-аллеля 30 локусов ДНК в популяциях *H. pomatia* /Fig. 2. Debets site, built on the basis of *q*-allele frequencies of 30 DNA loci in populations of *H. pomatia* (Belgorod, Maisky, Kharkov, Kiev, Zhitomir)

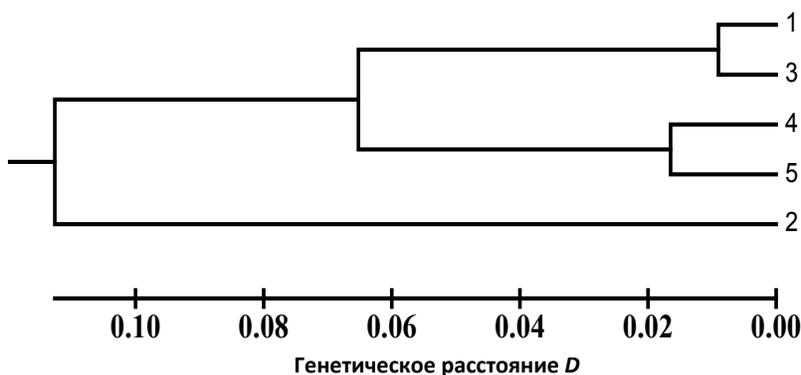


Рис. 3. Дендрограмма генетических расстояний по Неи [14] (UPGMA) между популяциями *H. pomatia* /

Fig. 3. Dendrogram of genetic distances according to Nei [14] (UPGMA) between populations of *H. pomatia* (on the abscissa axis - Genetic distance D)

При этом другие популяции показывают определенное сходство генетической структуры в зависимости от географического расстояния. Так, группа «Харьков» оказалась наиболее близкой (генетически и географически) к группе «Белгород», а популяция «Житомир» – к группе «Киев».

Тем не менее, несмотря на определенную оригинальность, все изучаемые группы демонстрируют высокую генетическую близость. Так, оценка степени дифференциации популяций *H. pomatia* на основе модели, предложенной М. Неем [17], показала низкую генетическую разобщенность изучаемых групп ($G_{st} = 0,166$, табл. 4). При этом средний поток генов оказался больше единицы ($Nm = 2,519$). Согласно «теории эволюции со смещающимся равновесием» [20] для поддержания панмиксии в метапопуляции требуется поток генов 1–2 особей за поколение.

Известно, что средние величины G_{st} соответствуют уровню генетической дифференциации при селективно-нейтральном процессе. В таком случае локусы с большими значениями G_{st} вероятнее всего испытывают действие дизруптивного отбора, а локусы с низкими показателями индекса подразделенности подвержены влиянию стабилизирующего отбора [18]. Согласно полученным данным, наибольшая дифференциация между популяциями зафиксирована по локусам *SAS 1-12*, *-14*, *-17*, а наименьшая – *UBC 827-1*, *-9*, *-11*.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) [19] также выявил большее сходство между популяциями *H. pomatia* (табл. 5). Только 21% изменчивости приходится на межпопуляционные различия, при этом индекс дифференциации $\Phi_{st} = 0,210$, а средний поток генов $Nm = 4,1$ особи за поколение.

Разумеется, подобное генетическое сходство вряд ли можно объяснить интенсивным обменом генетической информацией между изучаемыми популяциями. Причина кроется либо в сходном происхождении групп (т.е. улитки могли быть завезены человекам в эти населенные пункты из какого-

то одного источника), либо, что более вероятно, сходными микроклиматическими факторами, характерными для городских условий юго-восточной части Европы. Эти факторы могли привести к отбору одних и тех же аллелей и их комбинаций в разных популяциях.

Таблица 4 / Table 4

Показатели генетической дифференциации популяции *H. pomatia* (по Nei [15]) /
Genetic differentiation of populations of *H. pomatia* (by Nei [15])

Праймер / Primer	Лocus / Locus	H_t	H_s	G_{st}	N_m
<i>SAS 1</i>	1	0,187	0,178	0,048	10,035
	2	0,270	0,252	0,068	6,888
	3	0,303	0,287	0,055	8,664
	4	0,375	0,357	0,048	9,929
	5	0,449	0,339	0,244	1,547
	6	0,409	0,341	0,166	2,520
	7	0,290	0,273	0,056	8,359
	8	0,444	0,311	0,299	1,174
	9	0,304	0,283	0,070	6,641
	10	0,271	0,242	0,105	4,271
	11	0,472	0,311	0,340	0,970
	12	0,496	0,295	0,405	0,733
	13	0,435	0,323	0,257	1,447
	14	0,488	0,288	0,410	0,721
	15	0,201	0,172	0,145	2,960
	16	0,449	0,276	0,385	0,798
	17	0,434	0,242	0,443	0,630
	18	0,081	0,079	0,026	18,935
<i>UBC827</i>	1	0,141	0,139	0,009	52,685
	2	0,331	0,303	0,083	5,521
	3	0,365	0,348	0,047	10,064
	4	0,386	0,379	0,019	25,258
	5	0,403	0,388	0,036	13,457
	6	0,373	0,363	0,028	17,712
	7	0,449	0,434	0,035	13,985
	8	0,381	0,360	0,056	8,473
	9	0,361	0,359	0,005	92,052
	10	0,270	0,267	0,014	36,151
	11	0,010	0,010	0,009	56,057
	12	0,000	0,000	****	****
Среднее / Average		0,328±0,018	0,273±0,011	0,166	2,519

Примечание. G_{st} – доля межпопуляционного генного разнообразия в общем разнообразии; H_t – ожидаемая доля гетерозиготных генотипов во всей популяции; H_s – среднее для всех субпопуляций значение внутривидового разнообразия; N_m – средний поток генов за поколение /

Note: G_{st} - share of interpopulation genetic diversity in the total diversity; H_t - the expected proportion of heterozygous genotypes in the general population; H_s - the average value for all subpopulations of intra-population diversity, N_m - average gene flow per generation.

Таблица 5 / Table 5

Значения молекулярной дисперсии (AMOVA) по ДНК-локусам
в популяциях *H. pomatia* /Values of molecular variance (AMOVA) for DNA loci in populations of *H. pomatia*

Источник изменчивости / Variability source	Число степеней свободы / The number of degrees of freedom (<i>df</i>)	Сумма квадратов / Sum of squares (<i>SS</i>)	Средний квадрат / Mean square (<i>MS</i>)	Дисперсия / Variance (<i>V</i>)	%	Φ_{st}	P	Nm
Между популяциями / Between populations	4	278,437	69,609	1,337	21	0,210	0,010	4,100
Внутри популяций / Within populations	243	1218,631	5,015	5,015	79			
Итого / In total	247	1497,069	74,624	6,352				

Еще одно объяснение такой слабой генетической дифференциации между популяциями *H. pomatia* связано с тем, что все изученные группы являются адвентивными и существуют в изолированном состоянии. Это явление могло спровоцировать так называемый эффект «генетической революции», который описан для узколокальных изолированных групп [14]. Согласно данной гипотезе, в условиях изоляции, т.е. в условиях, в которых сегодня находятся все изучаемые нами популяции *H. pomatia*, селективную ценность получают гены, которые особенно жизнеспособны в гомозиготном состоянии и редки в открытых популяциях из-за доминирования в них так называемых «хорошо смешивающихся генов». Попав в условия иной генетической среды, так называемые «солисты» оказались в более выгодном положении. Причем, по мнению Майра, этот процесс мог затронуть одновременно большое количество локусов.

Не исключено, что все вышеуказанные факторы могли действовать одновременно, что привело к определенному сходству между довольно удаленными друг от друга популяциями *H. pomatia*.

Заключение

Таким образом, полученные данные показывают высокую генетическую изменчивость изучаемых групп *Helix pomatia* и демонстрируют определенное сходство векторов естественного отбора, присутствующих в популяциях виноградной улитки урбанизированных территорий, что, вероятно, вызыва-

ет определенные сходные реакции популяционных генофондов. Тем не менее антропогенное воздействие может снизить уровень генетического разнообразия в адвентивных популяциях, что в конечном итоге может привести к вымиранию групп. Стоит отметить также, что представленные результаты можно считать отправной точкой для дальнейшего мониторинга этого вида в районе исследования с целью выяснения особенностей эволюционных процессов, происходящих в его популяциях.

Литература

1. Стародубцева Е.Г., Дедков В.П. Виноградная улитка *Helix pomatia* L.: распространение по территории Калининградской области, распределение по биотопам и оценка численности // Вестник Калининградского государственного университета. Серия Экология региона Балтийского моря. 2003. Вып. 1. С. 82–87.
2. Румянцева Е.Г., Дедков В.П. Биология размножения виноградной улитки *Helix pomatia* L. в Калининградской области // *Ruthenica*. 2005. Т. 15, № 2. С. 131–138.
3. Величковский В. Моллюски. Очерк фауны Валуйского уезда Воронежской губернии. Харьков, 1910. Вып. 6. 111 с.
4. Белецкий П. Материалы к познанию фауны моллюсков России. Моллюски кл. Gastropoda Харьковской губернии // Труды Харьковского общества испытателей природы. 1918. № 49. С. 31–42.
5. Лихарев И.М., Раммельмейр Е.С. Наземные моллюски фауны СССР // Определители по фауне. М.; Л., 1952. Вып. 43. 512 с.
6. Jarvinen O., Sisula H., Varvio-Aho S.-L., Salminen P. Genetic variation in isolated marginal populations of the Roman snail *Helix pomatia* L. // *Hereditas*. 1976. Vol. 82. P. 101–110.
7. Dees L.T. Edible land snails in the United States / U.S. Fish and Wildlife Service, Bureau of Sport Fisheries and Wildlife. Resource Publication 91. 1970. 8 p.
8. Снегин Э.А. Анализ жизнеспособности популяций особо охраняемых видов на примере *Helix pomatia* L. (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 2. С. 91–96.
9. Артемчук О.Ю., Снегин Э.А. Морфогенетический анализ популяций *Helix pomatia* L. в условиях лесостепи Среднерусской возвышенности // Структурные и функциональные изменения в популяциях и сообществах на территориях с разным уровнем антропогенной нагрузки: материалы XII научно-практической экологической конференции / под ред. А.В. Присного. Белгород: ИД «Белгород», 2012. С. 12–13.
10. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. 1994. Vol. 20, № 2. P. 176–181.
11. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. 2001. URL: <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx>
12. Yeh F.C., Yang R., Boyle T.J., Ye Z., Xiyun J.M. POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada. 2000. URL: http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html
13. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011. URL: <http://www.kumarlab.net/publications>

14. Майр Э. Зоологический вид и эволюция. М. : Мир, 1968. 398 с.
15. Снегин Э.А. Оценка состояния популяционных генофондов наземных моллюсков в условиях влияния горно-обогатительных комбинатов на примере *Bradybaena fruticum* Müll (Gastropoda, Pulmonata) // Экологическая генетика. 2010. Т. VIII, № 2. С. 45–55.
16. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. Vol. 89. P. 583–590.
17. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, 1975. 278 p.
18. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. М. : Наука, 2004. 619 с.
19. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. 1992. № 131. P. 479–491.
20. Wright S. Random drift and shifting balance theory of evolution // Mathematical Topics in Population Genetics. Berlin: Springer Verlag, 1970. P. 1–31.

Поступила в редакцию 06.05.2014 г.; повторно 9.07.2014 г.;
принята 25.07.2014 г.

Авторский коллектив:

Снегин Эдуард Анатольевич – д-р биол. наук, доцент, зав. кафедрой биоценологии и экологической генетики биолого-химического факультета Белгородского государственного национального исследовательского университета (г. Белгород, Россия).
E-mail: snegin@bsu.edu.ru

Артемчук Олеся Юрьевна – аспирант кафедры биоценологии и экологической генетики биолого-химического факультета Белгородского государственного национального исследовательского университета (г. Белгород, Россия). E-mail: ris-med@yandex.ru

Tomsk State University Journal of Biology. 2014. № 3 (27). P. 130–141

Eduard A. Snegin, Olesia Y. Artemchuk

*Department of Biocenology and Ecological Genetics, Faculty of Biology and Chemistry,
Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation.*
E-mail: snegin@bsu.edu.ru

Study of the population gene pool of the Roman snail (*Helix pomatia* L.) in urban areas using ISSR-DNA markers

This work is devoted to the study of population structure of *Helix pomatia* Linnaeus, 1758, which is one of the biggest land snails in Europe.

Our objective was to assess the state of five adventitious populations gene pools of this species (248 individuals) living in urbanized areas of the southeastern part of the present areas, basing on the polymerase chain reaction using ISSR DNA markers.

We conducted the studies in Belgorod and its surroundings (Russia), as well as in the cities of Kharkov, Kiev and Zhitomir (Ukraine). The analysis was made using primers *UBS827* (5'-(AC)₈G-3') and *SASI* (5'-(GTG)₄GC-3'). Amplification was performed in a thermal cycler and MJ Mini MyCycler (*Bio-Rad, USA*). We found 30 loci of this species (interval from 3 kbp to 200 bp.). The monomorphic and polymorphic amplicons were identified. The degree of genetic variability of populations was determined. According to our study, in most groups quite a high level of heterozygosity was

observed ($H_e=0,273\pm 0,150$). However, in one of the groups we noted an increase in the proportion of monomorphic loci, caused, probably, by anthropogenic influence. We also established that, despite the strong isolation of the adventitious populations, the degree of genetic differentiation between them was low. According to the model M. Nei (1975) index $G_{st} = 0.166$, $N_m = 2.519$, the analysis of molecular variance (AMOVA) also showed greater similarity between populations of *H. pomatia*: $\Phi_{st} = 0.210$, and the average gene flow $N_m = 4.1$, individual per generation.

The obtained data showed a high genetic variability of the studied groups *H. pomatia* and demonstrate a certain similarity of natural selection vectors in snail populations in urban areas, which is likely to cause certain similar reactions of population gene pools. Nevertheless, anthropogenic impact can reduce genetic diversity in adventitious populations, which can, eventually, lead to the extinction of these groups.

The article contains 3 figures, 5 tables, 20 ref.

Keywords: PCR; terrestrial mollusks; population gene pool; the urbanized landscape.

References

1. Starodubceva EG, Dedkov VP. Vinogradnaya ulyitka *Helix pomatia* L. rasprostranenie po territorii Kaliningradskoy oblasti, raspredelenie po biotopam i otsenka chislennosti [The snail *Helix pomatia* L. distribution on the territory of Kaliningrad oblast, spreading and abundance estimation of habitats]. *Vestnik Kaliningradskogo gosudarstvennogo universiteta. Seria Ecologia regiona Baltiiskogo moria*. 2003;1:82-87. In Russian
2. Roumyantseva EG, Dedkov VP. Reproductive properties of the Roman snail *Helix pomatia* L. in Kaliningrad oblast. *Ruthenica*. 2005;15(2):131-138. In Russian
3. Velichkovski V. Molluski. Ocherk fawni Valuyskogo ujezda Voronezhskoy gubernii [Mollusks. Fauna characteristics of Valuisky county, Voronezh province]. Kharkov. 1910; Vol. 6. 111 p. In Russian
4. Beleckii P. Materialy k poznaniyu fawni molluskov Rossii. Molluski kl. Gastropoda Kharkovskoi gubernii [Materials to the knowledge of the mollusks fauna of Russia. Mollusks *Gastropoda* of Kharkov province]. *Proceedings of Kharkov Society of Naturalists*. Kharkov. 1918;49:31-42. In Russian
5. Liharev IM, Rammelmeyr ES. Nazemnie molluski fauni SSSR [Terrestrial mollusks of the USSR fauna]. Keys to the fauna. Moscow-Leningrad: Izdatel'stvo AN SSSR; 1952. Vol. 43. 512 p. In Russian
6. Jarvinen O, Sisula H, Varvio-Aho S.-L, Salminen P. Genetic variation in isolated marginal populations of the Roman snail *Helix pomatia* L. *Hereditas*. 1976;82:101-110.
7. Dees LT. Edible land snails in the United States. *U.S. Fish and Wildlife Service, Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Resource Publication*. 1970;91:8.
8. Snegin EA. The analysis of viability of the populations of specially protected species by the example of *Helix pomatia* L. (*Mollusca, Gastropoda, Pulmonata*). *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiy*. 2010;2:91-96. In Russian
9. Artemchuk OY, Snegin EA. Morfogenetichesky analiz populyatsy *Helix pomatia* L. v usloviyah lesostepi Srednerusskoy vozvysheynosti [Morphogenetic analysis of populations of *Helix pomatia* L. in forest-steppe of Mid-Russian Upland]. *Strukturnye and funktsionalnye izmeneniya v populyatsiyah and soobshchestvakh na territoriyah s raznim urovnem antropogennoy nagruzki. Materialy XII nauchno-prakticheskoy ekologicheskoy konferentsii* [Structural and functional changes in populations and communities in areas with different levels of anthropogenic stress. Proc. of the XII scientific and practical environmental conference]. Prysniy AV, editor. Belgorod: "Belgorod" Publishing House; 2012. p. 12-13. In Russian

10. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994;20(2):176-181.
11. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. 2001. [Electronic resource]. Available at: <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/> (accessed 10.03.2014).
12. Yeh FC, Yang R, Boyle TJ, Ye Z, Xiyang J.M. POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada. 2000. [Electronic resource]. Available at: http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html (accessed 15.03.2014).
13. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011. [Electronic resource]. Available at: <http://www.kumarlab.net/publications> (accessed 29.02.2014).
14. Mayr E. Zoologicheskoye vid i evolyutsiya [Animal species and evolution]. Moscow: Mir Publishing House; 1968. 398 p. In Russian
15. Snegin EA. Assessment of the state of population gene pools of terrestrial mollusks in conditions of influence of ore dressing combines from the example *Bradybaena fruticum* Mull. (Gastropoda, Pullmonata). *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2011;1(5):379-389. doi: [10.1134/S2079059711050133](https://doi.org/10.1134/S2079059711050133)
16. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978;89:583-590.
17. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam: North-Holland; 1975. 278 p.
18. Dinamika populacionnih genofondov pri antropogennih vozdeistviyah [Population dynamics of gene pools under anthropogenic impacts]. Altuhov YP, editor. Moscow: Nauka Publishing House; 2004. 619 p. In Russian
19. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;131:479-491.
20. Wright S. Random drift and shifting balance theory of evolution. *Mathematical Topics in Population Genetics*. 1970;1:1-31. doi: [10.1007/978-3-642-46244-3_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-46244-3_1)

Received 6 May 2014;

Revised 9 July 2014;

Accepted 25 July, 2014

Snegin EA, Artemchuk OY. Study of the population gene pool of the Roman snail (*Helix pomatia* L.) in urban areas using ISSR-DNA markers. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2014;3(27):130-141. In Russian, English summary.