

© Э. А. Снегин

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

✿ На основе метода полимеразной цепной реакции, с использованием *RAPD* и *ISSR* маркеров ДНК, проанализирована генетическая структура популяций модельного вида наземных моллюсков *Chondrula tridens* Müll., обитающих в условиях Среднерусской возвышенности. Дается расшифровка полученных ДНК-паттернов. Выделены полиморфные и мономорфные ампликоны. Определен уровень генетической изменчивости популяций. Выявлены факторы, влияющие на формирование популяционных генофондов данного вида в условиях урбанизированного ландшафта.

✿ **Ключевые слова:** ПЦР; наземные моллюски; популяционный генофонд; Среднерусская возвышенность.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ НАЗЕМНОГО МОЛЛЮСКА *CHONDRULA TRIDENS* MÜLL. (GASTROPODA, PULMONATA) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *RAPD* И *ISSR* МАРКЕРОВ

ВВЕДЕНИЕ

Настоящая работа является продолжением изучения популяционной структуры модельного вида наземных моллюсков *Chondrula tridens* Müll. (трехзубая улитка) на территории Русской равнины. Исследования проводились в условиях лесостепного и степного ландшафтов юга Среднерусской возвышенности.

Данный вид широко распространен в пределах Европы от юго-западной Франции до Урала, обитает в Крыму и на Кавказе, где населяет степные и полупустынные участки (Шилейко, 1984). В районе исследования моллюск обитает на меловых склонах, в балках, оврагах, а также в поймах рек. Вид относится к Средиземноморской реликтовой группе (Николаев, 1981). Благодаря своей эврибионтности и изменчивости конхиологических признаков *Ch. tridens* давно привлекает исследователей, анализирующих эволюционно-генетические процессы в природе (Матекин, 1950; Николаев, 1981; Гребенников, 1999; Крамаренко, Сверлова, 2003, 2006; Снегин, Гребенников, 2011; Комарова, Стойко, 2012). Но все эти работы были основаны только на морфометрических параметрах раковины.

В наших предыдущих исследованиях популяционная структура этого вида на юге Среднерусской возвышенности была изучена с помощью анализа конхиологических признаков и аллозимов (Снегин, 2011 а). 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, оставалась вне поля зрения. Поэтому, чтобы устранить этот недостаток, дальнейший анализ состояния популяционных генофондов *Ch. tridens* был проведен нами на основе *RAPD*-, *ISSR*-маркеров ДНК, применение которых основано на использовании одного праймера, имеющего множественные комплементарные участки, разбросанные по всему геному.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили образцы тканей особей *Ch. tridens*, хранящиеся в криобанке, созданном при лаборатории популяционной генетики и генотоксикологии НИУ «БелГУ». Выборки из популяций были сделаны во время экспедиции в период с 2006 по 2010 годы. Моллюсков собирали вручную с поверхности почвы, со стеблей и листьев растений, иногда в подстилке. Всего было исследовано 1146 особей из двадцати пяти популяций *Ch. tridens* (табл. 1). Из них на территории Среднерусской возвышенности была изучена 21 естественная популяция, а также две адвентивные группы из г. Белгород, особи которых отличались наиболее крупными размерами¹,

¹ Высота раковины данных улиток, завезенных предположительно с Северного Кавказа, доходит до 20 мм, при максимальной 12 мм у местных форм. Подробное описание этого явления приводится в нашей предыдущей публикации (Снегин, 2011б).

Поступила в редакцию 28.03.2013
Принята к публикации 04.07.2013

Таблица 1

Описание пунктов сбора

Пункт	Описание биотопа	Координаты
1. «Белгород»	Остаток естественной меловой балки со степной растительностью на территории г. Белгород (возле авторынка)	50°36'34.71" с.ш., 36°36'40.91" в.д.
2. «Бекарюковский бор»	Памятник природы с «Бекарюковский бор»; пойменные участки в долине р. Нежеголь	50°26'15.38" с.ш., 37°04'23.98" в.д.
3. «Ржевка»	Меловой склон западной экспозиции в пойме р. Короча возле пос. Ржевка	50°26'32.63" с.ш., 36°58'22.89" в.д.
4. «Афанасово»	Меловой склон восточной экспозиции в пойме р. Короча возле д. Афанасово	50°44'06.34" с.ш., 37°08'49.79" в.д.
5. «Зимовное»	Долина р. Нежеголь. Опушка нагорной дубравы возле д. Зимовное	50°29'35.80" с.ш., 37°09'56.56" в.д.
6. «Котеневка»	Участки поймы реки Чуфичка, расположенные вблизи отвалов Стойленского ГОК; Старооскольский район	51°11'09.62" с.ш., 37°31'58.93" в.д.
7. «Сапрыкино»	Смешанный лес на дне балки, выходящей в пойму р. Дубенка возле пос. Сапрыкино. Зона влияния Стойленского и Лебединского ГОК	50°36'34.71" с.ш., 36°36'40.91" в.д.
8. «Проточное»	Меловой склон напротив пос. Проточное, зона влияния Стойленского и Лебединского ГОК	50°00'18.75" с.ш., 37°31'58.93" в.д.
9. «Кочегуры»	Меловой склон балки выходящей в пойму р. Ольшанка напротив пос. Кочегуры. Зона влияния Стойленского и Лебединского ГОК	50°59'36.59" с.ш., 37°35'29.66" в.д.
10. «Губкин»	Меловой склон западной экспозиции в долине р. Осколец на территории г. Губкина	51°17'41.29" с.ш., 37°32'21.99" в.д.
11. «Скородное»	Склон балки выходящей в пойму реки Короча возле с. Скородное	51°04'22.77" с.ш., 37°15'03.39" в.д.
12. «Стенки Изгорья»	Заповедный участок «Стенки Изгорья». Меловой склон южной экспозиции с реликтовой степной растительностью, расположенный на территории одноименного заповедного участка	50°40'44.80" с.ш., 37°48'29.48" в.д.
13. «Борки»	Памятник природы «Борки». Меловой склон в пойме р. Козинка. Северо-западной экспозиции	50°08'12.03" с.ш., 37°53'09.01" в.д.
14. «Валуйки»	Долина р. Валуи, подножие юго-восточного мелового склона, окрестности г. Валуйки, рядом с автомобильной трассой	50°13'24.38" с.ш., 38°00'34.61" в.д.
15. «Лисья гора»	Памятник природы «Лисья гора» возле пос. Яблоново. Пойма р. Оскол. Опушка дубового леса	50°13'24.38" с.ш., 38°00'34.61" в.д.
16. «Купянск»	Меловой склон западной экспозиции в долине р. Оскол возле г. Купянск (Украина)	49°42'19.24" с.ш., 37°37'24.98" в.д.
17. «Калужный яр»	Меловая балка восточной экспозиции, выходящая в пойму р. Айдар, территория природного парка «Айдарский»	49°57'02.88" с.ш., 38°53'49.32" в.д.
18. «Клименково»	Меловой склон южной экспозиции в долине р. Сарма. Территория природного парка «Айдарский»	49°59'25.30" с.ш., 39°02'35.08" в.д.
19. «Нагольное»	Меловой склон южной экспозиции в долине р. Сарма. Территория природного парка «Айдарский»	49°58'43.61" с.ш., 38°57'33.69" в.д.
20. «ГОК»	Рекультивированные отвалы Стойленского ГОК	51°17'18.18" с.ш., 37°40'56.29" в.д.
21/1 «Водстрой» 21/2	г. Белгород, насыпь автомагистрали, спускающейся в пойму р. Гостянка, смешанный лес из ивы и клена с примесью ели	50°35' 23.32" с.ш., 36°33' 58.20" в.д.
	Тот же биотоп, в котором совместно с аборигенными улитками обитают интродуцированные особи крупной формы	
22. «БелГУ»	г. Белгород, газон возле старого здания БелГУ, посадки каштанов и елей. Местообитание интродуцированных улиток крупной формы	50°37' 16.58" с.ш., 36°34' 36.25" в.д.
23. «Аракаево»	Правый берег Михайловского пруда (р. Серга), Свердловская область, Нижнесергинский район, село Аракаево — подножье склона и крутой склон, заросший травой. На склоне несколько скальных выходов известняка, у подножья которых есть скальных осыпи	56°26' 45.00" с.ш., 59°12' 56.00" в.д.
24. «Николаев»	Пустырь около насосной станции водоканала (НСВ-3) г. Николаева (Украина). Травянистый газон вдоль бетонного забора. Улитки были собраны среди листового опада	46°57' 55.82" с.ш., 32°02' 17.09" в.д.

Таблица 2

Характеристика используемых праймеров

Метод	Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность	Количество локусов
RAPD	OPC 8	5'-GGGATATCGG-3'	13
ISSR	UBC 827	5'-(AC)8G-3'	18
	SAS 1	5'-(GTG)4GC-3'	18

и сформировали в указанных пунктах репродуктивно обособленные от местных форм колонии. Особенно в пункте 21, где крупные особи живут в том же биотопе, что и аборигенные мелкие особи. Поэтому данный пункт мы условно разделили на две группы (21/1 и 21/2). Кроме того, для сопоставления нами были взяты выборки из популяций, обитающих на территории Урала и Причерноморья (пункты 23 и 24 соответственно).

Анализ изменчивости проводили с использованием полимеразной цепной реакции — методы *RAPD* (*Random amplified polymorphic DNA*) (Welsh, McClelland, 1990) и *ISSR* (*Inter simple sequence repeats*) (Zietkiewicz et al., 1994). Для анализа использовали три праймера (табл. 2). Амплификацию проводили в термоциклерах MJ Mini и MyCycler (Bio-Rad).

Метод *RAPD*. Реакцию проводили в 20 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, ПЦР-буфер (10 мМ трис-НСI (рН 8,3), 50 мМ KCL, 2 мМ MgCl), 0,25 мМ dNTP, 0,5 мкМ праймера, 1 единица Taq ДНК-полимеразы (ингибированной для горячего старта). Реакция проходила в следующих условиях: «горячий старт» — 2 мин/94 °С, 35 циклов (денатурация — 45 с/94 °С, отжиг праймера — 15 с/36 °С, 15 с/45 °С, синтез — 1 мин/72 °С), дополнительный синтез — 10 мин/72 °С, охлаждение до 4 °С.

Метод *ISSR*. 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 MgCl), 0,25 мМ dNTP, 0,5 мкМ праймера, 1 единица Taq ДНК полимеразы (ингибированной для горячего старта). Реакция проходила в следующих условиях: «горячий старт» — 2 мин/94 °С, 40 циклов (денатурация — 30 с/94 °С, отжиг праймера — 30 с/55 °С, синтез — 2 мин/72 °С), дополнительный синтез — 10 мин/72 °С, охлаждение до 4 °С. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле с использованием TAE буфера, 100 В — 45 мин. Блоки окрашивали бромистым этидием.

По картинам амплифицированных фрагментов, полученных в ходе электрофореза составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось как «1» (аллель *p*), отсутствие «0» (аллель *q*). Ввиду того, что при использовании метода *RAPD* могут появляться неспецифические продукты амплификации, для анализа мы использовали четко просматриваемые и воспроизводимые ампликоны. Критерием воспроизводимости было повторное проявление ампликонов после ПЦР у одних и тех же исследуемых особей.

У данного вида нами обнаружено 49 локусов: 13 с использованием праймера *OPC 8* (метод *RAPD*), и по 18 локусов с использованием праймеров *SAS 1* и *UBC 827* (метод *ISSR*). Полученные ДНК-паттерны и их расшифровка приведены на рисунке 1.

Обработка полученных данных проводилась с использованием программы GenAlEx (Peakall, Smouse, 2001), POPGENE 32 (Yeh et al., 2000), MEGA5 (Tamura et al., 2011). Полигоны Дебеца были построены при помощи программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 3 представлены уровни гетерозиготности сорока девяти локусов, вычисленные на основе анализа двадцати пяти популяций. Согласно представленным данным наиболее полиморфными среди *RAPD*-маркеров

Таблица 3

Уровни гетерозиготности обнаруженных локусов (усредненные данные по 25 популяциям *Ch. tridens*)

№ локуса	He		
	OPC8	SAS1	UBC 827
1	0,212 ± 0,013	0,083 ± 0,009	0,035 ± 0,007
2	0,238 ± 0,012	0,03 ± 0,004	0,061 ± 0,010
3	0,406 ± 0,007	0,102 ± 0,010	0,095 ± 0,010
4	0,390 ± 0,010	0,118 ± 0,009	0,254 ± 0,015
5	0,301 ± 0,010	0,179 ± 0,011	0,137 ± 0,011
6	0,415 ± 0,012	0,167 ± 0,011	0,378 ± 0,011
7	0,385 ± 0,009	0,357 ± 0,012	0,254 ± 0,012
8	0,405 ± 0,007	0,176 ± 0,011	0,296 ± 0,011
9	0,374 ± 0,010	0,398 ± 0,012	0,261 ± 0,015
10	0,411 ± 0,008	0,316 ± 0,013	0,222 ± 0,013
11	0,212 ± 0,013	0,318 ± 0,011	0,355 ± 0,012
12	0,156 ± 0,014	0,355 ± 0,009	0,307 ± 0,012
13	0,068 ± 0,010	0,368 ± 0,010	0,358 ± 0,012
14	—	0,342 ± 0,010	0,343 ± 0,014
15	—	0,243 ± 0,011	0,269 ± 0,014
16	—	0,384 ± 0,011	0,202 ± 0,014
17	—	0,264 ± 0,014	0,147 ± 0,012
18	—	0,041 ± 0,008	0,073 ± 0,010

являются локусы 3, 4, 6, 8 и 10, а среди *ISSR*-маркеров более изменчивыми оказались локусы 7, 9 и 16 по праймеру *SAS 1*, и локусы 6, 11, 13, 14 по праймеру *UBC 827*. В группу более мономорфных локусов вошли: по праймеру *OPC 8* — локусы 12 и 13, по праймеру

SAS 1 — локусы 1, 12 и 18, по праймеру *UBC 827* — локусы 1, 2, 3 и 18. Причем стоит отметить, что средняя гетерозиготность по *RAPD* локусам ($H_e = 0,306 \pm 0,010$) выше, чем по *ISSR* локусам (по *SAS 1* $H_e = 0,235 \pm 0,010$; по *UBC 827* $H_e = 0,225 \pm 0,011$).

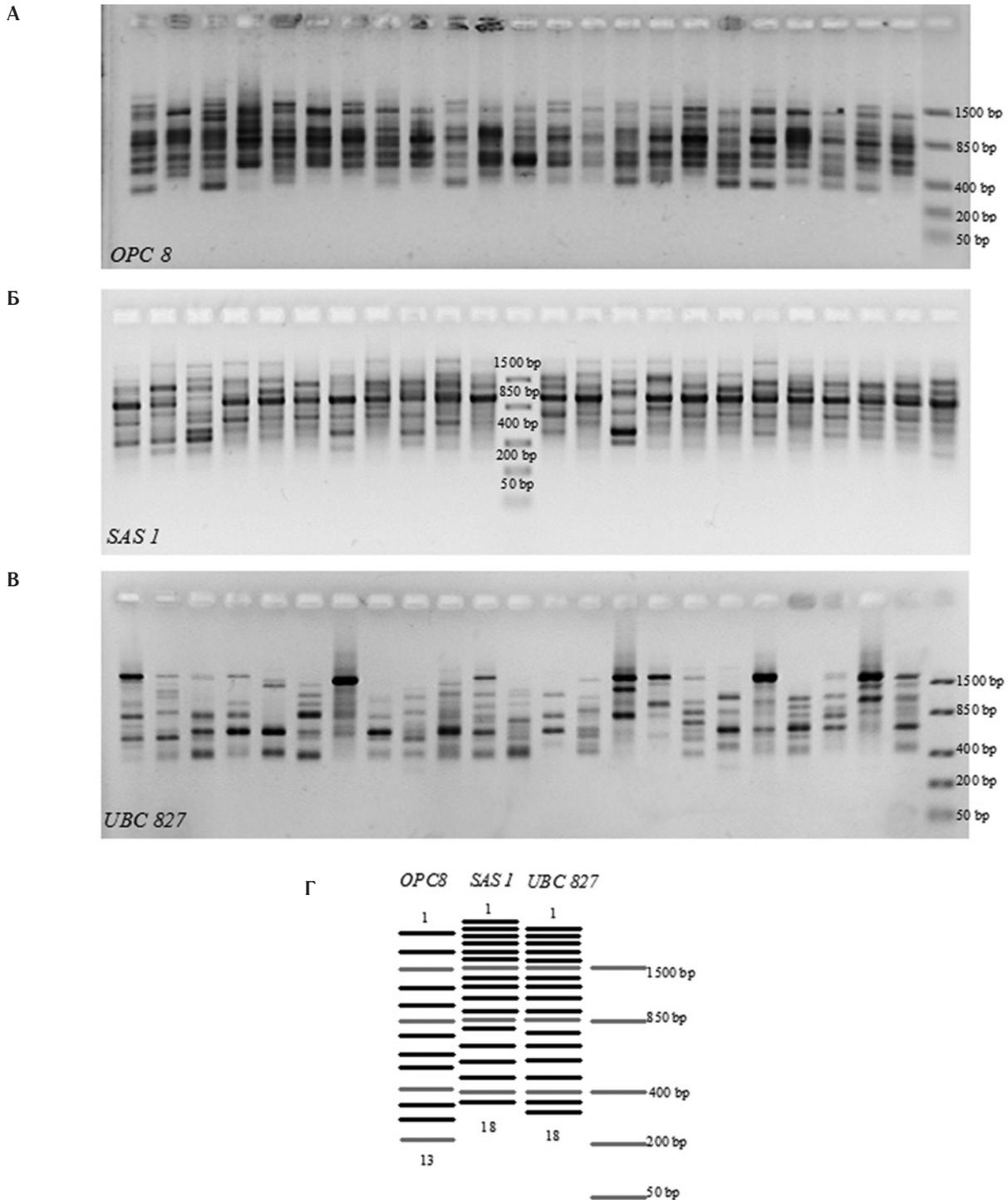


Рис. 1. А, Б, В — ДНК-паттерны *Ch. tridens*. Г — расшифровка ДНК-паттернов *Ch. tridens* (номерами обозначены только первые и последние локусы)

Таблица 4

Усредненные по совокупности ДНК-локусов меры генетической гетерогенности в популяциях *Ch. tridens*.

Пункт	<i>N</i>	<i>P</i> %	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>I_{sh}</i>	<i>He</i>
1. Белгород	54	100,00	2,0 ± 0,0	1,55 ± 0,04	0,514 ± 0,019	0,339 ± 0,016
2. Бекарюковский бор	189	95,92	1,96 ± 0,03	1,43 ± 0,05	0,402 ± 0,033	0,260 ± 0,024
3. Ржевка	18	87,76	1,88 ± 0,05	1,45 ± 0,05	0,421 ± 0,032	0,275 ± 0,024
4. Афанасово	16	67,35	1,67 ± 0,07	1,40 ± 0,05	0,348 ± 0,04	0,232 ± 0,029
5. Зимовное	31	85,71	1,86 ± 0,05	1,50 ± 0,05	0,442 ± 0,034	0,295 ± 0,025
6. Котеневка	32	73,47	1,73 ± 0,06	1,39 ± 0,05	0,35 ± 0,038	0,230 ± 0,027
7. Сапрыкино	18	93,88	1,94 ± 0,03	1,50 ± 0,05	0,452 ± 0,03	0,297 ± 0,023
8. Проточное	12	28,57	1,29 ± 0,06	1,19 ± 0,05	0,160 ± 0,038	0,109 ± 0,026
9. Кочегуры	38	89,80	1,90 ± 0,04	1,44 ± 0,05	0,403 ± 0,035	0,264 ± 0,026
10. Губкин	31	85,71	1,86 ± 0,05	1,47 ± 0,05	0,419 ± 0,035	0,276 ± 0,025
11. Скородное	60	89,80	1,90 ± 0,04	1,40 ± 0,05	0,363 ± 0,038	0,238 ± 0,028
12. Стенки Изгорья	37	83,67	1,84 ± 0,05	1,42 ± 0,05	0,386 ± 0,036	0,253 ± 0,026
13. Борки	58	87,76	1,88 ± 0,05	1,43 ± 0,05	0,405 ± 0,033	0,263 ± 0,024
14. Валуйки	94	89,80	1,90 ± 0,04	1,32 ± 0,05	0,325 ± 0,034	0,205 ± 0,024
15. Лисья гора	35	93,88	1,94 ± 0,03	1,50 ± 0,04	0,459 ± 0,028	0,301 ± 0,022
16. Купянск	86	93,88	1,94 ± 0,03	1,50 ± 0,05	0,455 ± 0,031	0,300 ± 0,023
17. Калюжный яр	43	83,67	1,84 ± 0,05	1,34 ± 0,05	0,329 ± 0,036	0,211 ± 0,026
18. Клименково	50	79,59	1,80 ± 0,06	1,36 ± 0,05	0,348 ± 0,036	0,224 ± 0,026
19. Нагольное	31	85,71	1,86 ± 0,05	1,43 ± 0,05	0,395 ± 0,035	0,258 ± 0,026
20. ГОК	53	79,59	1,80 ± 0,06	1,37 ± 0,05	0,341 ± 0,038	0,222 ± 0,027
21/1. Водстрой	20	100,00	2,0 ± 0,0	1,66 ± 0,03	0,574 ± 0,013	0,389 ± 0,011
Среднее для Среднерусской возвышенности		84,5 ± 3,3	1,85 ± 0,04	1,43 ± 0,05	0,395 ± 0,033	0,259 ± 0,024
21/2. Водстрой, КФ	42	55,10	1,55 ± 0,07	1,29 ± 0,05	0,250 ± 0,040	0,166 ± 0,028
22. БелГУ, КФ	50	75,51	1,75 ± 0,06	1,38 ± 0,05	0,349 ± 0,038	0,228 ± 0,027
23. Аракаево	22	67,35	1,67 ± 0,07	1,32 ± 0,05	0,300 ± 0,039	0,195 ± 0,027
24. Николаев	25	67,35	1,67 ± 0,07	1,39 ± 0,05	0,339 ± 0,041	0,226 ± 0,029
Общее среднее		81,6 ± 3,2	1,82 ± 0,05	1,42 ± 0,05	0,381 ± 0,034	0,250 ± 0,025

N — количество проанализированных особей, *P* % — процент полиморфных локусов, *A* — среднее число аллелей на локус, *A_e* — эффективное число аллелей, *I_{sh}* — индекс Шеннона, *He* — ожидаемая гетерозиготность

Уровни гетерозиготности, а также графические полигоны исследуемых популяций по различным праймерам приведены на рисунках 2, 3 и в таблице 4.

Согласно полученным данным, уровни изменчивости в популяциях *Ch. tridens* неодинаковы по различным локусам ДНК (рис. 2). Например, по локусам *UBC 827* наименьшие значения гетерозиготности отмечены в пунктах «Клименково» (№ 18) и «Проточное» (№ 8). В последнем пункте зафиксирован также самый низкий для естественных популяций лесостепи показатель гетерозиготности по локусам *OPC 8* и *SAS 1*. В адвентивной колонии 21/2 отмечен низкий уровень гетерозиготности по локусам *SAS 1*. Причем в популяции местных улиток, обитающей в том же биотопе (21/1), показатели гетерозиготности по всем локусам значительно превосходят таковую в адвентивной группе. По соотношению частот аллелей эти две колонии также попали в различные кластеры (рис. 4). Это косвенно подтверж-

дает выдвинутое нами ранее предположение об отсутствии скрещивания между улитками двух форм (Снегин, 2011 б).

По совокупности всех ДНК-локусов наиболее гетерогенными оказались естественные популяции, обитающие в черте г. Белгород (пункты № 1 и 21/1) (табл. 4). Немного им уступают группы «Купянск» (№ 16), «Лисья гора» (№ 15), «Сапрыкино» (№ 7) и «Бекарюковский бор» (№ 2). Самой мономорфной является уже упомянутая популяция «Проточное» (№ 8), которая относится к группе популяций, обитающих в зоне влияния Стойленского и Лебединского горно-обогатительных комбинатов, где отмечается чрезвычайная раздробленность популяций ввиду активного освоения территории (создание карьеров, строительство дорог и путепроводов). Тем не менее стоит отметить, что в других популяциях этого района (пункты № 6, 7, 9, 10, 20) достоверного снижения уровня изменчивости нами не выявлено. Особенно это касается

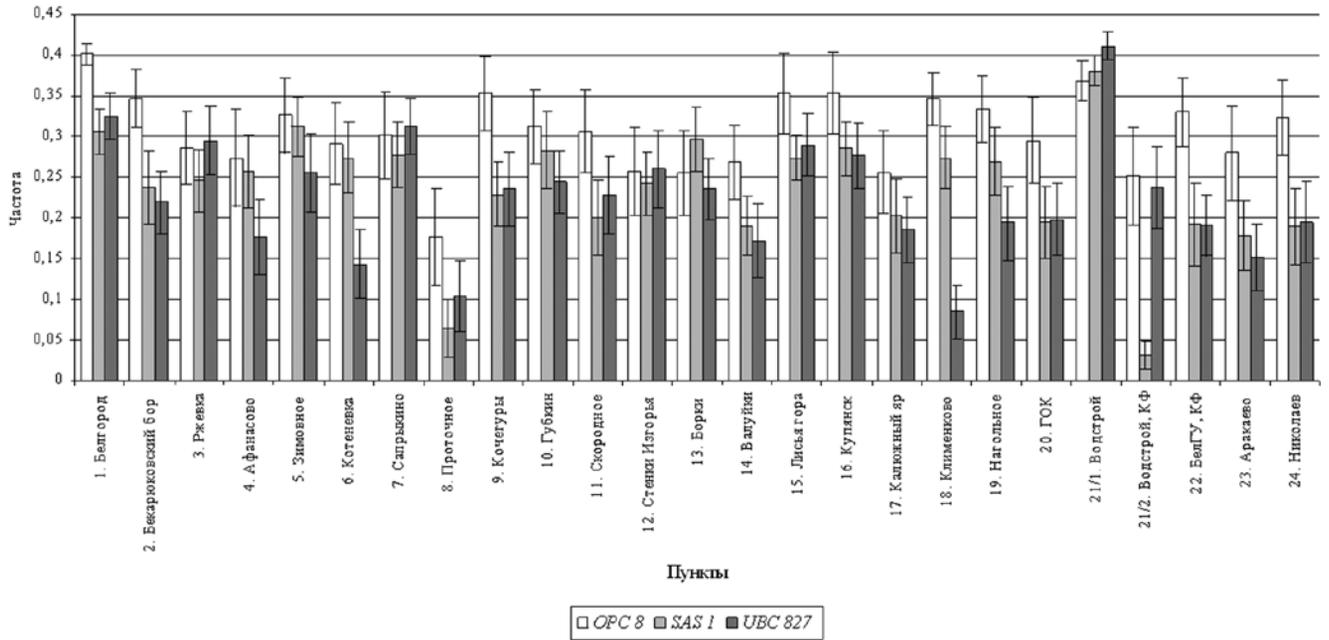


Рис. 2. Уровни гетерозиготности по различным локусам ДНК в популяциях *Ch. tridens*

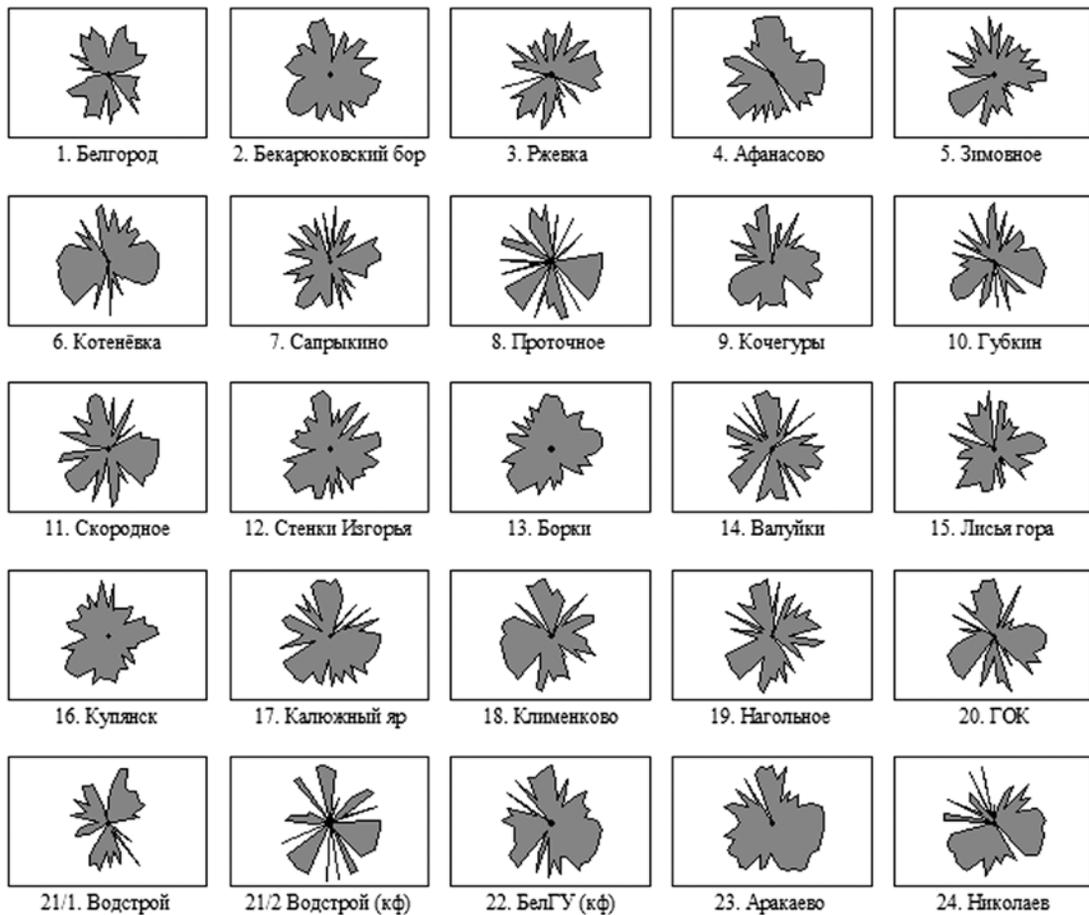


Рис. 3. Полигоны Дебеца, построенные по совокупности частот *q*-аллеля 49 локусов ДНК в популяциях *Ch. tridens* (кф — крупные формы)

пункта 20 («ГОК»), где улитки обитают в изолированном биотопе, сформировавшемся сравнительно недавно (30 лет назад) на отвалах горно-обогатительных комбинатов, но соотношение частот аллелей и уровень изменчивости здесь (особенно по *RAPD* локусам) сопоставим с аналогичным показателем из других популяций, включая исконные группы из реликтовых особо охраняемых природных территорий (12, 13, 17, 18, 19).

Такое генетическое сходство групп обеспечивается, вероятнее всего, не миграцией особей между популяциями, а тем, что в условиях изоляции в популяциях *Ch. tridens* увеличивается частота гомозиготных комбинаций по одним и тем же аллелям, что было показано нами ранее на примере изоферментных маркеров (Снегин, 2011 а). Последнее, вероятно, обеспечивается сходными векторами естественного отбора в условиях лесостепи, а также дрейфом генов и процессами генетической революции в изолированных группах (Майр, 1968).

Кроме того, стоит подчеркнуть, что на юге лесостепи Среднерусской возвышенности площадь пригодных биотопов для *Ch. tridens* значительно больше, чем, например, для другого индикаторного моллюска *Bradybaena fruticum* (до 20 % от общей территории, против 9 %), т. к. трехзубая улитка, являясь ксеромезофилом, может обитать в разнообразном спектре условий: на меловых притеррасных склонах, в лесных массивах, в поймах рек, в балках и оврагах. Такая эвритопность способствует меньшей разобщенности популяций у этого вида по сравнению с кустарниковой улиткой. Но, обладая относительно слабой подвижностью, *Ch. tridens* в своем расселении по району исследования, вероятно, больше опирается на внешние для популяции факторы, такие как водные потоки, ветер, животные, а в последние столетия и человек. Тем не менее усиленная распашка территории и уничтожение естественных меловых сообществ нарушают миграционные процессы и ведут к повышению степени изоляции между группами, что находит свое отражение в рассчитываемых индексах подразделенности и среднего потока генов.

Так, оценка степени дифференциации популяций *Ch. tridens* на основе модели, предложенной М. Неем (Nei, 1975), показала умеренную разобщенность изучаемых групп в условиях лесостепи ($G_{st} = 0,177$, табл. 5). При этом средний поток генов оказался больше единицы ($Nm = 2,33$)².

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 (Динамика..., 2004).

² Согласно «теории эволюции со смещающимся равновесием» (Wright, 1970), для поддержания панмиксии в метапопуляции требуется поток генов 1–2 особи за поколение

Таблица 5

Показатели генетической дифференциации популяции *Ch. tridens* (по Nei, 1975).

Локус	№ локуса	Ht	Hs	Gst	Nm
OPC 8	1	0,260	0,233	0,104	4,30
	2	0,264	0,233	0,120	3,65
	3	0,436	0,403	0,077	6,04
	4	0,500	0,377	0,245	1,54
	5	0,330	0,283	0,141	3,04
	6	0,499	0,431	0,136	3,18
	7	0,495	0,380	0,233	1,65
	8	0,453	0,410	0,095	4,75
	9	0,476	0,395	0,171	2,43
	10	0,496	0,408	0,176	2,34
	11	0,320	0,223	0,304	1,14
	12	0,174	0,146	0,160	2,62
	13	0,095	0,079	0,175	2,37
SAS 1	1	0,111	0,097	0,125	3,51
	2	0,037	0,036	0,039	12,28
	3	0,141	0,122	0,138	3,13
	4	0,149	0,141	0,056	8,40
	5	0,230	0,207	0,097	4,64
	6	0,207	0,187	0,098	4,59
	7	0,480	0,385	0,198	2,03
	8	0,217	0,204	0,061	7,71
	9	0,491	0,404	0,177	2,32
	10	0,370	0,321	0,133	3,26
	11	0,404	0,345	0,146	2,92
	12	0,394	0,354	0,100	4,48
	13	0,458	0,398	0,132	3,28
	14	0,419	0,360	0,140	3,08
	15	0,298	0,249	0,164	2,56
	16	0,489	0,394	0,193	2,09
	17	0,362	0,289	0,203	1,96
	18	0,059	0,049	0,182	2,25
UBC 827	1	0,049	0,040	0,183	2,23
	2	0,089	0,071	0,197	2,04
	3	0,092	0,080	0,128	3,40
	4	0,442	0,270	0,390	0,78
	5	0,146	0,131	0,109	4,10
	6	0,434	0,377	0,131	3,32
	7	0,309	0,284	0,081	5,64
	8	0,400	0,302	0,244	1,55
	9	0,380	0,261	0,315	1,09
	10	0,247	0,215	0,131	3,31
	11	0,494	0,359	0,272	1,34
	12	0,359	0,308	0,143	3,00
	13	0,470	0,383	0,184	2,22
	14	0,455	0,364	0,201	1,99
	15	0,428	0,297	0,306	1,13
	16	0,229	0,183	0,201	1,99
	17	0,209	0,171	0,182	2,24
	18	0,073	0,060	0,181	2,26
Среднее		0,315 ± 0,023	0,259 ± 0,015	0,177	2,33

Gst — доля межпопуляционного генного разнообразия в общем разнообразии, Ht — ожидаемая доля гетерозиготных генотипов во всей популяции Hs — среднее для всех субпопуляций значение внутривидового разнообразия, Nm — средний поток генов за поколение

Таблица 6

Значения молекулярной дисперсии (AMOVA) по ДНК-локусам в популяциях *Ch. tridens* (по 21 популяции)³

Источник изменчивости	Число степеней свободы (df)	Сумма квадратов (SS)	Средний квадрат (MS)	Дисперсия (V)	%	Φ_{st}	P	Nm
Между популяциями	20	1688,784	84,439	1,662	19%	0,185	0,010	0,954
Внутри популяций	985	7207,496	7,317	7,317	81%			
Итого	1005	8896,280	91,756	8,979				

Согласно полученным данным (табл. 5), наибольшая дифференциация между популяциями зафиксирована по локусам *OPC 8 — 11*, *SAS 1 — 17* и *UBC 827 — 4*, а наименьшая — *OPC 8 — 3*, *SAS 1 — 8* и *UBC 827 — 7*.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA, Excoffier et al., 1992) (табл. 6) выявил также большее сходство между популяциями *Ch. tridens*. Только 19% изменчивости пришлось на межпопуляционные различия, при этом $\Phi_{st} = 0,185$, а $Nm = 0,954$.

Данные свидетельствуют о сходных генетических процессах, протекающих в географически удаленных популяциях, но связанных единой ландшафтной структурой.

Между тем кластерный анализ по ДНК-локусам, результаты которого показаны на рисунке 4, продемонстрировал отсутствие какой-либо географической привязки выделяемых кластеров, за исключением двух городских популяций из пунктов 1 и 21/1. То есть относительно большая генетическая дистанция наблюдалась, как между географически близко расположенными группами, так и удаленными. Это связано, как уже говорилось, с нарушением естественно сложившихся каналов миграции генов между популяциями в урбанизированном ландшафте. Данный вывод подтверждается тем, что попарные оценки индекса Φ_{st} не коррелируют со значениями географических расстояний между популяциями (рис. 5; $R = 0,082 \pm 0,069$).

Из групп улиток, взятых для сравнения, уральская популяция (№ 23) оказалась генетически более близкой к лесостепным популяциям, чем причерноморская группа (№ 24). Последняя сильно дистанцировалась от большинства изученных популяций лесостепного региона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты дают представление о структуре расселения и о состоянии популяционных генофондов *Ch. tridens* в условиях урбанизированного лесостепного ландшафта Среднерусской возвышенности. Согласно полученным данным, в популяциях этого моллюска, несмотря на давление со стороны человека,

присутствует высокий уровень генетического полиморфизма, вероятно из-за обитания в широком диапазоне условий, включая весьма экстремальные для моллюсков открытые меловые склоны с резкими суточными колебаниями температуры и влажности. Тем не менее процессы инсультации, наблюдаемые на исследуемой территории, приводят к нарушению исторически сложившихся каналов миграции, что ведет к сильной изолированности популяций и к постепенной потере их аллельного раз-

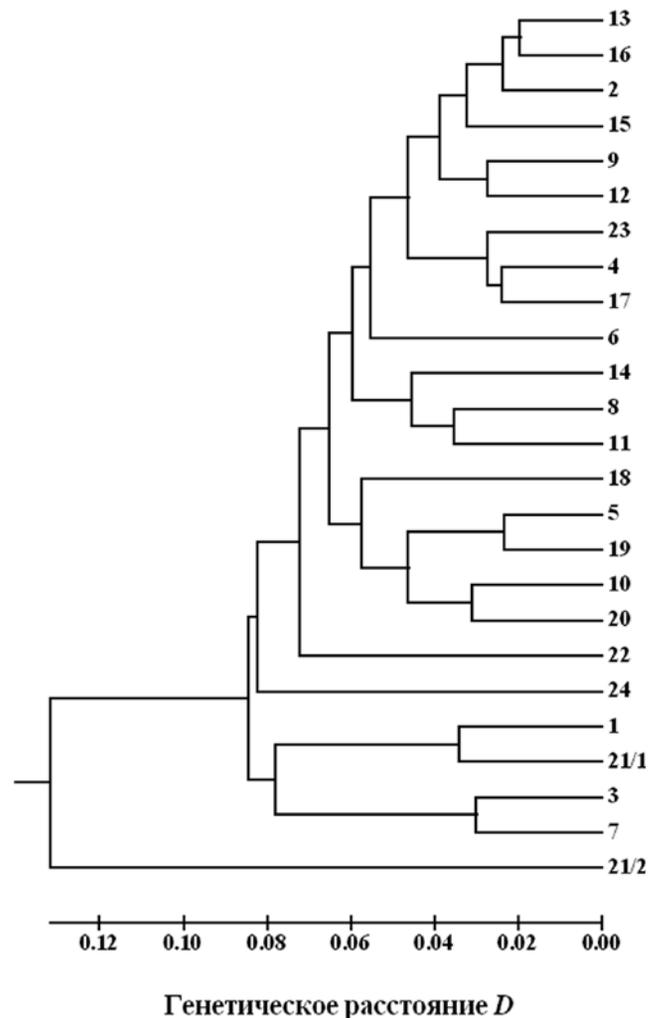


Рис. 4. Дендрограмма генетических расстояний по Неи (Nei, 1972) (UPGMA) между популяциями *Ch. tridens*

³ В анализе не учитывались адвентивные колонии (21/2 и 22), популяции из Причерноморья (24) и Урала (23)

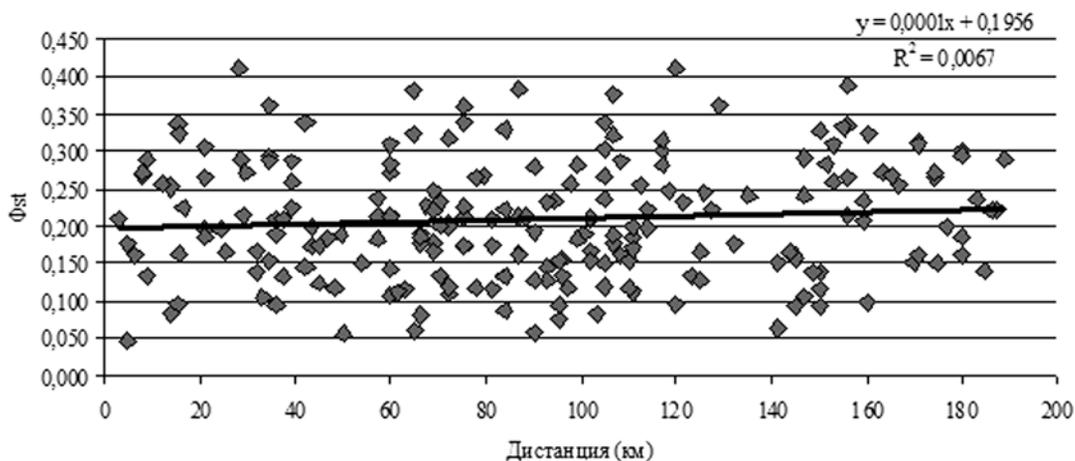


Рис. 5. Значение показателя дифференциации Φ_{st} между парами популяций *Ch. tridens* в зависимости от географического расстояния между ними

нообразия. Представленные результаты можно считать отправной точкой для дальнейшего мониторинга этого модельного вида с целью выяснения особенностей эволюционных процессов, происходящих в его популяциях.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, гос. задание № 4.8480.2013.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гребенников М.Е., 1999. Реликтовые популяции *Chondrula tridens* (Müll, 1974) на Среднем Урале // Актуальные проблемы биологии и экологии. Сыктывкар. С. 49.
2. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. — М.: Наука, 2004. С. 619.
3. Комарова Е.В., Стойко Т.Г., 2012. Изменчивость раковины наземного моллюска *Chondrula tridens* в Среднем Поволжье // Известия Пензенского гос. пед. ун-та им. В.Г. Белинского. № 29. С. 220–226.
4. Крамаренко С.С., Сверлова Н.В., 2003. До вивчення внутрішньовидової мінливості *Chondrula tridens* (Gastropoda, Pulmonata, Vuliminidae) на заході України та з'ясування таксономічного статусу окремих форм // Наук. зап. Держ. природозн. музею. Львів. Т. 18. С. 93–110.
5. Крамаренко С.С., Сверлова Н.В., 2006. Міжпопуляційна мінливість конхологічних ознак наземного моллюска *Chondrula tridens* (Vuliminidae) Північно-західного Причорномор'я // Наук. зап. Держ. природознавч. музею. Львів: Т. 22. С. 105–118.
6. Майр Э., 1968. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир. С. 398.
7. Матёкин П.В., 1950. Фауна наземных моллюсков Нижнего Поволжья и ее значение для представления об истории современных лесов района // Зоологический журнал. Т. 29. Вып. 3. С. 193–205.
8. Николаев В.А., 1981. Изменчивость и экология энид Среднерусской возвышенности // Фауна и экология беспозвоночных лесостепной зоны. Научные труды Курского гос. пед. ин-та. Курск: Т. 210. С. 54–57.
9. Снегин Э.А., 2011 а. Генетическая структура популяций модельных видов наземных моллюсков в условиях урбанизированного ландшафта на примере *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) // Экологическая генетика. Т. IX, № 2. С. 54–64.
10. Снегин Э.А., 2011 б. К вопросу о роли принципа основателя в формировании генофондов адвентивных колоний на примере *Chondrula tridens* (Gastropoda, Pulmonata) // Зоологический журнал. Т. 90, № 6. С. 643–648.
11. Снегин Э.А., Гребенников М.Е., 2011. Анализ изменчивости модельных видов наземных моллюсков в популяциях Урала и юга Среднерусской возвышенности // Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки. Вып. 15. № 9(104). С. 67–75.
12. Шилейко А.А., 1984. Наземные моллюски подотряда *Pupillina* фауны СССР (Gastropoda, Pulmonata, Geophila) // Фауна СССР. Моллюски. Нов. сер. Л.: Наука. Т. 3. Вып. 3. 339 с.
13. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. N 131. P. 479–491.
14. Nei M., 1972. Genetic distance between populations // The American Naturalist. Vol. 106, N 949. P. 283–292.
15. Nei M., 1975. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam. 278 p.
16. Peakall R., Smouse P.E., 2001. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.

17. Snegin E. A. 2011. The genetic structure of model species populations of terrestrial mollusks in conditions of urbanized landscape using the example of *Chondrula tridens* Müll (Gastropoda, Pulmonata) // Russian Journal of Genetics: Applied Research. Vol. 2, N. 2. P. 160–170.
18. Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucleic Acids Research. Vol. 18, N 22. P. 7213–7219.
19. Wright S., 1970. Random drift and shifting balance theory of evolution//Mathematical Topics in Population Genetics. Berlin: Springer Verlag. P. 1–31.
20. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution. <http://www.kumarlab.net/publications>.
21. Yeh F. C., Yang R., Boyle T. J., Ye Z., Xiyang J. M., 2000. POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada. http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html.
22. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. Vol. 20, N 2. P. 176–181.

ANALYSIS OF THE GENETIC VARIABILITY OF POPULATIONS OF LAND SNAIL *CHONDRULA TRIDENS* MÜLL. (GASTROPODA, PULMONATA) RAPD AND ISSR MARKERS

Snegin E. A.

✿ **SUMMARY:** *Background.* This article is about evolutionary processes in populations of small mobile species in the urbanized landscape. *Materials and methods.* Based of the polymerase chain reaction, using RAPD and ISSR DNA markers the genetic structure of populations of model species of terrestrial mollusks *Chondrula tridens* Müll., living in Mid-Russian Upland, has been analyzed. *Results.* Interpretation of the obtained DNA-patterns is presented. Polymorphic and monomorphic amplicons are identified. The level of genetic variability of population is defined. The factors influencing formation population of gen pool of the given species in the conditions of the urbanized landscape are revealed. *Conclusion.* The structure of population's distribution and the state population gene pools of *Ch. tridens* in the urbanized landscape were determined.

✿ **KEY WORDS:** PCR; terrestrial mollusks; population gene pool; Central Russian Upland.

✿ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

1. Grebennikov M.E. Reliktovie populacii *Chondrula tridens* (Müll, 1974) na Srednem Urale [Relict populations of *Chondrula tridens* (Müll, 1974) in the Middle Urals]. Actual problems of biology and ecology. Syktyvkar, 1999. P. 49.

2. *Dinamika populacionnich genofondov pri antropogennich vozdeistviach* [Population dynamics of gene pools in anthropogenic impacts]. Ed. Y. P. Altukhova. Moscow: Nauka, 2004. 619 p.
3. Komarova E.V., Stoiko T.G. *Izmenchivosti rakoviny nazemnogo molluska Chondrula tridens v Srednem Povolzhie* [The variability of the land snail shells *Chondrula tridens* in the Middle Volga region]. News of Penza State Pedagogical University V.G. Belinsky. 2012. N 29. P. 220–226.
4. Kramarenko S.S., Sverlova N. B. *Do vivchennia vnutrishniovidovoi minlivosti Chondrula tridens (Gastropoda, Pulmonata, Buliminidae) na zachodi Ukraini ta zasuvannia taksonomichnogo statusu okremich form* [The study of intraspecific variation *Chondrula tridens* (Gastropoda, Pulmonata, Buliminidae) in western Ukraine and clarify the taxonomic status of certain forms]. Scientific Notes of the L'viv State Museum of Nature. 2003. Vol. 18. P. 93–110.
5. Kramarenko S.S., Sverlova N. B. *Meshpopulaciona minlivosti konchologichnih oznak nazemnogo moluska Chondrula tridens (Buliminidae) Severozapadnogo Prichernomoria* [Inter-population variability conchological signs of terrestrial snail *Chondrula tridens* (Buliminidae) in North-western Black Sea] Scientific Notes of the L'viv State Museum of Nature. 2006. Vol. 22. P. 105–118.
6. Mayr E. *Zoologicheskii vid i evolucia* [Animal species and evolution] / Moscow: Mir, 1968. P. 398.
7. Matekin P.V. *Fauna nazemnich molluskov Nignego Povolzhia i eio znachenie dlia predstavlenia ob istorii sovremennich lesov raiona* [The fauna of terrestrial mollusks of the lower Volga region and its importance for the understanding of the history of modern forest area] Zoologicheskii zhurnal. 1950. Vol. 29(3). P. 193–205.
8. Nikolaev V.A. *Izmenchivosti i ekologiya enid Srednerusskoi vozvishennosti / [Variability and ecology Enida in Mid-Russian Upland] / in Fauna i ekologiya bespozvonochnykh lesostepnoi zony* [Fauna and Ecology of Invertebrates of the Forest Steppe Zone]. Scientific papers of the Kursk State Pedagogical Institute. Kursk. 1981. Vol. 210. P. 54–57.
9. Snegin E. A. Assessment of the State of Population Gene Pools of Terrestrial Mollusks under the Influence of Ore Processing Plants: A Case Study of *Bradybaena fruticum* Mull. (Gastropoda, Pulmonata) // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2011a. Vol. 2(2). P. 160–170.
10. Snegin E. A. *K voprosu o roli principa osnovatelia v formirovanii genofondov adventivnich kolonii na primere Chondrula tridens (Gastropoda, Pulmonata)* [On the role of the founder principle in the formation

- of gene pools of adventive colonies from the example of *Chondrula tridens* (Gastropoda, Pulmonata)]. *Zoologicheskii zhurnal*. 2011b. Vol. 90 (6). P. 643–648.
11. Snegn E.A., Grebennikov M.E. *Analiz izmenchivosti modelinich vidov nazemnich molluskov v populaciach Urala i iuga Srednerusskoi vozvishennosti* [Analysis of variability of the model species of terrestrial mollusks in the populations of the Ural and Southern Mid-Russia Upland]. Scientific Statement Belgorod State University. Science Series. 2011. Issue 15. N 9(104). P. 67–75.
 12. Shileiko A. A. *Nazemnie molluski podotriada Pupillina fauni SSSR (Gastropoda, Pulmonata, Geophila)* [Terrestrial Mollusks of the Suborder Pupillina of the Fauna of the USSR (Gastropoda, Pulmonata, Geophila)] / in *Fauna SSSR. Molluski. Nov. Ser.* [Fauna of the USSR. Molluska. New series]. Leningrad: Nauka. 1984. Vol. 3(3). 339 p.
 13. 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. N 131. P. 479–491.
 14. Nei M. Genetic distance between populations // *The American Naturalist*. 1972. Vol. 106(949). P. 283–292.
 15. Nei M. *Molecular population genetics and evolution*. Amsterdam. 1975. 278 p.
 16. Peakall R., Smouse P. E. *GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. Australian National University, Canberra, Australia. 2001. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.
 17. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Research*. 1990. Vol. 18 (22). P. 7213–7219.
 18. Wright S. *Random drift and shifting balance theory of evolution* // *Mathematical Topics in Population Genetics*. Berlin: Springer Verlag. 1970. P. 1–31.
 19. 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. <http://www.kumarlab.net/publications>.
 20. 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. http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html.
 21. 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.

✪ Информация об авторе

Снегин Эдуард Анатольевич — д. б. н., заведующий кафедрой. Кафедра биологии и экологической генетики. Белгородский государственный национальный исследовательский университет. 308015, Белгород, ул. Победы, д. 85. E-mail: snegin@bsu.edu.ru.

Snegin Eduard Anatolyevich — Doctor of Biological Sciences, Head of Department. Department of biocenology and ecological genetics. Belgorod national research university. 308015, Belgorod, Pobedy St., 85. Russia. E-mail: snegin@bsu.edu.ru.