

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ НАЗЕМНОГО МОЛЛЮСКА *BRADYBAENA FRUTICUM* MÜLL. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RAPD- И ISSR- МАРКЕРОВ¹

З.А. Снегин

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет
Россия, 308015, г. Белгород,
ул. Победы 85

E-mail: snegin@bsu.edu.ru

На основе метода полимеразной цепной реакции с использованием RAPD- и ISSR- маркеров ДНК проанализирована генетическая структура популяций модельного вида наземных моллюсков *Bradybaena fruticum* Müll., обитающих в условиях Среднерусской возвышенности. Дается расшифровка полученных фингерпринтов. Выделены полиморфные и мономорфные ампликоны. Определен уровень генетической изменчивости и выяснена степень оригинальности генофондов изученных популяций.

Ключевые слова: ПЦР, наземные моллюски, популяционный генофонд, Среднерусская возвышенность.

Введение

На протяжении последних сорока лет ведутся исследования популяционной структуры кустарниковой улитки (*Bradybaena (Fruticicola) fruticum* Müll.) на территории Европы с использованием полиморфных признаков раковины и изоферментов [1–13]. Несмотря на значимость результатов, полученных в предыдущих работах, проанализирована изменчивость только кодирующей части генома, тогда как остальная часть «молчашей» ДНК осталась вне поля зрения. Настоящая работа является первой попыткой изучения внутривидовой изменчивости этого вида на основе маркеров, включающих случайные участки генома, а так же тандемные повторы сателлитной ДНК.

Цель работы. На основе метода полимеразной цепной реакции с использованием RAPD- и ISSR-маркеров, оценить уровень изменчивости в популяциях *Br. fruticum* в условиях Среднерусской возвышенности.

Для сопоставления были взяты выборки из популяций, обитающих на территории Урала, Вятского региона и Румынии.

Материал и методика

Материалом для исследования послужили образцы тканей особей *Br. fruticum*, хранящиеся в криобанке, созданном при зоологическом музее БелГУ. Выборки из популяций были сделаны во время экспедиции с 2004 по 20010 годы. Моллюски собирались вручную с поверхности почвы, со стеблей и листьев растений, иногда в подстилке. Всего было исследовано 697 особей из шестнадцати популяций. Описание пунктов сбора приведены в табл. 1.

Анализ изменчивости проводили с использованием полимеразной цепной реакции (RAPD, ISSR). В результате предварительного скрининга были выбраны три праймера, дающие наиболее хорошо выделяющиеся и воспроизводимые фингерпринты (табл. 2).

Метод RAPD. Реакцию проводили в 20 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, 100 мМ трис-*HCl* (pH=8.3), 500 мМ *KCl*, 2 мМ *MgCl*, 0.25 *dNTP*, 0.5 мМ праймера, 0.5 единиц *Taq* ДНК-полимеразы. Реакция проходила в следующих условиях: «горячий старт» – 2 мин/94°C, 35 циклов (денатурация – –45 с/94°C, отжиг праймера – 15 с/30°C, 15 с/45°C, синтез – 1 мин/72°C), дополнительный синтез – 10 мин/72°C, охлаждение до 4°C.

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке программы РНПВШ № 2.2.3.1/ 9731, РФФИ № 09-04-97513 р_центр_а., Министерства образования и науки РФ ГК П 1050.



Таблица 1

			Описание пунктов сбора
Регион	Пункт	N	Описание биотопа
Среднерусская возвышенность	1	11	Пойма р. Осколец, д. Стойло (Старооскольский р-н Белгородской области). Заросли ивы, в подлеске лопух и крапива. Северные окрестности территории Стойленского ГОКа.
	2	21	Заповедный участок «Ямская степь» (Губкинский район Белгородской области). Смешанный лес, заросли крапивы. Территория влияния Лебединского ГОКа и, в меньшей степени, Стойленского.
	3	22	Долина р. Оскол, дубрава возле с. Сорокино (Старооскольский р-н Белгородской области). Заросли крапивы и лопуха. Территория влияния Стойленского ГОКа, г. Ст. Оскол и, в меньшей степени, Лебединского ГОКа.
	4	65	Пойма р. Дубенка (Губкинский и Старооскольский р-ны Белгородской области). Пойменная дубрава, в подлеске крапива, лопух, хмель. Территория влияния Стойленского и Лебединского ГОКов.
	5	71	Байрачная дубрава возле с. Коньшино (Губкинский р-н Белгородской области). Заросли крапивы. Территория влияния Лебединского и, в меньшей степени, Стойленского и ГОКов.
	6	15	Пойма р. Оскол возле д. Завалищено (Старооскольский р-н Белгородской области). Заросли лопуха, борщевика и крапивы. Территория влияния Стойленского ГОКа, Оскольского электрометаллургического комбината и, в меньшей степени, Лебединского ГОКа.
	7	50	Пойма р. Короча возле с. Дмитриевка (Шебекинский р-н Белгородской области). Пойменный лес из ивы и клена, заросли крапивы.
	8	25	Заповедный участок «Стенки Изгорья» (Новооскольский р-н Белгородской области) – заболоченный биотоп, заросли ольхи, в подлеске лопух и крапива
	9	30	Памятник природы «Борки» (Валуйский р-н Белгородской области) - пойма р. Козинка, ивовый лес, заросли лопуха, крапивы и хмеля.
	10	43	«Ровеньский природный парк», участок «Айдарский». Пойма реки Айдар, окрестности пос. Ровеньки (Белгородская область). Умеренно увлажненный открытый участок. Заросли лопуха, борщевика с примесью крапивы.
Вятский регион	11	17	Пойма р. Оскол возле г. Купянск (Харьковская область). Пойменный ивовый лес.
	12	23	Историко-природный музей-заповедник «Дивногорье» (Острогожский р-н Воронежской области). Пойма р. Тихая Сосна. Лопух, крапива, хмель.
	13	54	Заповедный участок «Галичья гора» (Липецкая область). Пойма р. Дон. Заросли крапивы, борщевика, лопуха и хмеля.
Урал	14	81	Пойма р. Вятка. Территория городского парка г. Киров. Заросли крапивы и таволги.
Урал	16	84	Природный парк «Оленьи ручьи» (Свердловская область, Нижнисергинский р-н) – сосново-еловый лес с березой и лиственницей, поляна, заросли таволги, малины.
Румыния	16	85	Долина реки Олт, предгорье Трансильванских Альп возле пос. Авриг. Пойменный лес из ивы и клена, каменистый грунт, сильное увлажнение, заросли крапивы, лопуха и хмеля.

Метод ISSR. Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, 100 мМ трис-*HCl* ($pH=8.3$), 500 мМ *KCl*, 4 мМ *MgCl*, 0.25 *dNTP*, 0.5 мМ праймера, 0.5 единиц *Taq* ДНК-полимеразы. 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.

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности используемых праймеров

Метод	Праймер	Последовательность	Количество локусов
RAPD	OPF 8	5'-GGGATATCGG-3'	14
ISSR	It 1	(CA) ₈ GT	14
	UBC 827	(AC) ₈ G	16

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с использованием TAE буфера, 100 В – 45 мин. Блоки окрашивали бромистым этидием.

По картинам электрофореза составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось как «1» (аллель *p*), отсутствие «0» (аллель *q*). Ввиду того, что при методе *RAPD* могут появляться неспецифические продукты амплификации, для анализа мы использовали четко просматриваемые и воспроизводимые ампликоны.

Обработка полученных данных проводилась с использованием программы GenAEx [14].

Полученные результаты и обсуждение

Полученные фингерпринты приведены на рис. 1, 2. На рис. 2 дается так же расшифровка полученных ДНК-паттернов по трем праймерам.

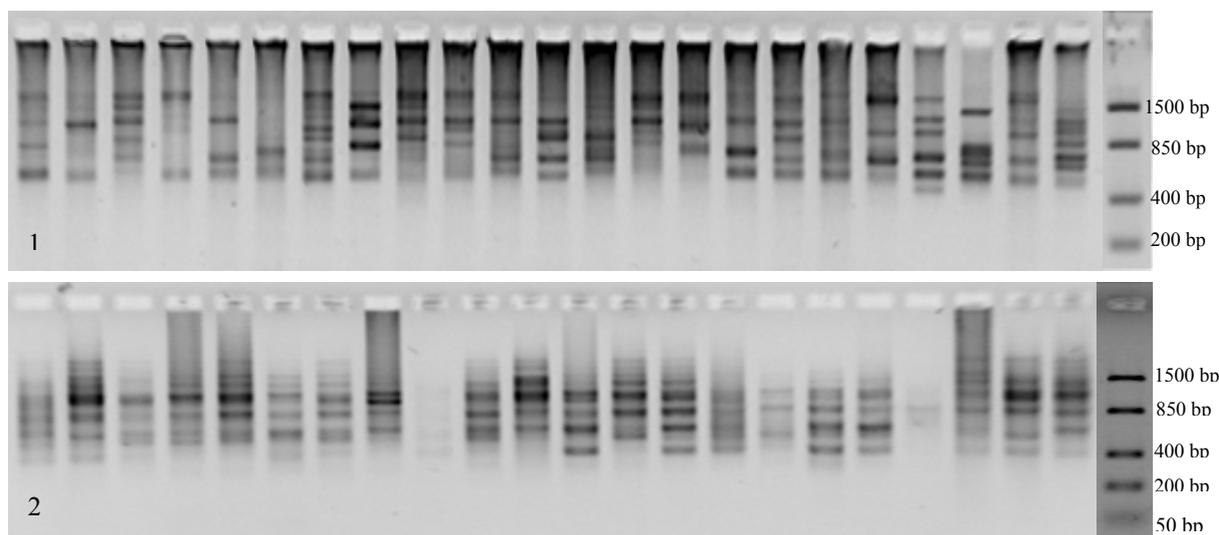


Рис. 1. ISSR-PCR спектры ДНК: 1 – праймер *It 1*; 2 – праймер *UBC 827*

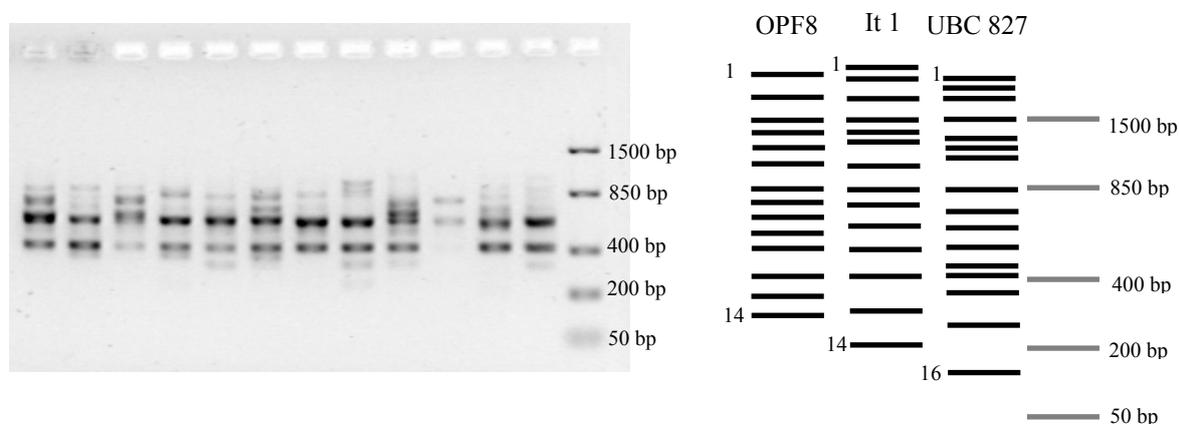


Рис. 2. Слева – RAPD-PCR спектры ДНК, праймер *OPF8*. Справа – расшифровка ДНК-паттернов по трем праймерам (номерами обозначены только первые и последние локусы)



На рис. 3 представлены уровни гетерозиготности сорока четырех локусов, вычисленные на основе анализа шестнадцати популяций. Согласно представленным данным наиболее полиморфными среди RAPD-маркеров являются локусы 3 и 7, а среди ISSR-маркеров более изменчивы оказались локусы 3, 9 и 12 по праймеру It 1, и локусы 4, 5, 8, 10 по праймеру UBC 827. В группу более мономорфных локусов вошли: по праймеру OPF 8 – локусы 1, 11 и 12, по праймеру It 1 – локусы 1, 13 и 14, по праймеру UBC 827 – локусы 2, 14, 15 и 16.

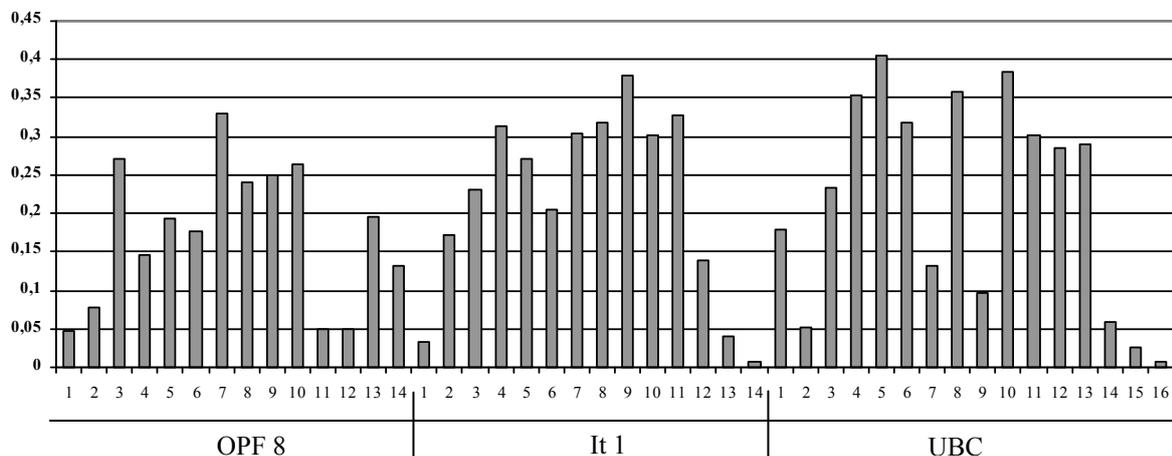


Рис. 3. Уровень гетерозиготности сорока четырех локусов (усредненные данные по шестнадцати популяциям)

Усредненные частоты аллелей и уровни гетерозиготности для исследуемых популяций, вычисленные по различным праймерам представлены в табл. 3. Согласно полученным данным уровень гетерозиготности популяций по различным праймерам неодинаков. В популяциях 1, 2, 14 – наибольшая гетерозиготность отмечена по праймеру UBC 827, в популяциях 3 и 5 – по праймеру OPF 8, в популяциях 4, 6, 7, 11, 12, 15 – по праймеру It 1. Еще в двух группах (7, 16) наиболее изменчивы оказались межмикросателлитные участки (по праймерам It 1 и UBC 827). Только в четырех популяциях (пункты 8, 9, 10, 13) по трем праймерам получены сходные высокие значения гетерозиготности. Стоит отметить, что эти группы обитают на особо охраняемых природных территориях.

Таблица 3

Средние частоты аллелей и уровни гетерозиготности, вычисленные по различным праймерам

Пункт	OPF 8			It 1			UBC 827		
	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>He</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>He</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>He</i>
1	0.250	0.750	0.111	0.112	0.888	0.100	0.196	0.804	0.210
2	0.338	0.662	0.154	0.232	0.768	0.183	0.269	0.731	0.248
3	0.261	0.739	0.198	0.193	0.807	0.082	0.164	0.836	0.184
4	0.273	0.727	0.135	0.139	0.861	0.223	0.100	0.900	0.135
5	0.280	0.720	0.233	0.192	0.808	0.138	0.216	0.784	0.169
6	0.355	0.645	0.052	0.211	0.789	0.264	0.227	0.773	0.155
7	0.184	0.816	0.198	0.196	0.804	0.248	0.341	0.659	0.243
8	0.335	0.665	0.273	0.165	0.835	0.219	0.280	0.720	0.255
9	0.310	0.690	0.209	0.163	0.837	0.222	0.218	0.782	0.235
10	0.301	0.699	0.252	0.219	0.781	0.282	0.203	0.797	0.255
11	0.188	0.812	0.153	0.213	0.787	0.230	0.320	0.680	0.177
12	0.306	0.694	0.176	0.197	0.803	0.240	0.129	0.871	0.192
13	0.346	0.654	0.273	0.207	0.793	0.256	0.239	0.761	0.222
14	0.339	0.661	0.070	0.170	0.830	0.239	0.299	0.701	0.303
15	0.259	0.741	0.127	0.271	0.729	0.318	0.305	0.695	0.235
16	0.287	0.713	0.155	0.155	0.845	0.227	0.199	0.801	0.253

Примечание: *p* – средняя частота присутствия аллели, *q* – средняя частота отсутствия аллели, *He* – предполагаемая гетерозиготность.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа, приведенные в таблице 4, демонстрируют высокую оригинальность исследуемых популяций по соотношению частот аллелей используемых локусов ДНК. Во всех случаях межпопуляционная вариация достоверно превосходит внутривидовую. Это подтверждает выдвинутый нами ранее тезис [12, 13], что урбанизированный лесостепной ландшафт, в условиях которого обитает большинство изучаемых групп улиток, нарушает естественные миграционные процессы, приводит к сильной изолированности и, как следствие, ведет к формированию своеобразных популяционных генофондов.

Таблица 4
Результаты однофакторного дисперсионного анализа частот аллелей исследуемых локусов

Локусы праймеров	Изменчивость	SS	df	MS	F	Fst
OPF 8	Между группами	643.1	15	42.9	35.8	1.7; 2.0; 2.5
	Внутри групп	849.7	681	1.2		
It 1	Между группами	387.8	15	25.9	12.9	
	Внутри групп	1341.5	681	2.0		
UBC 827	Между группами	516.6	15	34.4	19.1	
	Внутри групп	1259.9	681	1.8		
По всем локусам	Между группами	1547.5	15	103.2	20.2	
	Внутри групп	3451.1	681	5.1		

В целом по 44 локусам среди популяций Среднерусской возвышенности наибольшие показатели генетической изменчивости отмечены в группах 7, 8, 9, 10, 12, 13 (табл. 5). Сходный высокий уровень изменчивости зафиксирован в популяциях Вятского

регионов (14), Урала (15) и Румынии (16). Наиболее мономорфной оказалась популяция из пункта 1, обитающая на территории Стойленского горно-обогатительного комбината.

Таблица 5
Показатели генетического разнообразия в исследуемых популяциях

Пункт	P%	Ae	I	He
1	47.7	1.24±0.34	0.220	0.144±0.028
2	65.9	1.33±0.37	0.300	0.197±0.030
3	61.4	1.26±0.35	0.243	0.156±0.028
4	72.7	1.25±0.29	0.263	0.163±0.025
5	79.5	1.28±0.32	0.286	0.180±0.026
6	50.0	1.26±0.34	0.239	0.157±0.029
7	79.5	1.39±0.35	0.354	0.230±0.028
8	72.7	1.43±0.38	0.371	0.249±0.031
9	79.5	1.37±0.37	0.342	0.222±0.029
10	81.8	1.45±0.37	0.395	0.262±0.029
11	63.6	1.31±0.35	0.286	0.186±0.029
12	75.0	1.33±0.35	0.316	0.202±0.028
13	79.5	1.44±0.40	0.370	0.249±0.031
14	70.5	1.35±0.36	0.318	0.209±0.029
15	81.8	1.38±0.36	0.347	0.227±0.029
16	75.0	1.35±0.34	0.382	0.213±0.028

Примечание: P – процент полиморфных локусов; Ae – среднее эффективное число аллелей на локус; I – индекс Шеннона; He – предполагаемая гетерозиготность; значения M±Se

(пункт 1, 6). К румынской группе наиболее близкими оказались популяции из пунктов 6 и 10. Кроме того, группа из пункта 6 так же наиболее близка к популяции из Вятского региона, а группа из пункта 10 ближе остальных групп из Среднерусской возвышенности стоит к уральской популяции.

Значения генетического расстояния, вычисленные по Nei (табл. 6), демонстрируют, что по соотношению частот аллелей среди популяций Среднерусской возвышенности наиболее оригинальной является популяция из заповедного участка «Ямская степь» (пункт 2), которая дальше всех дистанцировалась от большинства популяций региона, включая и близлежащие группы



Таблица 6

Значения генетического расстояния (по Неи [15])

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Пункт
0.000																1
0.216	0.000															2
0.110	0.195	0.000														3
0.098	0.170	0.165	0.000													4
0.039	0.157	0.068	0.119	0.000												5
0.122	0.220	0.193	0.116	0.105	0.000											6
0.199	0.186	0.238	0.173	0.212	0.178	0.000										7
0.145	0.207	0.160	0.146	0.135	0.203	0.166	0.000									8
0.139	0.216	0.157	0.108	0.149	0.160	0.162	0.071	0.000								9
0.130	0.124	0.138	0.098	0.114	0.114	0.113	0.100	0.112	0.000							10
0.180	0.182	0.178	0.202	0.183	0.211	0.176	0.171	0.146	0.118	0.000						11
0.174	0.218	0.124	0.131	0.147	0.207	0.215	0.140	0.128	0.104	0.171	0.000					12
0.139	0.169	0.156	0.117	0.100	0.129	0.161	0.132	0.109	0.077	0.130	0.185	0.000				13
0.121	0.201	0.238	0.144	0.148	0.051	0.116	0.200	0.190	0.124	0.187	0.270	0.142	0.000			14
0.254	0.196	0.248	0.231	0.254	0.224	0.154	0.176	0.141	0.084	0.125	0.163	0.177	0.216	0.000		15
0.112	0.168	0.189	0.104	0.123	0.073	0.146	0.185	0.176	0.097	0.175	0.217	0.154	0.059	0.207	0.000	16

Литература

1. Хохуткин И.М. Полиморфизм и границы популяций наземных моллюсков из рода *Bradybaena* // Экология. – 1971. – № 4. – С. 73–80.
2. Хохуткин И. М. О наследовании признака "опоясанности" в естественных популяциях наземного брюхоногого моллюска *Bradybaena fruticum* (Mull.) // Генетика. – 1979. – Т. 15, № 5. – С. 868–871.
3. Хохуткин И.М. Структура изменчивости видов на примере наземных моллюсков. – Екатеринбург: УрО РАН, 1997. – 175 с.
4. Матекин П.В., Макеева В.М. Полиморфная система эстераз и пространственная структура вида у кустарниковой улитки (*Bradybaena fruticum* Mull.) // Журн. общ. биол. – 1977. – Т. 38, № 6. – С. 908–913.
5. Макеева В.М., Пахорукова Л.В., Уголкова Н.Д. Анализ динамики полиморфных признаков в популяциях *Bradybaena fruticum* в целях экологического мониторинга // Журн. общ. биол. – 1995. – Т. 56, № 5. – С. 170–185.
6. Макеева В.М., Белоконь М.М., Малюченко О.П., Оценка состояния генофонда природных популяций беспозвоночных животных в условиях фрагментарного ландшафта Москвы и Подмосковья (на примере кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll) // Генетика. – 2005. – № 11. – С.1495–1510.
7. Макеева В.М., Белоконь М.М., Смуров А.В. Эколого-генетический подход к охране животных антропогенных экосистем (на примере модельных видов в Москве и Подмосковье). – М.: Изд-во Московск. ун-та. – 2011. – 160 с.
8. Зейферт Д.В. Действие естественного отбора на генетическую структуру популяций наземного моллюска *Bradybaena fruticum* (Mull.) // Журн. общ. биол. – 1987. – Т. 48, № 4. – С. 549–554.
9. Зейферт Д.В., Хохуткин И.М. Экология кустарниковой улитки *Fruticicola fruticum* – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – 92 с.
10. Falniowski A., Szarowska M., Witkowska-Pelc E. Intra- and interpopulation genetic differentiation and gene flow in a group of isolated populations of *Bradybaena fruticum* (Muller, 1774) in South Poland // Journ. of Zoolog. Systematics and Evolutionary Research. – 2004. – Vol. 42, № 1. – P. 70–80
11. Снегин Э. А., Структура расселенности *Bradybaena fruticum* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях юга лесостепной зоны Русской равнины. Автореф. дис. ... канд. биол. н. – М, 1999. – 22 с.
12. Снегин Э. А., Эколого-генетические аспекты расселения *Bradybaena fruticum* (Mollusca, Gastropoda, Pullmonata) в элементах лесостепного ландшафта // Экология. – 2005. – № 1. – С. 39–47.

13. 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.

14. Peakall R., Smouse P.E., GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and reseach. Australian National University. – Canberra, Australia, 2001. – <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.

15. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small numba of individuals // Genetics. – 1978. – Vol. 89. – P. 583–590.

ANALYSIS OF THE GENETIC VARIABILITY OF POPULATIONS OF LAND SNAIL *BRADYBAENA FRUTICUM*MÜLL. USING RAPD AND ISSR MARKERS

E.A. Snegin

*Belgorod State National Research
University, Pobedy St., 85, Belgorod,
308015, Russia;*

E-mail: snegin@bsu.edu.ru

On the basis of the method of polymerase chain reaction, using RAPD and ISSR DNA markers the genetic structure of populations of model species of terrestrial molluscs *Bradybaena fruticum* Müll., living in Central Russian Upland, has been analyzed. We give a transcript of the obtained fingerprints. Polymorphic and monomorphic amplicons are identified. The level of genetic variability and the degree of originality of gene pools of studied populations are determined.

Key words: PCR, terrestrial mollusks, population gene pool, Central Russian Upland.