УДК 575.1

© Э.А. Снегин

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ПОПУЛЯЦИОННЫХ ГЕНОФОНДОВ ОСОБО ОХРАНЯЕМОГО ВИДА *HELICOPSIS STRIATA* (MOLLUSCA, GASTROPODA, PULMONATA) НА ОСНОВЕ ДНК-МАРКЕРОВ

На основе ДНК-маркеров (RAPD и ISSR) изучено состояние генофондов девятнадцати популяций особо охраняемого реликтового вида *Helicopsis striata* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях юга Среднерусской возвышенности. Полученные данные демонстрируют высокую степень подразделенности популяций ($\Phi_{st} = 0{,}404$, $G_{st} = 0{,}358$) и повышенный уровень гомозиготности в ряде групп, обитающих в промышленной зоне и в степных биотопах. Отмечена достоверная корреляция между интенсивностью потока генов и географическими дистанциями между популяциями ($R = 0{,}571 \pm 0{,}052$), что соответствует модели изоляции расстоянием. Значения эффективной численности, вычисленные на основе индексов подразделенности, оказались достоверно ниже аналогичной эффективной численности фоновых видов моллюсков.

❀ **Ключевые слова:** наземный моллюск; популяционный генофонд; антропогенно-измененный ландшафт.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование состояния природных популяций уязвимых видов является одним из основных направлений современного биомониторинга различных территорий. Одним из таких видов является *Helicopsis striata* Müller (улитка степная ребристая), который занесен в Красную книгу Белгородской области (Красная книга..., 2004) а также в охраняемые списки Польши, Чехии и Словакии (Ložek, 1980; Stępczak, 1999).

Ареал вида охватывает территорию от Западной и Средней Европы до восточной Украины, Курской, Белгородской и Воронежской областей (Шилейко, 1978). В пределах Среднерусской возвышенности, где проходит восточная граница его ареала, вид обитает на сухих, хорошо прогреваемых склонах балок, как правило южной экспозиции с меловой почвой. Период основной активности приходится на апрель–май, а так же сентябрь. В это время в местах обитания можно наблюдать массовые скопления моллюсков. Летние месяцы улитки проводят, зарывшись в почву.

H. striata относится к средиземноморской реликтовой группе ксерофильных моллюсков (Николаев, 1973). В исследованиях по восстановлению исторического прошлого биоценозов Европы вид используется в качестве индикатора сухих остепнённых экосистем (Sparks, 1953). На территории Среднерусской возвышенности часто является компонентом реликтовых ценозов, называемых «Сниженные Альпы» (Снегин, 2002).

Цель работы. На основе анализа изменчивости *RAPD*- и *ISSR*-маркеров ДНК оценить состояние популяций *H. striata* на восточной границе его видового ареала в природоохранных целях.

Актуальность данного исследования диктуется необходимостью пристального внимания к реликтовым сообществам меловых обнажений, которые в последние годы из-за реализации областной программы «Зеленая столица» подвергаются облесению, что ставит их на грань полного уничтожения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы тканей особей *H. striata*, хранящиеся в криобанке, созданном при лаборатории популяционной генетики и генотоксикологии НИУ «БелГУ». Выборки из популяций были сделаны во время экспедиции с 2006 по 2010 годы. Всего по ДНК-локусам было исследовано 694 особи *H. striata* из девятнадцати популяций (рис. 1, табл. 1).

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 два праймера: *OPA 1* (5′-CAGGCCCTTC-3′; метод *RAPD*), *UBC 811* (5′- $(GA)_8$C-3′, метод *ISSR*). Амплификацию проводили в термоциклерах MJ Mini и MyCycler (Bio-Rad, США).

Метод *RAPD*. Реакцию проводили в 20 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, ПЦР-буфер (10 мМ трис-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCL, 2 мМ $MgCl_2$), 0,25 мМ dNTP, 0,5 мкМ праймера, 1 единица Taq ДНК полимеразы (инги-

Поступила в редакцию 31.03.2015
Принята к публикации 21.05.2015

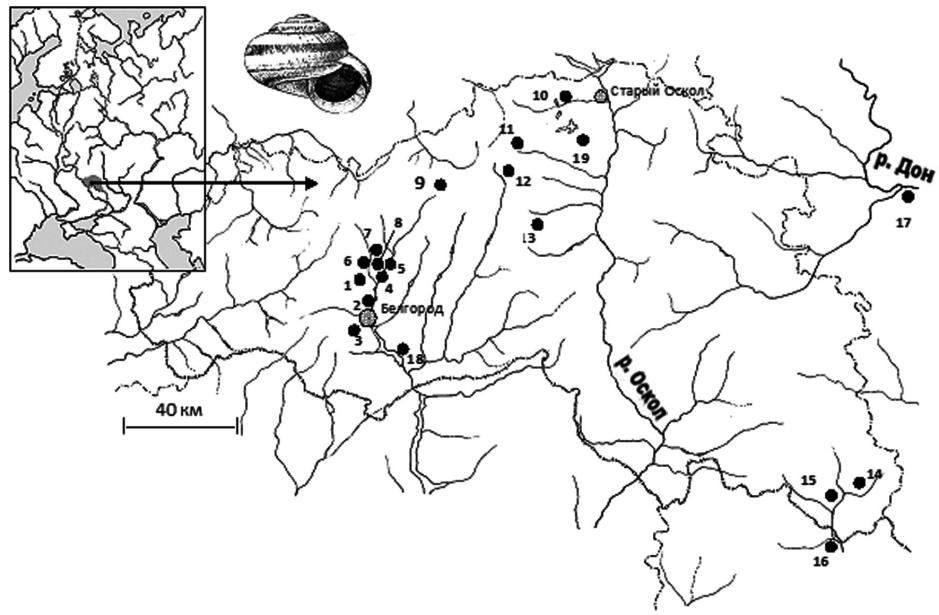

Рис. 1. Пункты сбора *H. striata* в районе исследования

бированной 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-HCl (pH 8,8), 16 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 7 мМ ЭДТА, 3 мМ $MgCl_2$), 0,25 мМ dNTP, 0,5 мкМ праймера, 1 единица Taq ДНК полимеразы (ингибированной для горячего старта). Реакция про-

Таблица 1

Описание пунктов сбора

№ пункта	Описание	Координаты
1	«Шопино» — юго-восточный склон правого берега р. Липовый Донец; депрессивные разнотравные луга; меловые почвы	50°42’20,17’’с. ш. 36°35’43,20’’в. д.
2	«Белая гора» — окрестности г. Белгорода, юго-западный крутой меловой склон правого берега р. Северский Донец	50°37’28,66’’с. ш. 36°37’15,97’’в. д.
3	«Ботанический сад» — окрестности г. Белгорода, территория ботанического сада БелГУ, меловые обнажения	50°35’30,20’’с. ш. 36°32’20,66’’в. д.
4	«Петропавловка А» — меловой склон южной экспозиции в месте впадения р. Липовый Донец в р. Северский Донец	50°41’32,48’’с. ш. 36°38’26,51в. д.
5	«Петропавловка Б» — правый крутой берег р. Северский Донец, юго-западная экспозиция, на месте бывшего мелового карьера	50°42’16,15’’с. ш. 36°39’29,89’’в. д.
6	«Терновка» — склон правого берега р. Липовый Донец южной экспозиции; глинистые почвы; растительность обедненная	50°44’01,45’’с. ш. 36°35’46,02’’в. д.
7	«Терновка А» — юго-восточный глинистый склон левого берега р. Липовый Донец рядом с автомобильной дорогой	50°43’37,58’’с. ш. 36°36’44,09’’в. д.
8	«Терновка Б» — юго-восточный склон левого берега р. Липовый Донец, почвы меловые, растительность разнотравно-луговая	50°43’30,75’’с. ш. 36°36’58,84’’в. д.
9	«Беленихино» — меловой склон левого берега р. Саженский Донец юго-западной экспозиции; злаково-разнотравная растительность	50°54’41,87’’с. ш. 36°38’21,65’’в. д.
10	«Губкин» — территория г. Губкин; склон балки юго-восточной экспозиции с лугово-степной разнотравной растительностью	51°17’50,56’’с. ш. 37°32’11,98’’в. д.
11	«Мелавое» — юго-восточный меловой склон балки левого берега р. Орлик; злаковое разнотравье	51°08’02,93’’с. ш. 37°25’05,72’’в. д.

Таблица 1 (Окончание)

№ пункта	Описание	Координаты
12	«Телешовка» — крутой меловой левый берег р. Короча; растительность в депрессивном состоянии из-за перевыпаса скота	51°02'20,91''с. ш. 37°17'06,22''в. д.
13	«Хмелевое» — нижние участки меловых склонов южной экспозиции в верховьях бассейна р. Халань	50°53'08,29''с. ш. 37°27'38,97''в. д.
14	«Нагольное» — меловые склоны южной экспозиции правого берега р. Сарма; степная растительность; природный парк «Айдарский»	49°58'43.61''с. ш., 38°57'33.69''в. д.
15	«Калюжный яр» — меловая балка, выходящая в пойму реки Айдар, территория природного парка «Айдарский»	49°57'02.88''с. ш., 38°53'49.32''в. д.
16	«Крейдяная гора» — восточный меловой склон правого берега р. Айдар; окрестности с. Шаровка, Луганская обл., Украина	49°49'54.75''с. ш., 38°53'47.71''в. д.
17	«Дивногорье» — правый берег р. Дон северной экспозиции; территория природного парка «Дивногорье», Воронежская область	50°59'14,52''с. ш. 39°20'00,50''в. д.
18	«Ржавец» — участок железнодорожной насыпи; пологий берег Белгородского водохранилища	50°59'14,52''с. ш. 39°20'00,50''в. д.
19	«Ямская степь» — юго-восточный меловой склон со степной растительностью; окрестности заповедного участка «Ямская степь»	51°10'07.54''с. ш., 37°38'23.18''в. д.

ходила 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 ТАЕ буфера (охлажденного до +4 °С), 10 В/см — 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 амплификонов после ПЦР у одних и тех же исследуемых особей.

У *H. striata* нами выделено по 17 локусов с использованием праймеров *OPA 1* и *UBC 811*. Полученные ДНК-паттерны и их расшифровка приведены на рисунке 2.

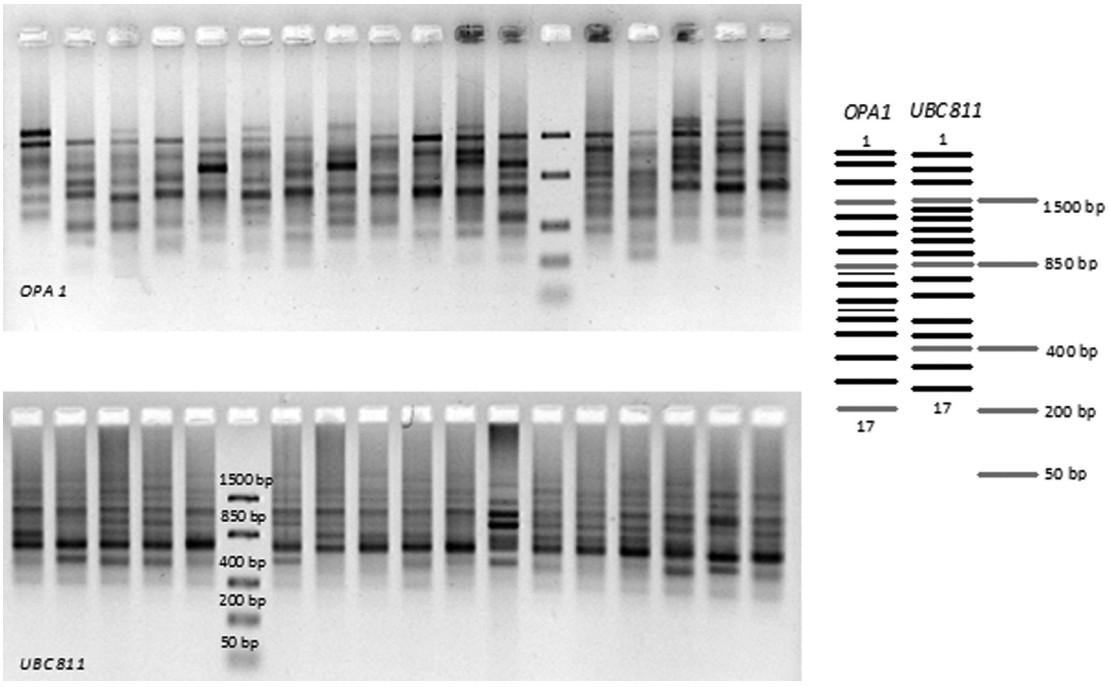

Рис. 2. *RAPD* и ISSR спектры *H. striata*

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

На первом этапе был проведен тест на нейтральность Эвенса-Ваттерсона (Ewens, 1972; Watterson, 1978; Manly, 1985) используемых локусов, который показал, что по большинству аллелей (в среднем 88,7 %) нет статистически значимых отличий между наблюдаемой гомозиготностью по Харди–Вайнбергу и гомозиготностью, ожидаемой при нейтральном процессе (табл. 2).

Анализ генетической изменчивости популяций *H. striata* мы проводили на фоне сопоставления с аналогичными данными, полученными нами ранее по двум фоновым видам наземных моллюсков, обитающих в районе исследования и являющихся индикаторами антропогенного влияния на экосистемы — *Bradybaena fruticum* (кустарниковая улитка) и *Chondrula tridens* (улитка трехзубая) (Снегин, 2010, 2011 а, 2011 б, 2012, 2013).

Уровни генетической гетерогенности, а также графические полигоны исследуемых популяций, построенные с использованием частот *q*-аллеля, приведены в таблице 3 и на рисунке 3. Полученные данные демонстрируют

Таблица 2

Результаты теста Эвенса–Ваттерсона. Указаны номера аллелей по соответствующим локусам, по которым наблюдаемая гомозиготность отличается от ожидаемой ($P < 0,05$). Данные рассчитывались на основе 1000 симуляций основной выборки

Популяция	Аллели		% нейтральных локусов
	OPA 1	*UBC 811*	
1	13, 16, 17	1	79
2	Нет	Нет	100
3	16	Нет	94,8
4	Нет	Нет	100
5	Нет	15	94,8
6	17	16	89,5
7	10	9	89,5
8	9	13, 14, 15	79
9	5	6, 16	84,2
10	Нет	2, 7, 12, 15	79
11	2	Нет	94,8
12	10, 12	Нет	89,5
13	6	5, 14	84,2
14	2, 6, 15	1, 9	73,7
15	Нет	12	94,8
16	Нет	1	94,8
17	6, 11	4, 16	79
18	1	14	89,5
19	Нет	9	94,8
Среднее			88,7

Таблица 3

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

Пункт	*N*	*%P*	*A*	A_e	I_{sh}	H_e
1	31	82,35	1,82 ± 0,07	1,41 ± 0,06	0,363 ± 0,046	0,239 ± 0,034
2	67	97,06	1,97 ± 0,03	1,44 ± 0,06	0,423 ± 0,036	0,272 ± 0,028
3	48	91,18	1,91 ± 0,05	1,44 ± 0,06	0,418 ± 0,038	0,271 ± 0,028
4	36	94,12	1,94 ± 0,04	1,42 ± 0,05	0,421 ± 0,034	0,27 ± 0,025
5	20	82,35	1,82 ± 0,07	1,46 ± 0,06	0,41 ± 0,043	0,271 ± 0,031
6	36	91,18	1,91 ± 0,05	1,47 ± 0,06	0,432 ± 0,039	0,283 ± 0,029
7	31	88,24	1,88 ± 0,06	1,45 ± 0,06	0,407 ± 0,042	0,267 ± 0,031
8	31	88,24	1,88 ± 0,06	1,45 ± 0,06	0,404 ± 0,042	0,265 ± 0,032
9	32	79,41	1,79 ± 0,07	1,39 ± 0,07	0,348 ± 0,046	0,228 ± 0,034
10	52	61,76	1,62 ± 0,08	1,22 ± 0,05	0,219 ± 0,042	0,137 ± 0,029
11	31	17,65	1,18 ± 0,07	1,07 ± 0,04	0,069 ± 0,031	0,044 ± 0,021
12	67	61,76	1,62 ± 0,08	1,25 ± 0,06	0,232 ± 0,046	0,150 ± 0,032
13	28	55,88	1,56 ± 0,09	1,34 ± 0,07	0,295 ± 0,05	0,198 ± 0,035
14	31	35,29	1,35 ± 0,083	1,16 ± 0,05	0,147 ± 0,043	0,097 ± 0,029
15	31	32,35	1,32 ± 0,08	1,17 ± 0,05	0,151 ± 0,042	0,099 ± 0,029
16	28	76,47	1,76 ± 0,074	1,45 ± 0,06	0,402 ± 0,045	0,268 ± 0,032
17	34	64,71	1,65 ± 0,08	1,39 ± 0,07	0,333 ± 0,051	0,225 ± 0,036
18	29	76,47	1,76 ± 0,07	1,33 ± 0,05	0,325 ± 0,043	0,207 ± 0,030
19	31	50,00	1,50 ± 0,09	1,22 ± 0,05	0,222 ± 0,044	0,142 ± 0,030
Среднее		69,81 ± 5,26	1,70 ± 0,07	1,34 ± 0,06	0,317 ± 0,042	0,207 ± 0,030

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

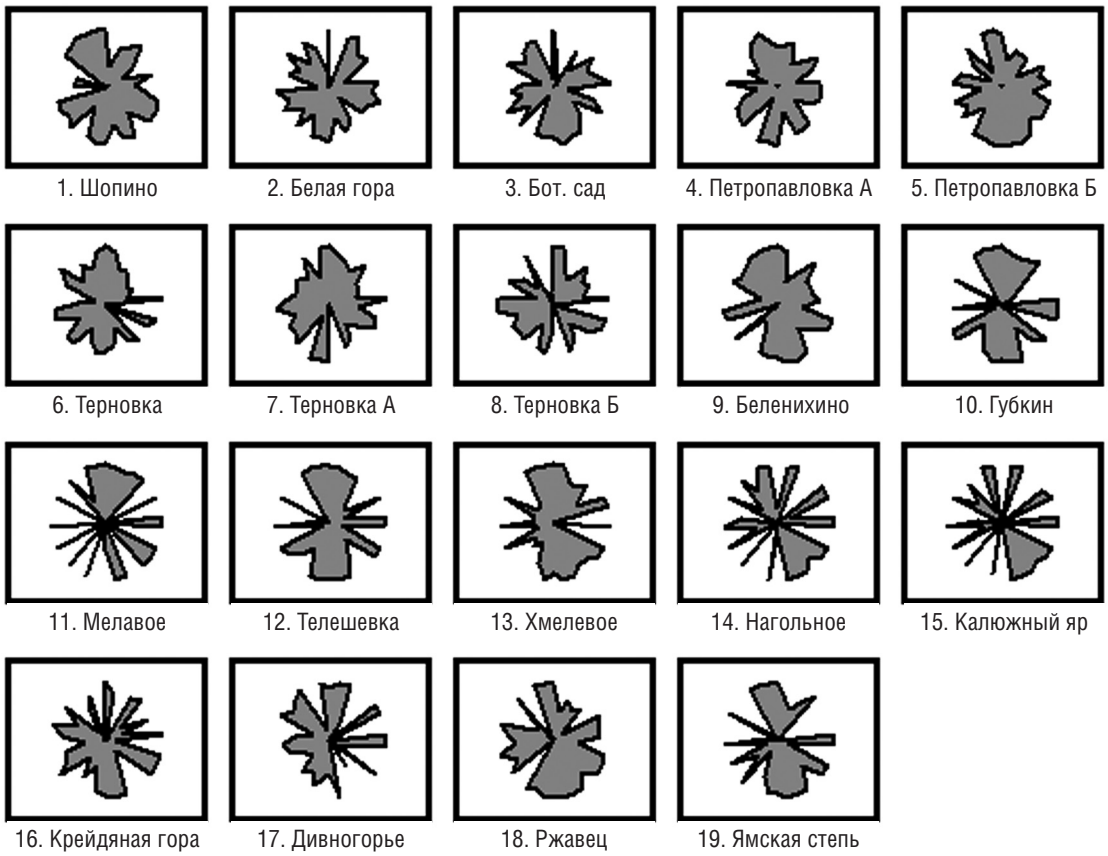

Рис. 3. Диаграммы, построенные по совокупности частот q-аллеля 34 локусов ДНК в популяциях *H. striata*

картину во многом сходную с результатами, полученными нами ранее по исследуемым популяциям на основе изоферментным маркеров (Снегин, Сычев, 2011), согласно которым в зонах влияния горно-обогатительных комбинатов (ГОК), относящихся к Курской магнитной аномалии, в популяциях *H. striata* происходит снижение уровня изменчивости. Так, наиболее мономорфной по всем показателям изменчивости ДНК оказалась группа из пункта «Мелавое» (№ 11). Пониженная изменчивость зафиксирована также в пункте «Губкин» (№ 10), «Телешовка» (№ 12), «Хмелевое» (№ 13) и «Ямская степь» (№ 19). Причиной гомозиготности, по-видимому, является чрезвычайная раздробленность популяций ввиду активного освоения территории примыкающих к ГОК (создание карьеров, строительство дорог и путепроводов).

Аналогичное снижение гетерозиготности наблюдали в степных биотопах «Нагольное» (№ 14) и «Калюжный яр» (№ 15)*, где промышленные территории отсутствуют. Это, вероятно, вызвано тем, что уровень изоляции популяций моллюсков в степном биоме выше, т. к. количество пригодных биотопов в более аридном климате меньше и между ними существуют обширные территории непригодные для улиток.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) по ДНК-локусам (табл. 4) выявил большую разобщенность между популяциями *H. striata*. 40 % изменчивости пришлось на межпопуляционные различия,

* В районе исследования проходит граница между лесостепной и степной зоной. Большинство исследуемых нами популяций (кроме 14, 15, 16) находятся в лесостепном биоме.

Таблица 4

Результат анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) по ДНК-локусам в популяциях *H. striata*

Источник изменчивости	*df*	*SS*	*MS*	*V*	*%*	*Φst*	*P*	*Nm*
Между популяциями	18	1686,31	93,68	2,481	40%	0,404	0,010	0,360
Внутри популяций	675	2466,96	3,65	3,655	60%			
Итого	693	4153,27	97,34	6,136				

при этом индекс дифференциации $\Phi_{st} = 0{,}404$, а интенсивность потока генов $Nm = 0{,}360$ особи за поколение. Стоит отметить, что по аллозимным маркерам степень различий между популяциями была выше (Снегин, 2012; Снегин, Сычев, 2011). Соотношение межпопуляционной дисперсии (*Vap*) и внутрипопуляционной дисперсии (*Vwp*) было 50/50 %, при этом $\Phi_{st} = 0{,}497$, $Nm = 0{,}288$.

Эти данные значительно отличаются от аналогичных показателей, полученных для фоновых видов моллюсков (Снегин, 2012). Например, у *Br. fruticum* по локусам ДНК уровень дифференциации популяций $\Phi_{st} = 0{,}298$, уровень потока генов $Nm = 0{,}708$, а соотношение *Vap*/*Vwp* = 30/70 %. У *Ch. tridens* — $\Phi_{st} = 0{,}185$, $Nm = 0{,}954$, *Vap*/*Vwp* = 19/81 %.

Оценка степени дифференциации популяций *H. striata* на основе модели, предложенной М. Неем (Nei, 1975) показала несколько меньшую разобщенность изучаемых групп в условиях лесостепи $G_{st} = 0{,}358$ (табл. 5). При этом средний поток генов оказался $Nm = 0{,}895$ особи за поколение. В основном это

Таблица 5

Показатели генетической дифференциации исследуемых групп *H. striata* по ДНК-локусам (по Nei, 1975)

Локус	№	*Ht*	*Hs*	*Gst*	*Nm*
OPA 1	1	0,210	0,062	0,703	0,21
	2	0,231	0,184	0,204	1,95
	3	0,324	0,254	0,217	1,80
	4	0,477	0,341	0,284	1,26
	5	0,445	0,211	0,526	0,45
	6	0,498	0,313	0,371	0,85
	7	0,381	0,249	0,347	0,94
	8	0,452	0,297	0,344	0,95
	9	0,123	0,094	0,236	1,62
	10	0,447	0,201	0,551	0,41
	11	0,468	0,144	0,692	0,22
	12	0,264	0,110	0,585	0,35
	13	0,151	0,120	0,203	1,97
	14	0,469	0,334	0,288	1,24
	15	0,376	0,247	0,342	0,96
	16	0,053	0,048	0,103	4,33
	17	0,019	0,018	0,028	17,43
UBC 811	1	0,245	0,166	0,320	1,06
	2	0,177	0,110	0,375	0,83
	3	0,355	0,213	0,399	0,75
	4	0,445	0,338	0,240	1,58
	5	0,391	0,245	0,374	0,84
	6	0,457	0,229	0,500	0,50
	7	0,246	0,179	0,271	1,35
	8	0,499	0,347	0,304	1,14
	9	0,161	0,132	0,182	2,25
	10	0,500	0,364	0,272	1,34
	11	0,392	0,268	0,316	1,08
	12	0,260	0,190	0,269	1,36
	13	0,484	0,381	0,212	1,86
	14	0,426	0,279	0,343	0,96
	15	0,288	0,186	0,354	0,91
	16	0,198	0,129	0,347	0,94
	17	0,057	0,052	0,097	4,65
Среднее		$0{,}323 \pm 0{,}021$	$0{,}207 \pm 0{,}010$	0,358	0,895

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

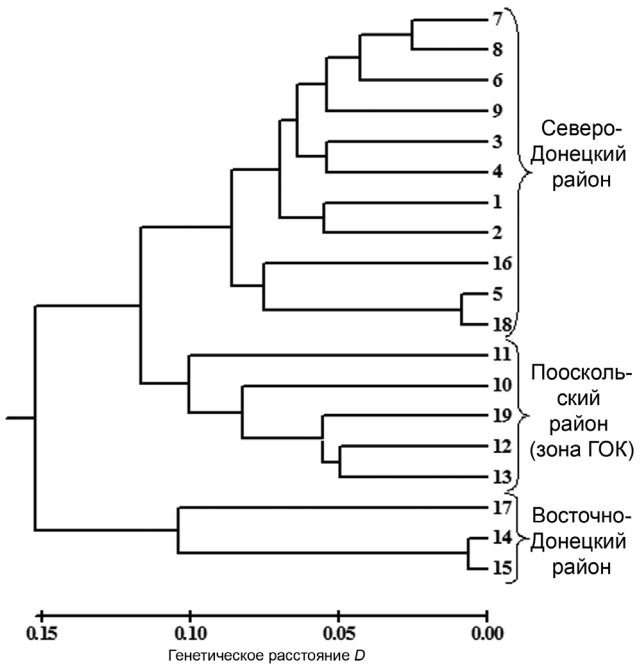

Рис. 4. Дендрограмма генетических расстояний по Неи (Nei, 1972) (UPGMA) между популяциями *H. striata* по ДНК-локусам

обеспечено более слабой дистанцией между группами по *ISSR*-маркерам.

Наиболее полиморфными среди *RAPD*-маркеров являются локусы 4, 6, 8 и 14, а среди *ISSR*-маркеров более изменчивыми оказались локусы 4, 8, 10 и 13. В группу более мономорфных локусов вошли: по праймеру *OPA 1* — локусы 1, 9, 16 и 17, а по праймеру *UBC 811* — локусы 2, 9 и 17. Причем, стоит отметить, что в среднем ожидаемая гетерозиготность по *RAPD* локусам ($H_t = 0{,}317 \pm 0{,}005$) достоверно не отличается от гетерозиготности по *ISSR* локусам ($H_t = 0{,}328 \pm 0{,}004$).

Известно также, что средние величины G_{st} соответствуют уровню генетической дифференциации при селективно-нейтральном процессе. В таком случае локусы с большими значениями G_{st} вероятнее всего могут испытывать действие дизруптивного отбора, а локусы с низкими показателями индекса подразделенности подвержены влиянию стабилизирующего отбора (Динамика популяционных генофондов..., 2004). Согласно полученным данным, наибольшая дифференциация между популяциями зафиксирована по локусам *OPA1-1, -5, -10, -11, -12* и *UBC 811-6*.

Кластерный анализ, результаты которого показаны на рисунке 4, продемонстрировал, что популяции *H. striata* в районе исследования расходятся по трем географически обособленным группам. Исключение составила лишь популяция их Луганской области (пункт 16), которая по соотношению частот аллелей оказалась ближе к популяциям из района истоков р. Северский Донец (пункты с 1 по 9 и 18).

Не исключено, что это является следствием либо генетического дрейфа в этой сильно изолированной популяции, либо ошибкой выборки. Стоит отметить также, что подобную картину дивергенции популяций по кластерам, с небольшими отклонениями, мы наблюдали по локусами аллозимов (Снегин 2012; Снегин, Сычев, 2011).

Данные кластеризации во многом подтверждаются графиком прямолинейной регрессии (рис. 5), который демонстрирует достоверную корреляцию между логарифмами географических расстояний *Dg* между группами и логарифмами попарных показателей уровня потока генов *Nm*, вычисленных через попарные индексы дифференциации Φ_{st} ($R_{DNA} = 0{,}571 \pm 0{,}052$, $t = 10{,}9$, $p < 0{,}05$)**. Аналогичная картина была получена нами ранее по аллозимам ($R_{ALL} = 0{,}552 \pm 0{,}053$ $t = 10{,}4$, $p < 0{,}05$). При этом нужно отметить, что эта зависимость достоверно выше, чем у фоновых видов *Br. fruticum* ($R_{ALL} = 0{,}059 \pm 0{,}063$; $R_{DNA} = 0{,}014 \pm 0{,}063$) и *Ch. tridens* ($R_{ALL} = 0{,}112 \pm 0{,}069$; $R_{DNA} = 0{,}085 \pm 0{,}069$).

Исходя из приведенных данных, можно утверждать, что популяционная структура *H. striata* в условиях юга Среднерусской возвышенности носит более упорядоченный характер и больше соответствует эффекту изоляции расстоянием (Wright, 1943). Это, вероятно, связано с особенностями биологии данного вида, приуроченного исключительно к сообществам меловых обнажений и обладающего ограниченными возможностями рас-

** Данную схему выявления эффекта изоляции расстоянием по селективно нейтральным генам между географически и исторически связанными популяциями предложил М. Слаткин (1993).

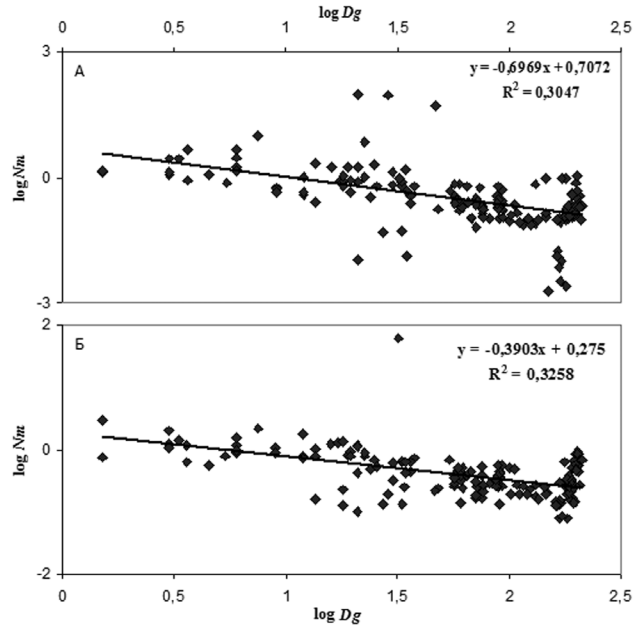

Рис. 5. Линейная регрессия логарифма потока генов *Nm* между парами популяций *H. striata* на логарифм географического расстояния между ними *Dg* (А — по аллозимам [20], Б — по ДНК-маркерам)

селения в условиях сильно фрагментированного ландшафта, что не позволяет ему сформировать метапопуляционную структуру, которая характерна для фоновых видов *Br. fruticum* и *Ch. tridens*. Кроме того, наличие эффекта изоляции расстоянием в популяционной структуре *H. striata* может свидетельствовать в пользу снижения роли стабилизирующего (балансирующего) отбора в популяциях данного вида по ряду селективно значимых локусов.

Генетическое сходство между популяциями внутри групп, особенно там, где наблюдается повышенная гомозиготность (в зоне ГОК или в степных биотопах), обеспечивается, вероятнее всего, не миграцией особей между популяциями, а тем, что в условиях изоляции в популяциях *H. striata* увеличивается частота гомозиготных комбинаций по одним и тем же аллелям, что было показано нами ранее на примере изоферментных маркеров (Снегин, 2012; Снегин, Сычев, 2011). Последнее, вероятно, обеспечивается сходными векторами естественного отбора в похожих условиях, а также дрейфом генов и процессами генетической революции в изолированных группах, когда селективную ценность получают гены, которые особенно жизнеспособны в гомозиготном состоянии (гены «солисты») и редки в открытых популяциях из-за доминирования в них так называемых «хорошо смешивающихся генов». (Майр, 1968).

Уравнение прямолинейной регрессии, основанное на коэффициентах линейной функции между попарными оценками потока генов и географического расстояния между популяциями, использовалось нами также для расчета эффективной численности:

$$\log Nm = a + b \cdot \log Dg$$

М. Слаткин (1993) показал, что эффективную численность популяции (для всех исследованных популяций в целом) можно получить как $Ne = 10^a$, где a — коэффициент, полученный в уравнении. Результаты вычислений приведены в таблице 6. Согласно полученным данным, достоверных отличий эффективной численности, вычисленной по изоферментам, у трех видов не выявлено. А в отношении эффективного размера групп, рассчитанных на основе ДНК-маркеров, достоверно низкие значения оказались у *Br. fruticum*.

Несколько иной результат был получен нами при вычислении эффективной численности с помощью интегральной модели основанной на значениях индекса подразделенности популяции (Wright, 1951):

$$Fst = \frac{1 - t_k}{1 + t_k},$$

где

$$t_k = \exp - \left\{ \left(\frac{1}{Ne} \right) \left[\ln(K - 0{,}5) + 0{,}5772 \right] + \right.$$

$$+ \left(\frac{1}{2 \cdot Ne^2} \right) \left[1{,}6449 - \frac{2}{2 \cdot K - 1} \right] +$$

$$\left. + \left(\frac{1}{3 \cdot Ne^3} \right) \left[1{,}202 - \frac{2}{(2 \cdot K - 1)^2} \right] \right\},$$

где K — количество использованных популяций.

Виду того, что для определения степени подразделенности популяций в данной работе нами вместо индекса F_{st} было задействовано два других интегральных и взаимозаменяемых показателя G_{st} и Φ_{st}, мы сочли возможным модифицировать указанную формулу, внося в нее поочередно значения этих индексов. Стоит отметить, что опыт подобных манипуляций был заимствован нами из работы по определению эффективной численности популяций *C. vindobonensis*, обитающих на территории г. Николаев (Крамаренко, Крамаренко, 2010).

Таблица 6

Значения эффективной численности, рассчитанные на основе коэффициентов линейной функции между попарными оценками потока генов (*Nm*) и географического расстояния между выборками

Виды	Изоферменты		ДНК-маркеры	
	Ne	Доверительный интервал (β = 0,95)	*Ne*	Доверительный интервал (β = 0,95)
B. fruticum	4,1	2,2–7,6	0,57	0,39–0,83
Ch. tridens	3,8	2,6–5,7	1,2	0,8–1,8
H. striata	5,1	2,6–10,0	1,9	1,3–2,7

Таблица 7

Значения эффективной численности в популяциях различных видов, вычисленные на основе индексов подразделенности (F_{st}, G_{st} и Φ_{st})

Показатель	*Br. fruticum* (K = 35)	*Ch. tridens* (K = 25)	*H. striata* (K = 19)
Ne (*Fst* по аллозимам)	9,2	10,5	4,9
Ne (*Φst* по аллозимам)	7,0	6,2	3,5
Ne (*Gst* по ДНК)	7,3	10,3	4,9
Ne (*Φst* по ДНК)	6,2	9,9	4,4
Среднее	7,4 ± 0,6	9,2 ± 1,0	4,4 ± 0,3

Результаты вычислений приведены в таблице 7. Среди видов моллюсков наибольший эффективный размер популяций имеет *Ch. tridens*, немного уступает ему *Br. fruticum*. В популяциях *H. striata* значения эффективной численности оказались достоверно ниже, чем у первых двух видов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, популяционная структура *H. striata* в районе исследования больше соответствует естественной, исторически сформировавшейся структуре[***]. Предположительно *H. striata* мог проникнуть на Среднерусскую возвышенность в эпоху суббореального периода голоцена. Современные популяции этого вида сохранили в себе тот аллельный потенциал, который был характерен для девственного лесостепного ландшафта. Поэтому генетические процессы в популяциях *H. striata*, в силу его стенотопности, вероятно могут являться лучшими показателями сукцессионных изменений происходящих в естественных сообществах, чем это можно ожидать, используя для этих целей эврибионтные фоновые виды, которые активно адаптируются к влиянию человека. Кроме того, существует опасение, что в условиях антропогенной инсуляризации, со все продолжающимся в настоящее время разрушением уникальных меловых биотопов, на фоне значительного снижения аллельного разнообразия, особенно в промышленных зонах, может произойти вымирание изолированных групп этого реликтового вида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях (2004). Под ред. Ю. П. Алтухова. М.: Наука.
2. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные (2004). Под ред. А. В. Присного. Белгород.
3. Крамаренко С. С., Крамаренко А. С. (2010) Аллозимный и RAPD полиморфизм наземных моллюсков *Brephulopsis cilindrica* (Enidae) в природных и урбанизированных местообитаниях юга Украины. Видовые популяции и сообщества в антропогенно трансформированных ландшафтах: состояние и методы его диагностики. Материалы XI международной научно-практической конференции. Белгород: ИПЦ Политерра, С. 210–211.
4. Майр Э. Зоологический вид и эволюция (1968). М.: Мир.
5. Николаев В. А. (1973) Наземные моллюски Среднерусской возвышенности. Дисс... канд. биол. наук. Орел, 240 с.
6. Снегин Э. А. (2002) Использование видов наземных моллюсков в качестве индикаторов реликтовых ценозов. Вестник Житомирского педагогического университета. Вып. 10: С. 128–129.
7. Снегин Э. А. (2010) 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.
8. Снегин Э. А. (2011 а) Генетическая структура популяций модельных видов наземных моллюсков в условиях урбанизированного ландшафта на примере *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata). кологическая генетика. 2011. Т. IX (2): С. 54–64.
9. Снегин Э. А. (2011 б) Анализ генетической изменчивости популяций наземного моллюска *Bradybaena fruticum* Müll. с использованием RAPD и ISSR маркеров. Научные ведомости БелГУ Сер. Естественные науки. № 15 (110). Вып. 16. С. 37–43.
10. Снегин Э. А. (2012) Пространственные и временные аспекты эколого-генетической структуры популяций беспозвоночных животных (на примере наземных моллюсков и насекомых юга Среднерусской возвы-

[***] Этого нельзя сказать о населении двух других фоновых видов наземных моллюсков *Br. fruticum* и *Ch. tridens*. В районе исследования так называемая метапопуляционная структура этих видов поддерживается главным образом за счет их эврибионтости и воздействия антропогенных факторов (антропохория и т. д.) (Снегин, 2012).

шенности): Дис... докт. биол. наук. Белгород: НИУ БелГУ, 394 с.
11. Снегин Э. А. (2013) Анализ генетической изменчивости популяций наземного моллюска *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) с использованием RAPD и ISSR маркеров. Экологическая генетика. Т. XI. № 3. С. 37–47.
12. Снегин Э. А., Сычев А. А. (2011) Оценка жизнеспособности популяций особо охраняемого вида *Helicopsis striata* Müller (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях юга Среднерусской возвышенности. Теоретическая и прикладная экология. № 2: С. 84–93.
13. Шилейко А. А. (1978) Наземные моллюски надсемейства Helicoidea. Фауна СССР. Моллюски. Л.: Наука. Т 3 (6): 384 с.
14. Ewens W. (1972) The sampling theory of selectively neutral alleles. Theor. Pop. Biol. N 3. P. 87–112.
15. 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.
16. Ložek V. (1980) Z červené knihy našich měkkýšů — suchomilka Helicopsis striata. Živa Academia Praha. V. 28 (6): P. 223.
17. Manly B. F. J. (1985) The Statistics of Natural Selection on Animal Populations. London: Chapman and Hall.
18. Nei M. (1972) Genetic distance between populations. The American Naturalist. V. 106 (949): P. 283–292.
19. Nei M. (1975) Molecular population genetics and evolution. Amsterdam.
20. Peakall R., Smouse P. E. (2001) GenAlEx V5: Genetic Analisis in Excel. Population genetic software for teaching and reseach. Australion National University, Canberra, Australia. http://www.anu.edu.au./BoZo/GenAlEx/.
21. Slatkin M. (1993) Isolation by distance in equilibrium and non — equilibrium populations. Evolution. V. 47 (1): P. 294–279.
22. Sparks B. W. (1953) The former occurrence of both *Helicella striata* (Müller) and *H. geyeri* (Soós) in England. Journal of Conchology. 1953. V. 23: P. 372–378.
23. Stępczak K. (1999) Aktualny stan występowania *Helicopsis striata* (O. F. Müller, 1774) w dolinie Odry (Mollusca: Gastropoda) w Polsce. Bad. Fizjogr. Pol. Zach. V. 46: P. 7–21.
24. 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.
25. Watterson G. (1978) The homozygosity test of neutrality. Genetics. V. 88: P. 405–417.
26. Welsh J., McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research. V. 18 (22): P. 7213–7219
27. Wright S. (1943) Isolation by distance. Genetics. Vol. 28: P. 114–138.
28. Wright S. (1951) The genetical structure of populations. Ann. Eugenics. 1951. N 15. P. 323–354.
29. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. V. 20 (2): P. 176–181.
30. Yeh F. C.; Yang R., Boyle T. J. et al. (2000) POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, Univ. of Alberta: Edmonton, Canada. http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html.

ASSESSMENT OF THE STATE POPULATION GENE POOL OF SPECIALLY PROTECTED SPECIES *HELICOPSIS STRIATA* (MOLLUSCA, GASTROPODA, PULMONATA) USING DNA-MARKERS

Snegin E. A.

❀ **SUMMARY:** With the use of *DNA*-markers (*RAPD* and *ISSR*) the gene pool of nineteen populations of specially protected relict species *Helicopsis striata* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) in Southern Mid-Russian Upland was studied. These results demonstrate a high degree of subdivision of populations ($\Phi st = 0{,}404$, $Gst = 0{,}358$) and increased levels of homozygosity in a number of groups that live in the industrial zone and the steppe habitats. The significant correlation between the level of gene flow and geographic distances between populations ($R = 0{,}571 \pm 0{,}052$) was found, this corresponds to isolation by distance model. The values of the effective number was calculated on the basis of index units. They were significantly lower than the effective number of not protected species of snail.

❀ **KEY WORDS:** terrestrial mollusks; population gene pool; anthropogenic landscape changes.

❀ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

1. Dinamika populyatsionnykh genofondov pri antropogennykh vozdeystviyakh [Population dynamics of gene pools in anthropogenic impacts]. (2004) Ed. Y. P. Altukhova. Moscow: Nauka.
2. Ewens W. (1972) The sampling theory of selectively neutral alleles. Theor. Pop. Biol. N 3. P. 87–112.
3. 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.
4. Krasnaya kniga Belgorodskoy oblasti [The Red book of the Belgorod region]. (2004) Ed A. V. Prisniy. Belgorod.

5. Kramarenko S. S., Kramarenko A. S. (2010) Allozimnyy i RAPD polimorfizm nazemnykh mollyuskov Brephulopsis cilindrica (Enidae) v prirodnykh i urbanizirovannykh mestoobitaniyakh yuga Ukrainy [Allozimes and RAPD polymorphism of land molluscs Brephulopsis cilindrica (Enidae) in the natural and urbanised habitats of the south of Ukraine]. Vidovye populyatsii i soobshchestva v antropogenno transformirovannykh landshaftakh: sostoyanie i metody ego diagnostiki [Populations of species and communities in the anthropogenically transformed landscapes: the state and methods of diagnosis]. Materials of the XI International scientific-practical conference. Belgorod: IPC Politerra, P. 210–211.
6. Ložek V. (1980) Z červené knihy našich měkkýšů — suchomilka Helicopsis striata. Živa Academia Praha. V. 28 (6). P. 223.
7. Manly B. F. J. (1985) The Statistics of Natural Selection on Animal Populations. London: Chapman and Hall.
8. Mayr E. (1968) Zoologicheskiy vid i evolucia [Animal species and evolution]. Moscow: Mir.
9. Nicolaev V. A. (1973) Nazemnye mollyuski Srednerusskoy vozvyshennosti [Terrestrial mollusks of Mid-Russian Upland]. Ph. D. thesis abstract. biol. sciences. Orel, 240 p.
10. Nei M. (1972) Genetic distance between populations. The American Naturalist. V. 106. N 949. P. 283–292.
11. Nei M. (1975) Molecular population genetics and evolution. Amsterdam.
12. Peakall R., Smouse P. E. (2001) GenAlEx V5: Genetic Analisis in Excel. Population genetic software for teaching and reseach. Australion National University, Canberra, Australia. http://www.anu.edu.au./BoZo/GenAlEx/.
13. Shileiko A. A. (1978) Nazemnie molluski podsemeistva Helicoidea [Terrestrial molluscs superfamily Helicoidea]. Fauna SSSR. Molluski [Fauna USSR. Molluscs]. New series. V. 3, Issue 6. 384 p.
14. Slatkin M. (1993) Isolation by distance in equilibrium and non — equilibrium populations. Evolution. V. 47 (1): P. 294–279.
15. Snegin E. A. Ispol'zovanie vidov nazemnykh mollyuskov v kachestve indikatorov reliktovykh tsenozov [The use of species of terrestrial molluscs as indicators relic cenoses]. Bulletin of the Zhitomir Pedagogical University. V. 10: P. 128–129.
16. Snegin E. A. (2011a) Assessment of the state of population gene pools of terestrial mollusks in conditions of influence of ore dressing combines from the example of Bradybaena fruticum Müll. (Gastropoda, Pullmonata). Russian J. of Genetics: Applied Research. V. 1. (5): P. 379–389.
17. Snegin E. A. (2011b) Analiz geneticheskoy izmenchivosti populyatsiy nazemnogo mollyuska Bradybaena fruticum Müll. s ispol'zovaniem RAPD i ISSR markerov [Analysis of genetic variability of populations of terrestrial mollusk Bradybaena fruticum Müll. using RAPD and ISSR markers]. BelSU Scientific Bulletin. Natural sciences. 15 number (110). V. 16: P. 37–43.
18. Snegin E. A. (2012) 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 J. of Genetics: Applied Research. V. 2 (2): P. 160–170.
19. Snegin E. A. (2012) Prostranstvennie i vremennie aspect eco-henetycheskoy strukturi bespozvonochnih populacii jivontnih (na primere nazemnih mollyuskov and nasekomih Yuga Srednerusskoy vozvishennosty) [Extensional and temporal aspects of ecological and genetic structure of populations of invertebrates (for example, land snails and insects south Mid-Russian Upland)]. Dr. thesis abstract. biol. sciences. Belgorod. 42 p.
20. Snegin E. A. (2014) Analysis of genetic variability in populations of a terrestrial snail Chondrula tridens Müll. (Gastropoda, Pulmonata), based on the RAPD and ISSR markers. Russian J. of Genetics: Applied Research. V. 4 (5): P. 444–454.
21. Snegin E. A., Sychev A. A. (2011) Otsenka zhiznesposobnosti populyatsiy osobo okhranyaemogo vida Helicopsis striata Müller (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) v usloviyakh yuga Srednerusskoy vozvyshennosti [Estimation of population viability specially protected species Helicopsis striata Müller (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) in Southern Mid-Russian Upland]. Theoretical and Applied Ecology. N 2. P. 84–93.
22. Stępczak K. (1999) Aktualny stan występowania Helicopsis striata (O. F. Müller, 1774) w dolinie Odry (Mollusca: Gastropoda) w Polsce. Bad. Fizjogr. Pol. Zach. V. 46: P. 7–21.
23. Sparks B. W. (1953) The former occurrence of both Helicella striata (Müller) and H. geyeri (Soós) in England. Journal of Conchology. 1953. V. 23: P. 372–378.
24. 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.
25. Watterson G. (1978) The homozygosity test of neutrality//Genetics. V. 88: P. 405–417.
26. Welsh J., McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research. V. 18 (22): P. 7213–7219.
27. Wright S. (1943) Isolation by distance. Genetics. V. 28: P. 114–138.
28. Wright S. (1951) The genetical structure of populations. Ann. Eugenics. 1951. N 15: P. 323–354.
29. Yeh F. C.; Yang R., Boyle T. J. et al. (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.

30. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. V. 20 (2): P. 176–181.

❀ Информация об авторе

Снегин Эдуард Анатольевич — д. б. н., доцент, заведующий кафедрой биоценологии и экологической генетики. ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». 308015, Белгород, ул. Победы, д. 85, корп. 14. E-mail: snegin@bsu.edu.ru.

Snegin Edward Anatoljevich — Dr. Biol. Sci., senior lecturer, head of department of biocenology and ecological genetics. Belgorod national research university. 308015, Belgorod, Pobedy St., 85, building 14, Russia. E-mail: snegin@bsu.edu.ru.