

© О.В. Бондарева¹,
М.И. Орлова¹, Н.И. Абрамсон^{1,2}

¹Зоологический институт РАН,
Санкт-Петербург;

²Научный центр РАН,
Санкт-Петербург

Приведены результаты анализа изменчивости фрагмента гена 1-й субъединицы цитохромс-сидазы (COI) древесной улитки *Arianta arbustorum* в Ленинградской области. Показано, что на изученной территории наблюдается крайне низкий уровень как гаплотипического, так и нуклеотидного разнообразия. Комплекс проведенных анализов говорит в пользу гипотезы инвазии по модели «плацдарма», когда небольшая группа основателей сначала заселяет определенный регион и лишь спустя некоторое время дает экспансивную вспышку размножения, сопровождающуюся быстрым расселением.

✿ **Ключевые слова:** инвазия; *Arianta arbustorum*; популяционная генетика; модели инвазии.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ДРЕВЕСНОЙ УЛИТКИ *ARIANTA ARBUSTORUM* L. В ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА ФРАГМЕНТА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА COI

ВВЕДЕНИЕ

В широком смысле инвазии представляют собой частный случай расширения ареала вида в результате квазиестественных перемещений и антропогенных изменений абиотических факторов окружающей среды, повлекших за собой соответствующие изменения ареала [1]. Таким образом, от естественных процессов изменения границ видовых ареалов и расселения видов, к примеру в результате климатических и ландшафтных перестроек плейстоцена, инвазии отличаются лишь масштабом времени происходящих процессов. Именно эта отличительная особенность инвазий и позволяет рассматривать их как «эксперименты, поставленные самой природой», которые предоставляют уникальную возможность наблюдать экологические и эволюционные процессы в реальном времени [24, 28]. В настоящее время многие виды успешно вселяются в новые места обитания, способствуя трансформациям сообществ-реципиентов, в том числе частично занимая экологические ниши аборигенных видов [23], несмотря на то что они теоретически должны быть менее приспособлены к условиям новой среды, чем автохтонные виды. Поскольку инвазии представляют собой быстрые эволюционные события, данные по демографической истории (эффективный размер популяции) и генетической структуре популяции — основателя инвазивного вида очень важны для ответа на один из ключевых вопросов биологии инвазий: что стоит за успешностью инвазивного чужеродного вида? Одна из загадок экологической генетики инвазий — так называемый «генетический парадокс»: каким образом новые популяции инвазивного вида преодолевают низкое генетическое разнообразие, связанное с «эффектом основателя», и вследствие этого низкий эволюционный потенциал? Ведь низкое генетическое разнообразие обычно связывают с риском вымирания, а не с успешным распространением и быстрой эволюцией за пределами естественного ареала, как это происходит с инвазивными видами. Небольшие популяции — основатели интродуцированных видов, казалось бы, должны отличаться более низкой генетической изменчивостью в сравнении с популяциями в естественном ареале в результате так называемого «эффекта основателя». Исходя из опыта природоохранных генетических исследований, следовало бы ожидать, что такие инвазивные популяции будут подвергаться высокому риску инбридинга и вымирания [27]. Генетический дрейф вместе с «эффектом основателя» также должны ограничить в таких популяциях и способность к адаптации.

Среди видов наземных экосистем один из примеров чрезвычайно успешной инвазии, происходящей в последние годы в Северо-Западном регионе России, — древесная улитка *Arianta arbustorum* (Linnæus, 1758). За первое десятилетие нынешнего века плотность поселения ариант в некоторых местах увеличилась до тысяч экземпляров на квадратный метр, они распространились практически по всей Ленинградской области.

Исторический ареал древесной улитки сравнительно невелик и занимает преимущественно Северо-Западную и Центральную Европу, Восточные Пиренеи, Южную Европу, не заходя на Пиренейский полуостров, очень распространена она в Альпах, Карпатах [5]. На севере Европы *A. arbustorum*, по данным открытых источников [30], распространена до широты 66° N (при-

Поступила в редакцию 30.12.2015
Принята к публикации 01.06.2016

брежные территории Южной Финляндии), тогда как восточная граница ареала указана как 27° Е. По данным Лихарева и Раммельмейера (1952), на северо-западе Европы вид встречен в Калининградской области, отдельные находки были сделаны в окрестностях Санкт-Петербурга, в Латвии и прибрежных районах Эстонии.

Массовые поселения *A. arbustorum* регистрируются на территории Ленинградской области и в Санкт-Петербурге по многочисленным персональным сообщениям со второй половины 2000-х гг. Имеются также сведения о ее недавнем и также массовом обнаружении в Псковской и Тверской областях [4]. Флуктуации численности данного вида по типу экспансии в Северо-Западной Европе отмечаются с периодичностью в 50–60 лет с 1856 г. [30]. Для Северо-Западной и Центральной России быстрая экспансия *A. arbustorum* зарегистрирована впервые. Данные о расселении этого вида и в Европе и за ее пределами документированы фрагментарно, молекулярных исследований с целью установления происхождения (источников) и путей инвазий на этом объекте не проводилось.

Задачи настоящей работы мы видим в исследовании генетической изменчивости инвазивных популяций древесной улитки в Ленинградской области и сравнении ее уровня с автохтонными популяциями из Западной Европы. Таким путем мы хотим выявить возможное географическое происхождение популяций, пути расселения и скрытые демографические параметры, а также наиболее вероятный сценарий инвазии. Для понимания успешности инвазии и вскрытия механизмов этого успеха необходимо в первую очередь выяснить, имеет ли место, и если есть, то каким образом преодолевается в данном случае «генетический парадокс». Данные по генетической изменчиво-

сти мы используем для тестирования следующих возможных сценариев: 1) имело место неоднократное расселение из разных источников с последующим перемешиванием, повышающее генетическое разнообразие; 2) инвазия идет постепенно по модели «с камешка на камешек» (step and stone), в этом случае мы будем наблюдать постепенное уменьшение генетического разнообразия по ходу расселения вследствие последовательных «эффектов основателя»; 3) инвазия протекает по сценарию «плацдарма» (bridgehead) — в таком случае мы ожидаем низкую генетическую изменчивость в инвазивной популяции, но с уникальной генетической структурой. Поскольку, как уже было подчеркнуто выше, инвазии являются частным примером расселения видов, мы воспользовались общепринятым арсеналом методов в рамках современного научного направления «филогеография», использующих по большей части в качестве молекулярного маркера митохондриальную ДНК животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов

Сбор образцов проводили в период с мая по октябрь 2014 г. Все образцы хранились в 96 % этаноле при температуре 20 °С. Оригинальная выборка составила 250 образцов из 7 точек сбора в Курортном районе г. Санкт-Петербурга и в Ленинградской области по обоим берегам восточной части Финского залива (рис. 1), максимальное расстояние между которыми составило 80 км. Для каждой из них было произведено выделение ДНК не менее чем из 8 образцов. Список образцов, географические координаты точек сбора, шифры проб в генетическом анализе и их номера в Genbank приведены в табл. 1. Помимо оригинального материала в работе ис-

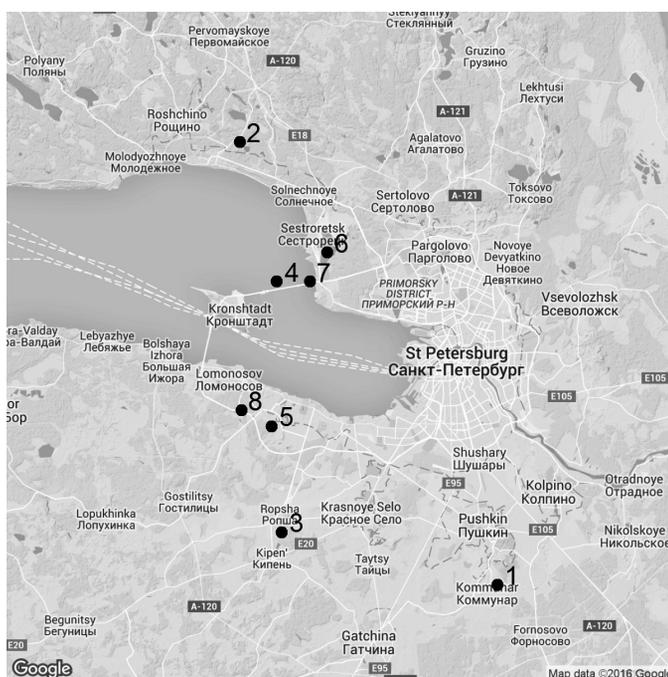


Рис. 1. Карта сбора проб для анализа. Точками отмечены места сбора. GPS-координаты точек указаны в таблице 1

Fig. 1. Map with sampling localities. For GPS coordinates see table 1

Таблица 1

Географические координаты мест сбора образцов, шифры проб в генетическом анализе и номера в Genbank
Coordinates of Localities, ciphers in genetic analyses and Genbank accession numbers

Точка сбора	Название образца	Локалитет	Координаты	Гаплотип	Номер Genbank
1	Aa1.1.1	Павловск	59.686039\30.430574	H4	KU127248
1	Aa1.1.2	Павловск	59.686039\30.430574	H2	KT031709
1	Aaa1.2.1	Павловск	59.686039\30.430574	H3	KT031710
1	Aa1.2.2	Павловск	59.686039\30.430574	H1	KT031711
1	Aa1.8.1	Павловск	59.686039\30.430574	H4	KT031712
1	Aa1.8.2	Павловск	59.686039\30.430574	H2	KT031713
2	Aa2.1	п. Ильичево, Выборгский район	60.26808\29.751591	H2	KT031714
2	Aa2.2	п. Ильичево, Выборгский район	60.26808\29.751591	H2	KT031715
2	Aaa2.3	п. Ильичево, Выборгский район	60.26808\29.751591	H1	KT031716
2	Aa2.4	п. Ильичево, Выборгский район	60.26808\29.751591	H2	KT031717
2	Aa2.6	п. Ильичево, Выборгский район	60.26808\29.751591	H2	KT031718
2	Aa2.7.1	п. Ильичево, Выборгский район	60.26808\29.751591	H3	KT031719
2	Aa2.7.2	п. Ильичево, Выборгский район	60.26808\29.751591	H1	KT031720
3	Aa3.1.1	п. Новая Ропша, Ломоносовский район	59.75563\29.861949	H3	KT031721
3	Aa3.1.2	п. Новая Ропша, Ломоносовский район	59.75563\29.861949	H1	KT031722
3	Aa3.2	п. Новая Ропша, Ломоносовский район	59.75563\29.861949	H1	KT031723
3	Aa3.3	п. Новая Ропша, Ломоносовский район	59.75563\29.861949	H1	KT031724
3	Aa3.4	п. Новая Ропша, Ломоносовский район	59.75563\29.861949	H1	KT031725
3	Aa3.5	п. Новая Ропша, Ломоносовский район	59.75563\29.861949	H1	KT031726
3	Aa3.6	п. Новая Ропша, Ломоносовский район	59.75563\29.861949	H1	KT031727
3	Aa3.7	п. Новая Ропша, Ломоносовский район	59.75563\29.861949	H1	KT031728
3	Aa3.8	п. Новая Ропша, Ломоносовский район	59.75563\29.861949	H2	KT031729
4	Aa4.1	Форт Тотлебен, Кронштадт	60.085909\29.849121	H1	KT031730
4	Aa4.2.1	Форт Тотлебен, Кронштадт	60.085909\29.849121	H3	KT031731
4	Aa4.2.2	Форт Тотлебен, Кронштадт	60.085909\29.849121	H1	KT031732
4	Aa4.3	Форт Тотлебен, Кронштадт	60.085909\29.849121	H1	KT031733
4	Aa4.4	Форт Тотлебен, Кронштадт	60.085909\29.849121	H2	KT031734
4	Aa4.7	Форт Тотлебен, Кронштадт	60.085909\29.849121	H2	KT031735
4	Aa4.8	Форт Тотлебен, Кронштадт	60.085909\29.849121	H2	KT031736
5	Aa5.2	Петергоф, парк Сергиевка	59.895563\29.835718	H1	KT031737
5	Aa5.3	Петергоф, парк Сергиевка	59.895563\29.835718	H1	KT031738
5	Aa5.4	Петергоф, парк Сергиевка	59.895563\29.835718	H1	KT031739
5	Aa5.5	Петергоф, парк Сергиевка	59.895563\29.835718	H1	KT031740
5	Aa5.6	Петергоф, парк Сергиевка	59.895563\29.835718	H1	KT031741
6	Aa6.1	Сестрорецк	60.123854\29.981339	H2	KT031742
6	Aa6.2	Сестрорецк	60.123854\29.981339	H1	KT031743
6	Aa6.3	Сестрорецк	60.123854\29.981339	H1	KT031744
6	Aa6.4	Сестрорецк	60.123854\29.981339	H1	KT031745
6	Aa6.6	Сестрорецк	60.123854\29.981339	H1	KT031746
6	Aa6.8	Сестрорецк	60.123854\29.981339	H1	KT031747
7	Aa7.1	Сестрорецк	60.085403\29.936276	H1	KT031748
7	Aa7.2	Сестрорецк	60.085403\29.936276	H2	KT031749
7	Aa7.3	Сестрорецк	60.085403\29.936276	H1	KT031750
7	Aa7.4	Сестрорецк	60.085403\29.936276	H1	KT031751
7	Aa7.5	Сестрорецк	60.085403\29.936276	H1	KT031752
7	Aa7.6	Сестрорецк	60.085403\29.936276	H1	KT031753
7	Aa7.7	Сестрорецк	60.085403\29.936276	H2	KT031754

пользовано 314 последовательностей *COI A. arbustorum* из Genbank.

Выделение ДНК, амплификация, секвенирование

ДНК выделяли из ножной мышцы улиток по стандартной методике СТАБ [11]. В качестве молекулярного маркера использовали традиционный в подобных исследованиях фрагмент митохондриального гена цитохромоксидазы I (*COI*). Амплификацию проводили с использованием универсальных праймеров, разработанных для получения фрагмента гена *COI* беспозвоночных животных [13], по следующей программе: 2 мин начальная денатурация при 94 °С, 35 циклов: 95 °С — 30 с, 54 °С — 30 с, 72 °С — 1 мин, окончательная элонгация — 10 мин при 72 °С. Все серии ПЦР включали в себя отрицательный контроль, который содержал все компоненты реакции за исключением пробы ДНК. Визуальный контроль продуктов амплификации проводили в 1,5 %-м агарозном геле.

Для подготовки образцов к секвенированию производили очистку с помощью раствора полиэтиленгликоля (PEG) 30/33 с последующим осаждением ДНК 70 % этанолом [3].

Автоматическое секвенирование проб проводили на секвенаторе ABI 3130 Avant с использованием ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 в компании «Бигль» (<http://www.biobeagle.com/>).

Филогенетический и популяционно-генетический анализы

Выравнивание последовательностей проводили при помощи модуля ClustalW [22] в программном пакете BioEdit 7.0 [17] с последующей проверкой и редактированием вручную. Максимальная выборка последовательностей, использованных в анализе *COI*, составила 361 образец (47 оригинальных последовательностей и 314 из Genbank) из 117 точек.

Для построения филогенетического дерева использовали последовательности 156 уникальных гаплотипов. Реконструкции филогении на основе метода максимального правдоподобия (ML) предвзяли определением оптимальной модели эволюции последовательности для каждой позиции кодона с помощью программы jModeltest 2.1.1 [9] с использованием информационных критериев Акаике (AIC) и Байеса (BIC). Частота замен и переходов определялась эмпирически. В качестве лучшей определена модель TRN3uf + I + G со значением $\gamma = 0,2830$. Филогенетический анализ проводили с учетом данной модели в программе PHYLIP. Поддержку клад оценивали с помощью бутстрэп — анализа на основе 500 псевдореплик. Взаимосвязь отдельных гаплотипов выявляли с использованием метода медианных сетей в программе NETWORK, v. 4.6.1.3. Расчет расстояний между гаплотипами проводили методом среднего присоединения (median joining). Для популяций, в которых количество

особей было более 5, рассчитывали следующие параметры генетической изменчивости: количество гаплотипов, количество переменных и информативных сайтов, гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие. Для проверки гипотезы отклонения наблюдаемой изменчивости ДНК от модели нейтральной эволюции использовали тесты F^* , D^* , D [14, 15, 29] в программе DNASP 5.10 [25]. Коэффициент D Таджики учитывает разницу между ожидаемой величиной средних значений различий между последовательностями в выборке и количеством переменных сайтов и наблюдаемой величиной. Отрицательные значения коэффициентов D Таджики указывают либо на недавний экспансивный рост популяции, либо на очищающий (purifying) отбор, снижающий изменчивость. Достоверные положительные значения могут указывать на недавнее прохождение популяцией через «горлышко бутылки», на резкое снижение численности или на балансирующий отбор по данному локусу в пользу конкретных гаплотипов. Статистические тесты D^* of F_u и L_i основаны на оценке разницы в количестве единичных замен и общем количестве замен (D^*), тогда как коэффициент F^* основан на различии между количеством единичных замен и средним значением попарных нуклеотидных различий между последовательностями. Так же как и в случае теста D Таджики, позитивные значения этих коэффициентов говорят либо о снижении численности популяции после эффекта «горлышка бутылки», либо о балансирующем отборе [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гаплотипическая и нуклеотидная изменчивость

Длина окончательного выравнивания из 361 последовательности, включающего исследованные образцы и образцы, депонированные в Genbank ранее, составила 350 п. н., из них 145 переменных сайтов и 113 информативных. Общий набор последовательностей в выравнивании содержит 156 уникальных гаплотипов.

В нашей выборке, включающей всех исследованных улиток по разным берегам Финского залива (выборка «Санкт-Петербург»), наблюдается крайне низкое нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие (табл. 2). Низкие показатели гаплотипического разнообразия наблюдаются также и в выборке из Италии, но, в отличие от выборки «Санкт-Петербург», она характеризуется высоким нуклеотидным разнообразием. У всех исследованных популяций в Австрии наблюдается крайне высокое нуклеотидное разнообразие, для сравнения: на площади в 5 км² в Альпах было обнаружено 119 гаплотипов [16], в то время как в нашем исследовании на площади почти в 100 км² — только 4. Следовательно, для популяции из окрестностей Санкт-Петербурга характерен аномально низкий уровень генетической изменчивости. Следует также подчеркнуть, что гаплотипы, обнаружен-

Таблица 2

Показатели гаплотипической, нуклеотидной изменчивости и коэффициенты тестов на нейтральность в различных популяциях Европы

Haplotype, nucleotide diversity and neutrality tests results in European populations

Страна	Название популяции	Количество образцов	S	h	Hd	Pi	D*	F*	D
Австрия	Burgenland	6	29	5	0,933	0,06400	0,34952 ($p > 0,10$)	0,33575 ($p > 0,10$)	0,14694 ($p > 0,10$)
Австрия	Kummer	7	44	5	0,905	0,07891	0,79964 ($p > 0,10$)	0,76936 ($p > 0,10$)	0,33269 ($p > 0,10$)
Австрия	Oberösterreich	32	62	14	0,875	0,07031	-0,13077 ($p > 0,10$)	-0,03725 ($p > 0,10$)	0,16293 ($p > 0,10$)
Австрия	Rotkogelsattel	18	34	12	0,935	0,03582	0,20382 ($p > 0,10$)	0,02578 ($p > 0,10$)	-0,41821 ($p > 0,10$)
Австрия	Salzburg	23	73	11	0,905	0,07817	1,32116 ($0,10 > p > 0,05$)	1,22564 ($p > 0,10$)	0,43755 ($p > 0,10$)
Австрия	Steiermark	162	77	104	0,9695	0,05225	-2,69398 ($p < 0,05$)	-2,24155 ($0,10 > p > 0,05$)	-0,91889 ($p > 0,10$)
Германия	Bayern	12	39	5	0,667	0,03619	1,20821 ($p > 0,10$)	0,86439 ($p > 0,10$)	-0,50428 ($p > 0,10$)
Италия	Bolzano	15	5	3	0,257	0,00879	-2,88592 ($p < 0,02$)	-3,08333 ($p < 0,02$)	-2,15604 ($p < 0,01$)
Нидерланды	Zuid-Holland	14	37	5	0,791	0,05234	1,50554 ($p < 0,02$)	1,98200 ($p < 0,02$)	2,31341 ($p < 0,05$)
Россия	Санкт-Петербург	47	2	4	0,572	0,00192	1,17948 ($p > 0,10$)	1,70832 ($p < 0,05$)	2,06731 ($p < 0,05$)

S — количество информативных сайтов, h — количество гаплотипов, Hd — гаплотипическое разнообразие, Pi — нуклеотидное разнообразие, D*, F*, D — тесты на нейтральность

ные в районе Санкт-Петербурга, уникальны и в Западной Европе, по имеющимся на данный момент в Genbank данным, не встречаются. Это свидетельствует, скорее, в пользу модели инвазии по «эффекту плацдарма». Как правило, между периодом колонизации и экспансии наблюдается временная задержка, в течение которой инвазивные популяции вырабатывают определенные механизмы адаптации к новой среде, происходит так называемый «эволюционный сдвиг» (adaptive shift). Несмотря на то что концепция «плацдарма» достаточно новая в биологии инвазий, это потенциально очень широко распространенный феномен. Выявление таких популяций-плацдармов имеет большое практическое значение. При сценарии «плацдарма» «эволюционный сдвиг» происходит в одной популяции, когда источником инвазии является одна небольшая наиболее успешная популяция, которая довольно долго присутствовала в регионе [10]. Уникальные гаплотипы улиток из Ленинградской области как раз свидетельствуют о том, что они достаточно давно появились на данной территории, так что мутации смогли накопиться и зафиксироваться, но эффективная численность популяции все время была очень низкой и только в последнее время произошел экспансивный рост численности. О последнем свидетельствует очень низкое гаплотипическое и нуклеотид-

ное разнообразие. В пользу такой модели говорят также и имеющиеся литературные данные, и наблюдения. Единичные находки этого вида отмечались в окрестностях Ленинграда в начале прошлого века, а также на островах и в прибрежных районах Эстонии, одна находка известна в Латвии [2], но экспансия этого вида на восток и на север Ленинградской области и в Карелию отмечена в самом конце XX в. и продолжается в настоящее время.

Со сценарием инвазии по модели «плацдарма» хорошо согласуются и данные тестов на отклонение от модели нейтральности. Все коэффициенты тестов (табл. 2) для интересующей нас популяции из Ленинградской области имеют позитивные значения. Как правило, положительные коэффициенты теста Таджиджи (D) принято трактовать в пользу либо балансирующего отбора, либо внезапного резкого сокращения численности («горлышко бутылки»). Другие тесты на нейтральность F_s , F^* также показали не противоречащие тесту Таджиджи положительные значения на пороге достоверности (см. табл. 2). Существенный недостаток этих тестов в том, что статистически нет критериев, позволяющих различить эффект отбора от демографических процессов при анализе только одного локуса. В нашем случае все имеющиеся наблю-

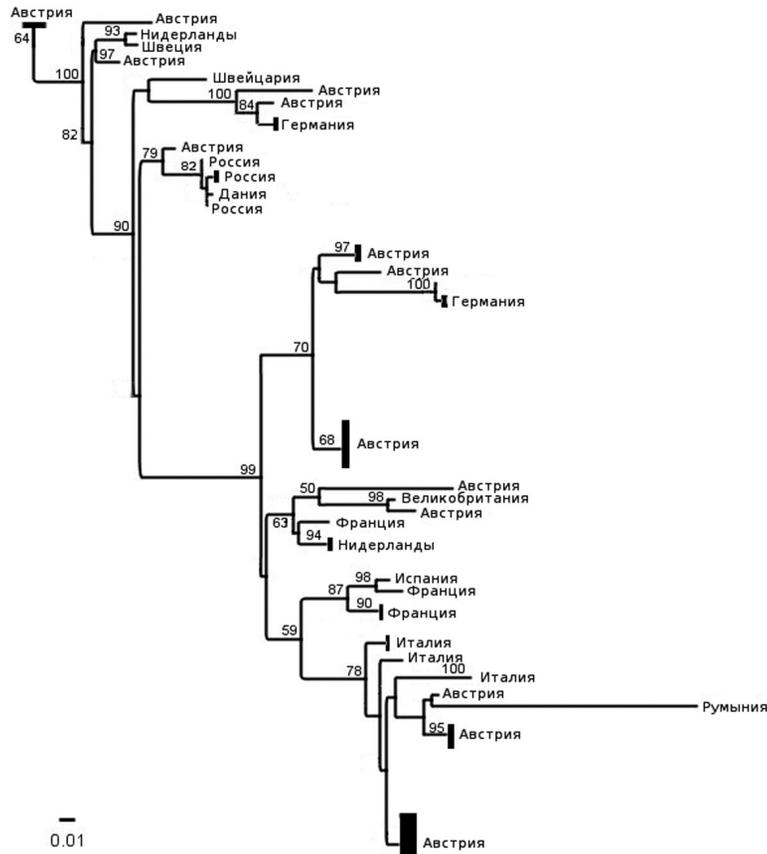


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по данным последовательностей *COI* по алгоритму максимального правдоподобия. Ширина прямоугольника соответствует количеству последовательностей в данной точке сбора. Для упрощения восприятия на дереве в качестве названий точек сбора указана только страна происхождения материала. Указана бутстреп-поддержка со значением больше 50

Fig. 2. Maximum likelihood phylogenetic tree based on *COI* dataset. The width of the rectangle corresponds to the number of sequences in locality, that given as country name. Parsimony bootstrap frequencies that are greater than 50% are labelled on the tree

дения не поддерживают гипотезу резкого сокращения численности («горлышко бутылки»), а скорее говорят об обратном, в пользу экспансивного роста от небольшого числа основателей. Однако, согласно теоретическим расчетам, в случае экспансивного роста при условии нейтральной модели следует ожидать отрицательных значений тестов вследствие избытка редких гаплотипов [14, 15, 29]. Достоверные отрицательные значения тестов на нейтральность характерны для популяции из Австрии, что однозначно указывает на экспансивный рост популяции, в пользу такого объяснения свидетельствует и четко выраженная звездчатая структура медианной сети для этой популяции (рис. 3). Таким образом, несмотря на предварительный характер наших результатов и необходимость дальнейшего тестирования по другим локусам, они косвенно могут свидетельствовать в пользу адаптивного сдвига. Характер медианной сети гаплотипов (см. рис. 3) также скорее свидетельствует в пользу балансирующего от-

бора. Все вышеизложенные факты хорошо согласуются со сценарием инвазии по типу «плацдарма».

Филогенетический анализ

На дереве (рис. 2) выявляется 9 крупных клад, каждая из которых далее делится на более мелкие кластеры. Большая часть клад имеет статистическую поддержку (бутстреп-значения больше 65). В большинстве из них присутствуют гаплотипы из Австрии, что, с одной стороны, свидетельствует об очень сильном генетическом полиморфизме популяций в Австрии, с другой — о недостаточной изученности материала в остальных странах, из которых в Genbank представлены лишь единичные последовательности. Последовательности образцов из России образуют одну общую кладу, в которую также попадает и гаплотип из Дании. Достаточно близок к этой группе один из австрийских гаплотипов. Совместная кладка России, Дании и Австрии на филогенетическом дереве может косвенно

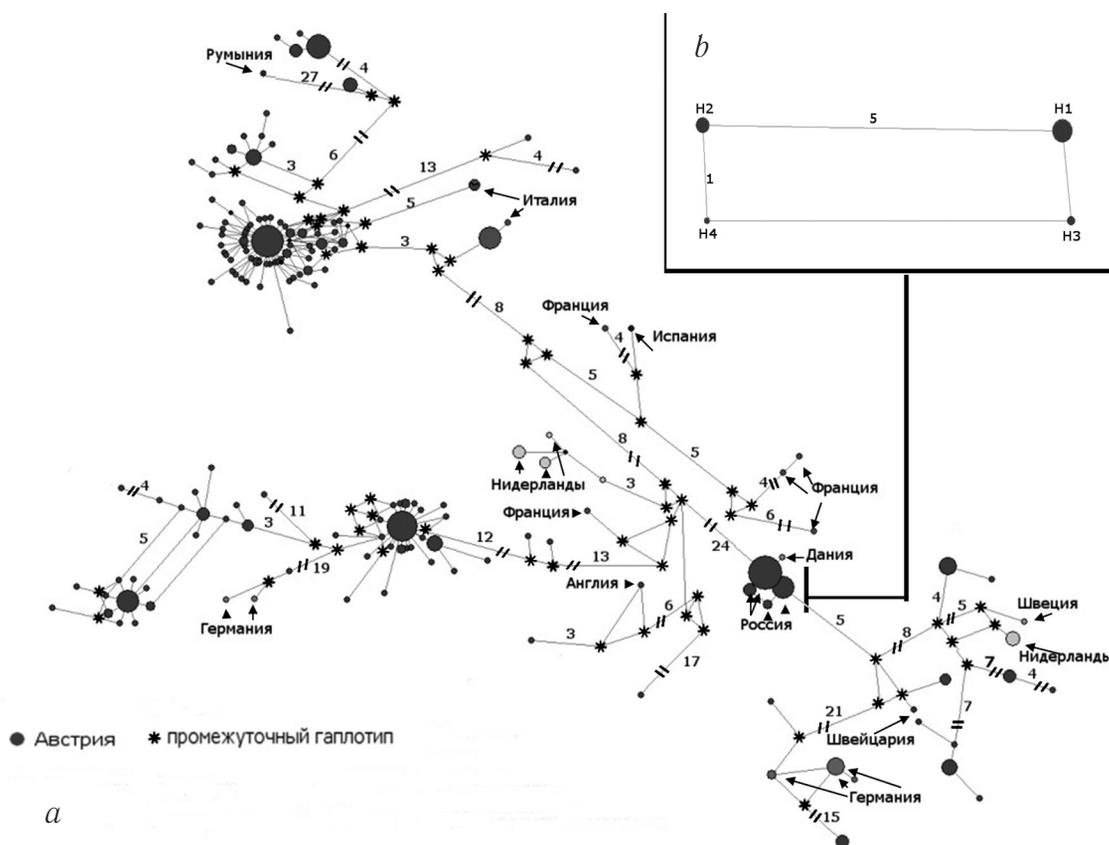


Рис. 3. (а) Сеть гаплотипов, построенная по собранным образцам с учетом материала, имеющегося в Genbank. Цифрами обозначено количество замен между гаплотипами. Площадь круга соответствует количеству идентичных гаплотипов. Все источники происхождения образцов (страны), кроме Австрии, подписаны (b). Рисунок сети, построенный по собранным образцам в Ленинградской области. Цифрами обозначено количество замен между гаплотипами. Площадь круга соответствует количеству идентичных гаплотипов

Fig. 3. (a) Median-joining haplotype network of *COI* mitochondrial sequences of *A. arbustorum*. The numbers indicate the number of mutational steps between haplotypes. The size of the circles is proportional to the number of individuals with that haplotype. Name represent the geographical region of sampled specimens with exception of Austria (b). Median-joining haplotype network of *COI* mitochondrial sequences of *A. arbustorum* from Leningrad region. The numbers indicate the number of mutational steps between haplotypes. The size of the circles is proportional to the number of individuals with that haplotype

указывать на возможный путь заселения улиткой России с помощью водного транспорта через Данию. Прояснить эти вопросы помогут более подробные исследования, включая сбор и дальнейший анализ образцов из Дании и Прибалтики для уточнения путей и источников инвазии.

Анализ сети гаплотипов

На медианной сети (рис. 3, а), в отличие от филогенетического дерева, можно проследить взаиморасположение и количественное распределение гаплотипов. В этот анализ включен весь набор последовательностей (361). В Австрии можно выделить по меньшей мере три крупные самостоятельные группы гаплотипов, генетически сильно различающиеся (более 40 нуклеотидных замен), в состав каждой из которых входит несколько популяций. Две из этих групп имеют четкую звездообразную структуру. Образцы из Германии, входящие в состав одной по-

пуляции, оказываются в значительной степени удалены друг от друга на медианной сети. Ту же самую картину мы наблюдаем и для образцов из Франции и Нидерландов.

Уже отмеченное крайне низкое генетическое разнообразие выборки из России подтверждается и графически, на сети она образует единую плотную группу. Рядом с этой группой располагается только гаплотип из Дании, а все остальные образцы находятся на значительном расстоянии, наглядно демонстрируя, что гаплотипы, обнаруженные в Ленинградской области, уникальны.

Отдельно проанализировав выборку из России и построив сеть только для них (рис. 3, b), мы выявили разбиение четырех гаплотипов на две группы: H2 и H4, H1 и H3. Различие внутри групп при этом составляет одну нуклеотидную замену. Такой паттерн сети, так же как и тесты на нейтральность, говорит о балансирующем отборе.

Одним из основных результатов молекулярно-генетических исследований источников и путей инвазии на примерах целого ряда видов стало понимание того, что множественные интродукции — самое обычное явление, и это в какой-то мере объясняет, каким образом популяции инвазивного чужеродного вида преодолевают описанный «генетический парадокс». В итоге такие инвазивные популяции по уровню генетической изменчивости могут оказаться сравнимыми или даже превышать таковой в исходных популяциях (подобные факты описаны для целого ряда видов растений и животных [7, 8, 18, 20, 21, 26]). Подобные исследования, проведенные на 29 инвазивных наземных и водных животных, показали, что в интродуцированных популяциях сохраняется и поддерживается в среднем до 80 % от генетической изменчивости, наблюдаемой в исходных условиях [6]. В случае древесной улитки, однако, феномен «генетического парадокса» проявляется очень явно. В то же время, как было показано, даже в случае сильного «бутылочного горлышка», инвазии могут приводить к быстрым адаптивным изменениям [12, 19], примиряя наблюдаемую низкую генетическую изменчивость с феноменом высокой численности инвазивной популяции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-15-29-02526 офи-М; плановой темы 01201376804 и проекта 2011-022-SE 511 (TOPCONS) программы соседства Юго-Восточной Финляндии и Российской Федерации (ENPI CBC 2007-2013).

ЛИТЕРАТУРА

- Алимов А., Богуцкая Н. Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. — 436 с. [Alimov A, Boguckaja N. Biologicheskie invazii v vodnyh i nazemnyh jekosistemah. M.: Tovarithshhestvo nauchnyh izdanij KMK; 2004. 436 p. (In Russ.)]
- Лихарев И.М., Раммельмейер Е.С. Наземные моллюски фауны СССР. (Определители по фауне СССР, издаваемые Зоологическим институтом Академии наук СССР; т. 43). М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1952. — 511 с. [Liharev IM, Rammel'mejer ES. Nazemnye molljuskij fauny SSSR. (Opredeliteli po faune SSSR, izdavaemye Zoologicheskim institutom Akademii nauk SSSR; t. 43). Moscow; Leningrad: Izd-vo AN SSSR; 1952. 511 p. (In Russ.)]
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. — М.: Мир, 1984. — 478 с. [Maniatis T, Frich J, Sjembruk G. Molekuljarnoe klonirovanie. Metody geneticheskij inzhenerii. Moscow: Mir, 1984. 478 p. (In Russ.)]
- Шиков Е.В. *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1785) (Mollusca, Gastropoda) — агрессивный вселенец на русскую равнину: Материалы Международной научной конференции, посвященной 95-летию каф. ботаники Тверского государственного университета. — Тверь, 2012. — С. 380–381. [Shikov EV. *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1785) (Mollusca, Gastropoda) — agressivnyj vselenec na russkiju ravninu. Materialy Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii, posvjashhennoj 95-letiju kaf. Botaniki Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Tver', 2012. P. 380-381. (In Russ.)]
- Шилейко А.А. Наземные моллюски надсемейства *Helicoidea*. Фауна СССР. Моллюски. Т. 3(6). — М.: Наука, 1978. — 384 с. [Shilejko AA. Nazemnye molljuskij nadsemejstva *Helicoidea*. Fauna SSSR. Molljuskij. Vol. 3(6). Moscow: Nauka, 1978. 384 p. (In Russ.)]
- Amsellem L, Noyer JL, Le Bourgeois T, Hossaert-McKey M. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Mol Ecol*. 2000;9:443-455.
- Ciosi M, Miller NJ, Kim KS, et al. Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Mol Ecol*. 2008;17:3614-3627.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, et al. Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*. 2008;24:2713-2719.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 2012;9(8):772.
- Dlugosch KM, Parker IM. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol Ecol*. 2008;17:431-449.
- Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;19:11-15.
- Estoup A, Guillemaud T. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Mol Ecol*. 2010;19:4113-4130.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994;3:294-299.
- Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997;147:915-925.
- Fu YX, Li WH. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 1993;133:693-709.
- Haase M, Misof B. Dynamic gastropods: Stable shell polymorphism despite gene flow in the land snail *Arianta arbustorum*. *J of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2009;47:105-114.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Win-

- dows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;41:95-98.
18. Kang M, Buckley YM, Lowe AJ. Testing the role of genetic factors across multiple independent invasions of the shrub Scotch broom (*Cytisus scoparius*). *Mol Ecol*. 2007;16:4662-4673
 19. Keller SR, Taylor DR. History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecol Lett*. 2008;11:852-866.
 20. Kelly DW, Muirhead JR, Heath DD, Macisaac HJ. Contrasting patterns in genetic diversity following multiple invasions of fresh and brackish waters. *Mol Ecol*. 2006;15:3641-3653.
 21. Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LRG, Lara AC, Larson A, Losos JB. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*. 2004;431:177-181.
 22. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947-2948.
 23. Lawson Handley LJ, Estoup A, Evans DM, et al. Ecological genetics of invasive alien species. *BioControl*. 2011;56:409-428.
 24. Lee CE. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecol Evol*. 2002;17:386-391.
 25. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25:1451-1452.
 26. Miller N, Estoup A, Toepfer S, et al. Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science*. 2005;310: 992.
 27. Reznick DN, Ghalambor CK. The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the maggot *Rhagoletis pomonella*. *Nature*. 2001; 407:739-742.
 28. Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, et al. Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends Ecol Evol*. 2007;22:465-471.
 29. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123:585-595.
 30. Terhivuo J. Growth, reproduction and hibernation of *Arianta arbustorum* (L.) (Gastropoda, Helicidae) in southern Finland. *Ann Zool Fennici*. 1978;15:8-16.

THE GENETIC VARIATION IN PULMONATE MOLLUSK (*ARIANTA ARBUSTORUM* L.) IN LENINGRAD REGION

O.V. Bondareva, M.I. Orlova, N.I. Abramson

For citation: *Ecological genetics*. 2016;14(2):19-27

☉ **SUMMARY: Background.** One of the most mysterious phenomenon related to biological invasions is the so-called “genetic paradox”. It is supposed that invasive species population starts from a small number of individuals and thus should possess low genetic variation, and then what mechanisms provide it successive distribution instead of lower survivorship in front of native species is not clear. It has been shown that there are several scenarios of invasion that may help to overcome this paradox. Here, we investigate genetic variation within and between the invasive populations of land snail in Leningrad region aimed to test the various probable invasion scenarios. **Materials and methods.** Samples were collected in Leningrad region in May-October 2014 at both shores of the Gulf of Finland with maximal distance between the sites in 80 km and stored in 96% ethanol. As a molecular marker to study genetic variation a sequence of DNA fragment of mitochondrial cytochrome oxidase I was used. **Results.** We revealed abnormally low haplotype and nucleotide diversity in the snail populations under study. Therewith four haplotypes uncovered among 47 specimens from the territory of approximately 100 km² were unique for Leningrad area. Phylogenetic analysis showed one sample from Denmark in the same cluster with samples from Leningrad region. This indirectly point on colonization route from Central Europe through Denmark, but this assumption should be confirmed by enlarge sampling. **Conclusions.** The data obtained suggest the ‘bridgehead’ model of the land snail invasion in Leningrad region. In favor of this evidence that all haplotypes recovered in Leningrad area were unique, differing from the closest haplotype from Denmark by several mutations. This fact together with extremely low haplotype and nucleotide diversity most likely points that snails first accumulated at a small territory during a rather long period. Neutrality test are in accordance with balancing selection.

☉ **KEYWORDS:** invasions; *Arianta arbustorum*; genetic of populations; models of invasion.

☉ Информация об авторах

Ольга Васильевна Бондарева — стажер, лаборатория молекулярной систематики. ЗИН РАН. E-mail: olga.v.bondareva@gmail.com.

Марина Ивановна Орлова — д-р биол. наук, вед. научн. сотр., лаборатория пресноводной и экспериментальной гидробиологии. ЗИН РАН. E-mail: marina.orlova2012@gmail.com.

Наталья Иосифовна Абрамсон — канд. биол. наук, зав. лаборатории молекулярной систематики. ЗИН РАН; вед. научн. сотр. научного центра РАН, ИЦ РАН. E-mail: natalia_abr@mail.ru.

☉ Information about the authors

Olga V. Bondareva — Trainee, Laboratory of molecular systematic. ZIN RAS. E-mail: olga.v.bondareva@gmail.com.

Marina I. Orlova — Sc.D., Leading Researcher, Laboratory of Freshwater and Experimental Hydrobiology. ZIN RAS. E-mail: marina.orlova2012@gmail.com.

Natalja I. Abramson — Ph.d., head, Laboratory of molecular systematic. ZIN RAS. Leading researcher, St Petersburg Scientific Center RAS. E-mail: natalia_abr@mail.ru.