

© А.А. Сычев, Э.А. Снегин

Белгородский национальный
исследовательский университет

Выявлена микропространственная дифференциация популяционных генофондов наземного моллюска *Helicopsis striata* (Müller, 1774) в разнообразных условиях юга Среднерусской возвышенности, что вызвано фрагментарностью местообитаний и различиями в интенсивности потока генов между демами. При этом пространственная дифференциация *H. striata*, вследствие особенностей его биологии, оказалась самой высокой среди других наземных моллюсков района исследования. Показано, что самыми уязвимыми можно считать популяции с низкой изменчивостью и слабой дифференциацией генофонда. Также особо отмечается методологическая важность анализа внутривидовой структуры видов в работах по оценке состояния популяционных генофондов, поскольку единичные выборки из отдельных демов не могут показывать истинный характер генетической структуры популяций.

✿ **Ключевые слова:** наземный моллюск; *Helicopsis striata*; микропространственная генетическая структура; Среднерусская возвышенность.

МИКРОПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИОННЫХ ГЕНОФОНДОВ НАЗЕМНОГО МОЛЛЮСКА *HELICOPSIS STRIATA* (PULMONATA, HYGROMIIDAE) В УСЛОВИЯХ ЮГА СРЕДНЕРУССКОЙ ВОЗВЫШЕННОСТИ

ВВЕДЕНИЕ

Пространственная генетическая дифференциация является важным маркером состояния природных популяций в изменчивых условиях среды [21]. Так, с увеличением биотопического разнообразия в популяции формируются устойчивые в пространстве и времени внутривидовые группировки (демы, или субпопуляции), каждая из которых адаптируется к локальным условиям [3, 4, 14]. Это значительно увеличивает жизнеспособность популяции и способствует ее дальнейшему выживанию. При этом ключевым моментом в формировании структуры можно считать появление генетической обособленности демов, что является прямым следствием нарушения панмиксии и приводит к временной стабилизации внутривидовой структуры.

Высокоагрегированный тип пространственной структуры и низкая миграционная активность делают наземных моллюсков хорошими модельными объектами при исследовании внутривидовой структурированности [6]. В настоящее время известны исследования микропространственной генетической структуры на примере таких моллюсков, как *Trochoidea geyeri* (Soos, 1926) по RAPD-маркерам [23], *Pomatias elegans* (Müller, 1774) по изоферментам [22], *Helix aspersa* (Müller, 1774) по изоферментам и микросателлитам [16, 17, 24], *Brephulopsis bidens* (Krynicky, 1883) по изменчивости конхиологических признаков [5, 19] и др. Тем не менее многие вопросы генетической структурированности популяций наземных моллюсков остаются открытыми. В частности, одним из наиболее актуальных направлений является оценка дифференциации популяционных генофондов редких и уязвимых видов моллюсков, которая может стать важной частью работ по сохранению и восстановлению их популяций. В этом отношении особого внимания заслуживают популяции ксерофильного моллюска *Helicopsis striata*, обитающего в условиях пересеченного ландшафта юга Среднерусской возвышенности и охраняемого на территории Белгородской области России [13].

Цель исследования: провести анализ микропространственной дифференциации генетической структуры популяций *H. striata*, обитающих в гетерогенных условиях юга Среднерусской возвышенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование внутривидовой дифференциации генофонда *H. striata* проводили в осенние периоды 2011 и 2012 гг. Для этого на территории юга Среднерусской возвышенности было выбрано шесть модельных популяций (рис. 1), приуроченных к биотопам с разными ландшафтно-климатическими условиями (табл. 1).

В каждой популяции *H. striata* на равном удалении через 150–200 м было заложено по пять экспериментальных площадок площадью 25 м² каждая, в пределах которых осуществляли сбор особей. В связи с относительно большим расстоянием между точками сбора полагали, что каждая площадка соответствует отдельному дему. Таким образом, было исследовано 30 демов из 6 популяций *H. striata*.

Поступила в редакцию 25.03.2016
Принята к публикации 07.06.2016

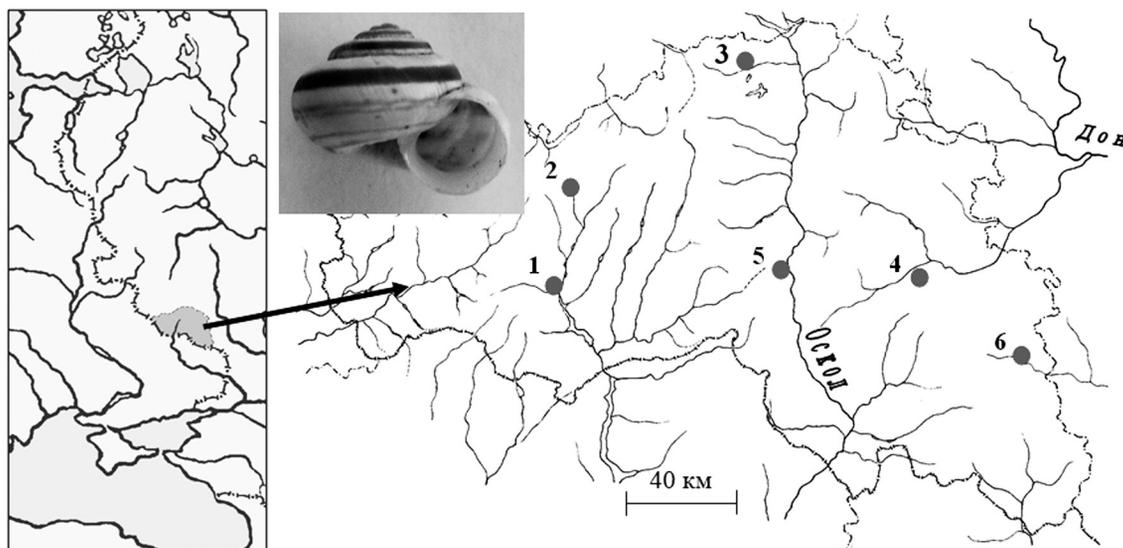


Рис. 1. Расположение исследуемых популяций *H. striata* на территории юга Среднерусской возвышенности: 1 — «Белая гора»; 2 — «Беленихино»; 3 — «Губкин»; 4 — «Засосна»; 5 — «Верхние Лубянки»; 6 — «Осадчее»

Fig. 1. The location of the studied *H. striata* populations in the South of Mid-Russian Upland: 1 — “White mountain”; 2 — “Belenihino”; 3 — “Gubkin”; 4 — “Zasosna”; 5 — “High Lubjanki”; 6 — “Osadche”

Таблица 1

Описание пунктов сбора *H. striata*
Description of *H. striata* collection sites

Популяция	Координаты	Описание
«Белая гора»	50°37'29,65"С 36°37'09,64"В	Популяция изолированного типа (колония), расположена на крутом северо-западном берегу р. Северский Донец лесостепной зоны. Ландшафт сильно фрагментирован в результате естественных и антропогенных процессов. Характерны кальцефитные и сухие луга. Различия между участками выражены
«Беленихино»	50°54'48,11"С 36°38'34,49"В	Колония, расположена на крутом восточном берегу р. Саженский Донец лесостепной зоны. Ландшафт сильно фрагментирован оврагами. Распространены сухие луга и степи с кальцефитными элементами и представителями флоры «сниженные Альпы». Различия между участками выражены
«Губкин»	51°17'40,59"С 37°32'24,21"В	Популяция полуизолированного типа, расположена на восточном берегу р. Великий Колодезь (Верхнее Поосколье) лесостепной зоны. Ландшафт фрагментирован в результате хозяйственной деятельности. Распространены ковыльные степи с кальцефитными элементами и представителями флоры «сниженные Альпы». Различия между участками выражены
«Засосна»	50°37'48,29"С 38°25'21,31"В	Популяция полуизолированного типа, расположена на выположенном и испещренном эрозионными промоинами северном берегу р. Тихая Сосна степной зоны. Характерны ковыльные степи и сухие луга с кальцефитами и представителями «сниженных Альп». Различия между участками незначительны
«Верхние Лубянки»	50°27'44,49"С 37°43'59,22"В	Колония, расположена на крутом восточном склоне балки правого берега р. Оскол (Среднее Поосколье) степной зоны. Ландшафт фрагментирован оврагами. Распространены ковыльные степи и сухие луга с кальцефитными элементами и представителями флоры «сниженные Альпы». Различия между участками выражены
«Осадчее»	50°21'04,30"С 38°56'43,52"В	Популяция полуизолированного типа, расположена на выположенном северо-восточном берегу р. Черная Калитва степной зоны. Распространены ковыльные степи с элементами «сниженных Альп». Различия между участками отсутствуют

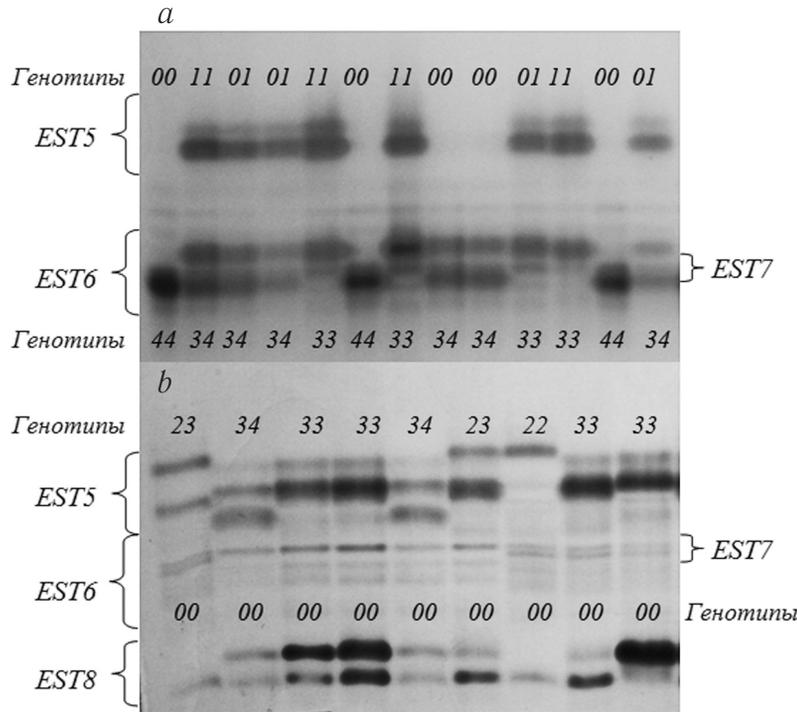


Рис. 2. Электрофореграммы, демонстрирующие наличие θ -аллелей в локусе *EST5* (a) популяции «Засосна» и локусе *EST6* популяции «Белая гора» (b). Указаны генотипы особей по этим локусам

Fig. 2. Elektroforegramm demonstrating the presence of θ -alleles at the locus *EST5* (a) population “Zasosna” and the locus *EST6* population “White mountain” (b). Indicate the genotypes of individuals at these loci

Экстракцию изоферментов проводили из ноги моллюска. Далее проводили диск-электрофорез изоферментов в 10 %-м полиакриламидном геле (камера VE-3, Helicon). Окрашивание блоков на выявление неспецифических эстераз осуществляли в субстратной смеси: трис-НСI (рН = 7,4), α -нафтилацетат, прочный красный TR; для выявления супероксиддисмутаза — калий-фосфатный буфер (рН = 7,8), НТС, ФМС. Необходимо отметить, что со времени первых публикаций по генетике *H. striata* [10, 12] нами были получены новые данные по изменчивости генофондов популяций этого моллюска и характере аллельного разнообразия локусов аллозимов. Так, в ранее используемом локусе *EST5* (неспецифические эстеразы) нами обнаружен пятый аллель, который не имеет ферментативной активности (так называемый θ -аллель), в связи с чем гомозиготы по нему не проявляются на гелевом блоке, а гетерозиготы представлены лишь одной полосой по активному аллелю (рис. 2). Кроме того, θ -аллель (также пятый по счету) обнаружен и в локусе *EST6*. Причем зафиксирован он был только в популяции «Белая гора». В случае если в популяции по какому-либо локусу фиксировался θ -аллель, определение гетерозигот и гомозигот по проявляющемуся аллелю мы проводили по степени его активности относительно других особей. При этом мы исходили из принципа, что гомозиготы на электрофореграммах проявляются более интенсивно по сравнению с гетеро-

зиготами, поскольку концентрация фермента у них более высокая.

Таким образом, в качестве генетических маркеров популяционной структуры *H. striata* использовали четыре локуса неспецифических мономерных эстераз (*EST5* с пятью аллелями, *EST6* с пятью аллелями, *EST7* с двумя аллелями, *EST8* с тремя аллелями) и два локуса супероксиддисмутаза (*SOD2*-димер с двумя аллелями и *SOD7*-мономер с тремя аллелями) (рис. 3). Наследование всех аллелей осуществлялось по кодоминантному типу.

Выделение ДНК проводили с использованием протеиназы К с дальнейшей очисткой смесью хлороформ — изопентанол [12, 20]. В качестве ДНК-маркеров задействованы *ISSR*-ампликоны по праймеру *UBC811* (5'-[GA]₈C-3'). Объем ПЦР-смеси составлял 20 мкл, содержащей 20 нг геномной ДНК, 10 мМ трис-НСI (рН = 8,3), 50 мМ КСI, 4 мМ MgCl₂, 0,25 мМ dNTP, 0,5 мкМ праймера, 1 единицу Taq ДНК-полимеразы. Реакция проходила на амплификаторе MyCycler (BioRad, США) 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. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2 %-м агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера, 100 В — 45 мин. Блоки окрашивали бромистым этидием. По картинкам электрофореза составляли бинарные матрицы, где при-

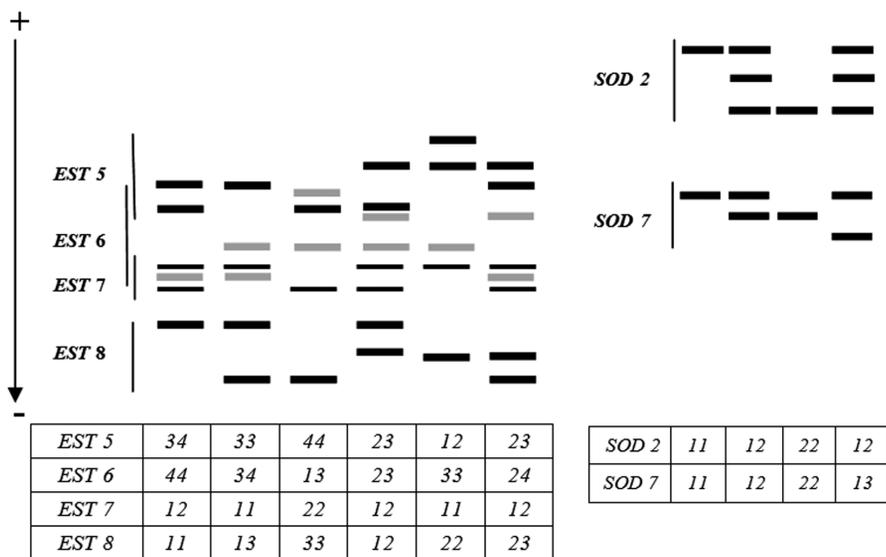


Рис. 3. Графическое изображение исследуемых локусов изоферментов и соответствующих им комбинаций аллелей
 Fig. 3. The graphic image of the investigated allozyme loci and their associated combinations of alleles

сутствие полосы обозначалось как «1» (аллель *p*), отсутствие «0» (аллель *q*). Ранее у *H. striata* было выделено 17 локусов с использованием праймеров *UBC811*. Полученные ДНК-паттерны и их расшифровка приведены в публикации Э.А. Снегина [11].

Всего по аллозимам определены генотипы у 757 особей, а по *ISSR*-локусам — у 701 особи *H. striata*.

Математическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета программ Excel

(Microsoft Office), GenAlEx v.6.5 [21] и F-stat [18]. Полигоны Дебеца были построены в программе Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полигоны Дебеца, построенные на основании частот аллелей исследованных изоферментных локусов, приведены на рис. 4.

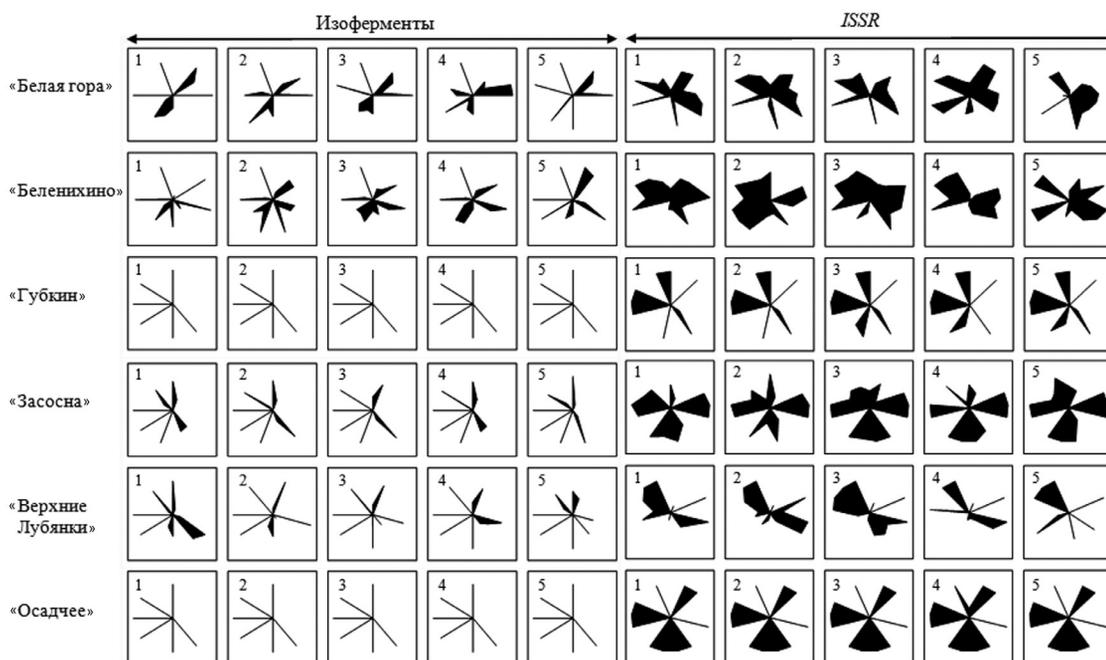


Рис. 4. Полигоны Дебеца, построенные по частотам аллелей изоферментных и *ISSR*-локусов, в демах (1–5) популяций *H. striata*
 Fig. 4. Debec polygons, built on alleles frequencies of allozymes and *ISSR* loci in the dem (1-5) of *H. striata* populations

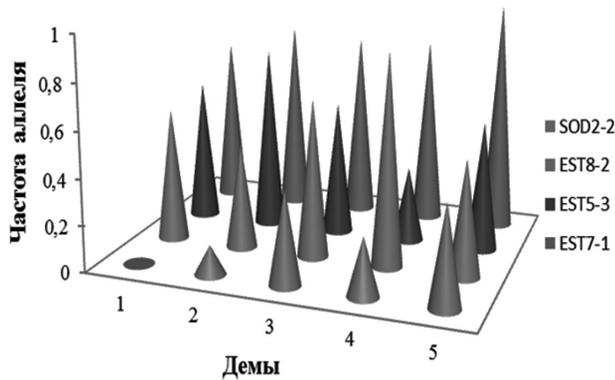


Рис. 5. Значения частот аллелей изоферментных локусов в демах популяции «Белая гора»

Fig. 5. Values of allelic frequencies of allozyme loci in the dem population is "White mountain"

Исходя из полученных данных, для популяций «Осадчее» и «Губкин» в силу отсутствия изменчивости по всем исследованным локусам изоферментов не представляется возможным оценить уровень внутривидовой структурированности. В остальных популяциях наблюдается разная степень генетической дифференциации демов по частотам аллелей. Например, в популяции «Белая гора» частота первого аллеля *EST7-1* в первом деме составляет 0,731, а уже в пятом деме по нему на-

блюдается стопроцентная гомозиготность. По аллелю *SOD2-2* отмечаются еще более выраженные изменения между демами этой популяции: в первой субпопуляции этот аллель не обнаружен, в то время как в пятом деме его частота составила 0,430. Столь значительные изменения частот аллелей в пределах одной популяции наблюдаются и по другим локусам, а также в других исследованных популяциях моллюска. При этом во многих локусах зафиксирована клинальная или синусоидальная (сначала плавно увеличивается/уменьшается, затем плавно уменьшается/увеличивается) изменчивость частот аллелей в популяциях (рис. 5).

Полученные данные могут свидетельствовать о низком уровне потока генов в пределах локальных популяций.

Доля полиморфных локусов (p) в демах популяций также оказалась не постоянной. Так, в популяции «Верхние Лубянки» p варьирует от 33,3% (дем № 4) до 66,7% (демы № 1 и 3). Как и по частотам аллелей, по показателям генетической изменчивости отдельных изоферментных локусов между демами наблюдаются значительные отличия.

Однако по средним значениям остальных показателей генетической изменчивости (за исключением коэффициента инбридинга F), рассчитанных по всем локусам, достоверных отличий между демами в популяциях нами не обнаружено (табл. 2). То есть на протяжении своего ареала каждая из изученных популяций имеет сходный уровень генетического разнообразия, что указывает

Таблица 2

Показатели генетической изменчивости *H. striata* в демах популяций ($M \pm m$) по изоферментным локусам
Indicators of *H. striata* genetic variability in population dems ($M \pm m$) at allozyme loci

Популяция	Дем	n	$p, \%$	A_a	A_e	I	H_o	H_e	F
«Белая гора»	1	26	50,0	$1,50 \pm 0,22$	$1,42 \pm 0,19$	$0,32 \pm 0,14$	$0,21 \pm 0,10$	$0,23 \pm 0,10$	$0,09 \pm 0,10^*$
	2	36	66,7	$1,83 \pm 0,31$	$1,36 \pm 0,15$	$0,36 \pm 0,12$	$0,22 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,08$	$0,00 \pm 0,06^*$
	3	38	66,7	$1,83 \pm 0,31$	$1,57 \pm 0,21$	$0,45 \pm 0,15$	$0,35 \pm 0,12$	$0,30 \pm 0,10$	$-0,16 \pm 0,05$
	4	34	66,7	$1,83 \pm 0,31$	$1,48 \pm 0,25$	$0,40 \pm 0,16$	$0,25 \pm 0,09$	$0,24 \pm 0,10$	$-0,05 \pm 0,07^*$
	5	43	50,0	$1,67 \pm 0,33$	$1,54 \pm 0,25$	$0,38 \pm 0,18$	$0,24 \pm 0,11$	$0,26 \pm 0,12$	$0,05 \pm 0,04^*$
«Беленихино»	1	40	83,3	$2,00 \pm 0,26$	$1,43 \pm 0,22$	$0,38 \pm 0,15$	$0,23 \pm 0,11$	$0,23 \pm 0,10$	$0,06 \pm 0,11^*$
	2	39	83,3	$2,33 \pm 0,42$	$1,83 \pm 0,32$	$0,60 \pm 0,18$	$0,32 \pm 0,11$	$0,37 \pm 0,11$	$0,09 \pm 0,14^*$
	3	22	83,3	$2,33 \pm 0,42$	$1,69 \pm 0,24$	$0,57 \pm 0,16$	$0,33 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,09$	$0,03 \pm 0,05^*$
	4	40	66,7	$2,17 \pm 0,31$	$1,67 \pm 0,20$	$0,55 \pm 0,14$	$0,32 \pm 0,11$	$0,35 \pm 0,09$	$0,08 \pm 0,14^*$
	5	24	66,7	$2,00 \pm 0,37$	$1,45 \pm 0,22$	$0,39 \pm 0,17$	$0,17 \pm 0,08$	$0,23 \pm 0,10$	$0,21 \pm 0,10^*$
«Губкин»	1	16	0,0	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	—
	2	17	0,0	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	—
	3	19	0,0	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	—
	4	19	0,0	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	—
	5	20	0,0	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	—
«Засосна»	1	26	50,0	$1,50 \pm 0,22$	$1,38 \pm 0,18$	$0,31 \pm 0,14$	$0,21 \pm 0,10$	$0,21 \pm 0,10$	$0,02 \pm 0,08^*$
	2	24	50,0	$1,50 \pm 0,22$	$1,26 \pm 0,13$	$0,26 \pm 0,12$	$0,15 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,08$	$0,11 \pm 0,05^*$
	3	22	33,3	$1,33 \pm 0,21$	$1,24 \pm 0,15$	$0,20 \pm 0,13$	$0,12 \pm 0,08$	$0,14 \pm 0,09$	$0,12 \pm 0,02^*$
	4	25	50,0	$1,50 \pm 0,22$	$1,29 \pm 0,17$	$0,24 \pm 0,13$	$0,16 \pm 0,09$	$0,16 \pm 0,09$	$0,00 \pm 0,01^*$
	5	21	50,0	$1,50 \pm 0,22$	$1,20 \pm 0,10$	$0,23 \pm 0,10$	$0,16 \pm 0,08$	$0,14 \pm 0,07$	$-0,09 \pm 0,11$

Таблица 2 (Окончание)

Популяция	Дем	<i>n</i>	<i>p</i> , %	<i>A_a</i>	<i>A_e</i>	<i>I</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F</i>
«Верхние Лубянки»	1	27	66,7	2,00 ± 0,37	1,44 ± 0,18	0,41 ± 0,15	0,23 ± 0,08	0,25 ± 0,09	0,06 ± 0,06*
	2	22	50,0	1,50 ± 0,22	1,24 ± 0,14	0,23 ± 0,11	0,11 ± 0,06	0,15 ± 0,08	0,27 ± 0,06*
	3	28	66,7	1,83 ± 0,31	1,24 ± 0,12	0,26 ± 0,11	0,12 ± 0,06	0,16 ± 0,07	0,22 ± 0,08*
	4	26	33,3	1,50 ± 0,34	1,27 ± 0,17	0,24 ± 0,15	0,12 ± 0,07	0,15 ± 0,10	0,23 ± 0,01*
	5	28	50,0	1,50 ± 0,22	1,43 ± 0,20	0,33 ± 0,15	0,24 ± 0,11	0,23 ± 0,10	-0,09 ± 0,12
«Осадчее»	1	26	0,0	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	—
	2	24	0,0	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	—
	3	23	0,0	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	—
	4	23	0,0	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	—
	5	26	0,0	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	—

n — число особей в выборке; * — достоверный дефицит гетерозигот; *A_a* — среднее число аллелей на локус; *A_e* — эффективное число аллелей на локус; *I* — индекс Шеннона; *H_o* — наблюдаемая гетерозиготность; *H_e* — ожидаемая гетерозиготность; *F* — коэффициент инбридинга. Прочерком отмечены группы с мономорфными локусами, для которых *F* определить не удалось

на пространственную стабильность популяционных генофондов *H. striata*.

Полигоны Дебеца, построенные по частотам *q*-аллеля семнадцати *ISSR*-локусов в демах популяций *H. striata*, представлены на рис. 4. Полученные данные коррелируют с изменчивостью аллозимов. Так, наиболее богатыми генофондами обладают популяции *H. striata* из бассейна р. Северский Донец — «Белая гора» и «Беленихино», а наиболее бедными — «Осадчее» и «Губкин». Так же как и по аллозимам, даже между соседними демами в популяциях наблюдаются значительные разли-

чия частот ДНК-аллелей. В результате полигоны Дебеца, построенные по частотам *q*-аллеля, часто отличаются даже у соседних демов одной популяции.

Тем не менее общая топография генетической изменчивости в разных участках ареала популяций остается схожей. Так, средние значения показателей генетической изменчивости, вычисленные на основе *ISSR*-локусов в пределах популяций между демами, достоверно не отличаются, что подтверждает данные, полученные по аллозимам, о пространственной стабильности внутрипопуляционной генетической изменчивости (табл. 3).

Таблица 3

Средние значения показателей генетической изменчивости в демах популяций *H. striata* на основе ДНК-маркеров
Average values of genetic variability in *H. striata* population dems on the basis of DNA markers

Популяция	Дем	<i>n</i>	<i>p</i> , %	<i>A_a</i>	<i>A_e</i>	<i>I</i>	<i>H_e</i>
«Белая гора»	1	39	76,47	1,65 ± 0,17	1,52 ± 0,09	0,44 ± 0,06	0,30 ± 0,05
	2	39	70,59	1,59 ± 0,17	1,52 ± 0,10	0,42 ± 0,07	0,29 ± 0,05
	3	36	64,71	1,53 ± 0,17	1,50 ± 0,10	0,40 ± 0,08	0,28 ± 0,05
	4	34	76,47	1,65 ± 0,17	1,57 ± 0,10	0,45 ± 0,07	0,31 ± 0,05
	5	31	88,24	1,88 ± 0,08	1,59 ± 0,09	0,48 ± 0,06	0,33 ± 0,04
«Беленихино»	1	24	76,47	1,65 ± 0,17	1,49 ± 0,08	0,43 ± 0,06	0,29 ± 0,04
	2	24	70,59	1,59 ± 0,17	1,42 ± 0,08	0,38 ± 0,07	0,25 ± 0,05
	3	21	70,59	1,53 ± 0,19	1,43 ± 0,09	0,37 ± 0,07	0,25 ± 0,05
	4	24	70,59	1,59 ± 0,17	1,46 ± 0,09	0,40 ± 0,07	0,27 ± 0,05
	5	24	82,35	1,71 ± 0,17	1,50 ± 0,08	0,45 ± 0,06	0,30 ± 0,04
«Губкин»	1	18	5,88	0,59 ± 0,15	1,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,02
	2	18	5,88	0,59 ± 0,15	1,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,02
	3	17	17,65	0,76 ± 0,18	1,07 ± 0,05	0,07 ± 0,04	0,05 ± 0,03
	4	18	11,76	0,71 ± 0,17	1,08 ± 0,06	0,07 ± 0,05	0,05 ± 0,03
	5	20	17,65	0,76 ± 0,18	1,12 ± 0,06	0,10 ± 0,06	0,07 ± 0,04
«Засосна»	1	23	52,94	1,24 ± 0,22	1,29 ± 0,09	0,27 ± 0,07	0,17 ± 0,05
	2	25	52,94	1,24 ± 0,22	1,35 ± 0,10	0,29 ± 0,07	0,20 ± 0,05
	3	21	47,06	1,06 ± 0,23	1,24 ± 0,08	0,23 ± 0,07	0,15 ± 0,05
	4	23	35,29	0,88 ± 0,22	1,25 ± 0,10	0,20 ± 0,07	0,14 ± 0,05
	5	17	41,18	1,00 ± 0,23	1,27 ± 0,10	0,21 ± 0,07	0,14 ± 0,05

Таблица 3 (Окончание)

Популяция	Дем	n	p, %	A_a	A_e	I	H_e
«Верхние Лубянки»	1	24	47,06	$1,24 \pm 0,20$	$1,27 \pm 0,08$	$0,25 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,05$
	2	20	52,94	$1,24 \pm 0,22$	$1,36 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,05$
	3	22	41,18	$1,12 \pm 0,21$	$1,22 \pm 0,08$	$0,20 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,05$
	4	24	35,29	$1,06 \pm 0,20$	$1,26 \pm 0,09$	$0,21 \pm 0,07$	$0,15 \pm 0,05$
	5	24	47,06	$1,29 \pm 0,19$	$1,24 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,05$
«Осадчее»	1	24	0,00	$0,35 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
	2	24	0,00	$0,35 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
	3	24	0,00	$0,35 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
	4	24	5,88	$0,41 \pm 0,15$	$1,03 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,02$
	5	24	0,00	$0,35 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$

Далее на основании анализа частот аллелей изоферментных локусов в исследованных популяциях нами проведен расчет коэффициентов инбридинга на разном уровне популяционной иерархии — F_{is} , F_{it} , F_{st} , а также показателя подразделенности Φ_{st} (метод AMOVA). Выяснилось, что исследованные изоферментные локусы вносят различный вклад в подразделенность популяций. Так, в популяции «Беленихино» F_{st} , отражающий уровень дифференциации популяции, по локусу *SOD2* оказался равным 0,024, а по локусу *EST5* — 0,204, т. е. почти в девять раз выше. Кроме того, одни и те же локусы вносят разный вклад в структурированность разных популяций. Например, F_{st} по локусу *EST5* в разных популяциях

принимает значения от 0,105 в популяции «Белая гора» до 0,260 в популяции «Верхние Лубянки». Вероятно, это объясняется разнонаправленностью векторов отбора и генетико-автоматических процессов как в разных локусах, так и в разных популяциях *H. striata*.

Расчет средних значений индексов инбридинга F_{st} и F_{it} в большинстве популяций выявил дефицит гетерозигот по анализируемым локусам (табл. 4).

Это может свидетельствовать в пользу низкого потока генов в популяциях *H. striata* и формирования в них оригинальных внутривидовых группировок. А расчет среднего значения индексов F_{st} и Φ_{st} (табл. 5) подтверждает эти выводы. Исследованные популяции

Таблица 4

Средние значения коэффициентов инбридинга в популяциях* *H. striata* по изоферментным локусам
Average values of the inbreeding coefficients in *H. striata* populations at allozyme loci

Популяции	F_{is}	F_{it}	F_{st}
«Белая гора»	$-0,026 \pm 0,047$	$0,082 \pm 0,046$	$0,106 \pm 0,015$
«Беленихино»	$0,086 \pm 0,097$	$0,181 \pm 0,091$	$0,101 \pm 0,028$
«Засосна»	$0,013 \pm 0,038$	$0,261 \pm 0,041$	$0,245 \pm 0,056$
«Верхние Лубянки»	$0,080 \pm 0,067$	$0,264 \pm 0,078$	$0,207 \pm 0,027$

F_{is} — коэффициент инбридинга особи относительно субпопуляции; F_{it} — коэффициент инбридинга особи относительно большой популяции; F_{st} — коэффициент инбридинга субпопуляции относительно большой популяции. Для популяций «Губки» и «Осадчее» вследствие их мономорфности по исследованным аллозимам значения коэффициентов F_{it} , F_{is} , F_{st} , а также Φ_{st} не установлены

Таблица 5

Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) в популяциях *H. striata* по изменчивости изоферментных локусов
The results of analysis molecular variance (AMOVA) in *H. striata* populations at allozyme loci variability

Популяция	Варианса	df	SS	MS	E	$\Phi_{st}; p$
«Белая гора»	Между популяциями	4	62,757	15,689	0,402	0,208 ($p = 0,001$)
	Внутри популяций	172	264,175	1,536	1,536	
«Беленихино»	Между популяциями	4	76,418	19,105	0,524	0,203 ($p = 0,001$)
	Внутри популяций	160	330,121	2,063	2,063	
«Засосна»	Между популяциями	4	70,122	17,530	0,699	0,396 ($p = 0,001$)
	Внутри популяций	113	120,633	1,068	1,068	
«Верхние Лубянки»	Между популяциями	4	81,799	20,450	0,732	0,358 ($p = 0,001$)
	Внутри популяций	126	165,460	1,313	1,313	

df — число степеней свободы; SS — сумма квадратов; MS — средний квадрат; E — оценка дисперсии; p — уровень значимости

Таблица 6

Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) в популяциях *H. striata* по ISSR-локусам
 The results of analysis molecular variance (AMOVA) in *H. striata* populations at ISSR-loci

Популяция	Варианса	df	SS	MS	E	$\Phi_{st}; p$
«Белая гора»	Между популяциями	4	36,054	9,013	0,189	0,078
	Внутри популяций	174	391,510	2,250	2,250	($p = 0,001$)
«Беленихино»	Между популяциями	4	57,632	14,408	0,524	0,195
	Внутри популяций	112	241,821	2,159	2,159	($p = 0,001$)
«Губкин»	Между популяциями	4	5,312	1,328	0,060	0,206
	Внутри популяций	86	19,985	0,232	0,232	($p = 0,001$)
«Засосна»	Между популяциями	4	34,424	8,606	0,330	0,186
	Внутри популяций	104	150,365	1,446	1,446	($p = 0,001$)
«Верхние Лубянки»	Между популяциями	4	39,269	9,817	0,381	0,251
	Внутри популяций	109	123,942	1,137	1,137	($p = 0,001$)
«Осадчее»	Между популяциями	4	0,033	0,008	0,000	0,000
	Внутри популяций	115	0,958	0,008	0,008	($p = 0,100$)

имеют разную степень генетической разобшенности между демами. Как оказалось, наибольшей генетической структурированностью обладают популяции «Верхние Лубянки» и «Засосна», обитающие в степной природной зоне. При этом степень фрагментации биотопа популяции «Засосна» значительно ниже, чем у генетически менее структурированной популяции «Беленихино», что говорит о разной степени миграционной активности особей (активной и пассивной) *H. striata* в разных популяциях.

Значения индекса Φ_{st} , рассчитанного по ISSR-локусам (табл. 6), показывают, что наиболее подразделенным является генофонд популяции «Верхние Лубянки», а наименее — популяции «Белая гора»¹. В целом по ISSR-локусам исследованные популяции имеют более низкое значение Φ_{st} , чем по аллозимам. Вероятно, это вызвано тем, что ISSR-локусы в основном характеризуют селективно нейтральную часть генома и в большей степени отражают генетико-автоматические процессы в исследованных популяциях. В данном аспекте стоит отметить уровень дифференциации генофонда популяции «Губкин», мономорфной по локусам изоферментов. Изменчивость этой популяции по ДНК-маркерам также оказалась сравнительно низкой (полиморфными являются всего 11,76 % локусов). Однако отмечаются достаточно существенные различия между демами ($\Phi_{st} = 0,206$) (см. табл. 6).

Стоит также отметить, что уровень подразделенности отдельных популяций ($F_{st} \leq 0,245 \pm 0,056$) по сравнению с полученным нами ранее значением F_{st} для *H. striata* всего юга Среднерусской возвышенности как генеральной совокупности ($F_{st} = 0,503 \pm 0,101$) пред-

¹ Мономорфность исследованных генетических маркеров в популяции «Осадчее» не позволяет сделать выводов о характере структурированности ее генофонда и об уровне потока генов между демами.

сказуемо ниже, поскольку генофонд отдельной популяции включает только часть генофонда всех популяций моллюска из района исследования. Тем не менее дифференциация генофондов локальных популяций *H. striata* выше, чем у многих других видов наземных улиток. Так, у мезофильного моллюска *Bradybaena fruticum* для всего юга Среднерусской возвышенности F_{st} составил 0,135 [9], а у ксерофильных видов *Chondrula tridens* и *Cepaea vindobonensis* — 0,164 и 0,173 соответственно [7, 8].

Таким образом, среди улиток, обитающих на юге Среднерусской возвышенности, *H. striata* характеризуется одним из самых низких уровней потока генов. Полагаем, что это связано с особенностями биологии данного вида. Так, *H. striata* является стенобионтным видом, распространенным по хорошо прогреваемым луговым или степным склоновым биотопам [10, 12, 13]. А фоновые виды моллюсков, взятые для сопоставления, являются эврибионтными мезофилами или факультативными ксерофилами, обитающими как в сухих, так и в увлажненных биотопах [12]. Известно, что улитки активны и способны совершать миграции только во влажные периоды времени [15]. А поскольку в сухих местообитаниях таких периодов значительно меньше, чем увлажненных, то и общее время для совершения миграций у *H. striata* меньше, чем у эврибионтных или мезофильных видов улиток. Кроме того, по сравнению с некоторыми другими видами ксерофилов во время засух *H. striata* закапывается в почву, в связи с чем становится практически недоступен для пассивного переноса [1].

Низкий поток генов, а также превышение его внутригрупповой компоненты над межгрупповой приводят к формированию оригинальных структурированных популяционных генофондов, каждый из которых адаптируется к локальным условиям среды [2]. Видимо, такая организация генетической структуры позволяет *H. striata*

наиболее эффективно адаптироваться к условиям пересеченного ландшафта Среднерусской возвышенности с множеством разнообразных микроусловий. Однако чрезмерная специализация популяций сопровождается снижением их генетической изменчивости и может привести к потере адаптационной пластичности с последующим вымиранием в случае изменения условий среды. Что наиболее актуально для таких популяций моллюска, как «Осадчее» и «Губкин»?

Особо стоит отметить, что значительная фрагментация ландшафта не является обязательным условием пространственной дифференциации популяционных генофондов на оригинальные генофонды демов. Так, популяция «Засосна» обитает в относительно однотипном биотопе без значимых физических барьеров (см. табл. 1). Тем не менее как по изоферментам, так и по ДНК она имеет высокие значения Φ_{st} . По-видимому, это связано с особенностями биологии моллюсков, в частности их малоподвижностью и приуроченностью к локальным микроишам, в связи с чем географическое расстояние само по себе является изолирующим фактором.

ВЫВОДЫ

Таким образом, на территории юга Среднерусской возвышенности *H. striata* характеризуется разной степенью пространственной дифференциации популяционных генофондов. При этом важную роль в формировании генетической структуры играет не столько уровень разнообразия условий среды, сколько степень миграционной активности особей, которая оказалась наиболее высокой в популяциях бассейна р. Северский Донец. В то же время популяции из степной зоны и Верхнего Поосколья с самым низким потоком генов имеют более изолированные генофонды и, вероятно, характеризуются более высокими темпами снижения генетического разнообразия вследствие большей активности случайных процессов. Полагаем, что хозяйственное использование местообитаний этих групп может вызвать дальнейшее обеднение их генофонда и, как следствие, вымирание.

По сравнению с другими исследованными видами наземных моллюсков юга Среднерусской возвышенности *H. striata* отличается наиболее низким уровнем потока генов. Это объясняется стенобионтностью данного моллюска и его меньшей способностью к активной и пассивной миграциям.

Кроме того, по нашим данным, для получения более объективной картины состояния популяционных генофондов, необходимо учитывать характер внутривидовой пространственной дифференциации, поскольку в некоторых случаях выборки из отдельных демов высокодифференцированной популяции могут не отражать ее общего состояния.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балашёв И.А., Байдашников А.А. Наземные моллюски (Gastropoda) Винницкой области и их биотопическая приуроченность // Вестник зоологии. — 2012. — Т. 46(1). — С. 19–28. [Balashev IA, Baydashnikov AA. Terrestrial molluscs (Gastropoda) of Vinnytsa region and their confinement to different phytocenoses. *Vestnik zoologii*. 2012;46(1):19-28. (In Russ.)]
2. Генофонд и геногеография народонаселения / Под ред. Ю.Г. Рычкова. — СПб.: Наука, 2000. [Gene pool and genogeography of human populations. Ed by Yu.G. Rychkov. Saint Petersburg: Nauka; 2000. (In Russ.)]
3. Гриценко В.В. Эколого-генетическая организация изменчивости популяций некоторых видов растений и насекомых: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Казань, 2008. [Gritsenko VV. Ecological and genetic organization of the variability in populations of some species plants and insects. [dissertation]. Kazan; 2008. (In Russ.)]
4. Кайданов Л.З. Генетика популяций. — М.: Высшая школа, 1996. [Kaydanov LZ. Genetics of populations. Moscow: Vysshaya shkola; 1996. (In Russ.)]
5. Крамаренко С.С. Анализ внутривидовой дифференциации на примере фенетической изменчивости наземного моллюска *Brephulopsis bidens* (Gastropoda: Pulmonata; Buliminidae) // Эколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження моллюсків, їх роль в біоіндикації стану навколишнього середовища. — Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І. Франка, 2006. — С. 165–169. [Kramarenko SS. Analiz vnutripopulyatsionnoy differentsiatsii na primere feneticheskoy izmenchivosti nazemnogo mollyuska *Brephulopsis bidens* (Gastropoda: Pulmonata; Buliminidae). In: Ekologo-funktsional'ni ta faunistichni aspekti doslidzhennya molyuskiv, ikh rol' v bioindikatsii stanu navkolishn'ogo seredovishcha. Zhitomir: Vid-vo ZhDU im. I. Franka, 2006. P. 165-169. (In Russ.)]
6. Крамаренко С.С. Формирование паттернов пространственно-временной изменчивости наземных моллюсков: мультимасштабный подход: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Киев, 2014. [Kramarenko SS. Formirovanie patternov prostranstvenno-vremennoy izmenchivosti nazemnykh mollyuskov: mul'timasshtabnyy podkhod. [dissertation]. Kiev; 2014. (In Russ.)]
7. Снегин Э.А. Генетическая структура популяций модельных видов наземных моллюсков в условиях урбанизированного ландшафта на примере *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) // Экологическая генетика. — 2011а. — Т. IX(2). — С. 54–64. [Snegin EA. The genetic structure of model species populations of terrestrial mollusks in conditions of urbanized landscape using the example of *Chondrula tridens* Müll (Gastropoda, Pulmonata).

- Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2012;2(2):160-170. (In Russ.]. doi: 10.1134/s2079059712020128.
8. Снегин Э.А. Оценка жизнеспособности популяций особо охраняемого вида *Cerpea vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях юга лесостепи Среднерусской возвышенности // Вестник КрасГАУ. — 2011б. — № 11. — С. 142–148. [Snegin EA. Vitality estimation of the *Cerpea vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) especially protected species populations in the conditions of the Forest-Steppe in Southern Mid-Russian Upland. *Vestnik KrasGAU*. 2011b;(11):142-148. (In Russ.)].
 9. 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. [Snegin EA. Assessment of the state of population gene pools of terrestrial mollusks in conditions of influence of ore dressing combines from the example of *Bradybaena fruticum* Mull. (Gastropoda, Pulmonata). *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2011;1(5):379-389. (In Russ.)]. doi: 10.1134/s2079059711050133.
 10. Снегин Э.А., Сычев А.А. Оценка жизнеспособности популяций особо охраняемого вида *Helicopsis striata* Müller (Mollusca, Gastropoda: Pulmonata) в условиях юга Среднерусской возвышенности // Теоретическая и прикладная экология. — 2011. — № 2. — С. 83–92. [Snegin EA, Sychev AA. Estimation of population viability specially protected species *Helicopsis striata* Müller (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) in Southern Mid-Russian Upland. *Theoretical and Applied Ecology*. 2011;(2):83-92. (In Russ.)]
 11. Снегин Э.А. Оценка состояния популяционных генофондов особо охраняемого вида *Helicopsis striata* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) на основе ДНК-маркеров // Экологическая генетика. — 2015. — Т. XIII(3). — С. 28–39. [Snegin EA. Assessment of the state population gene pool of specially protected species *Helicopsis striata* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) using DNA-markers. *Ekologicheskaya genetika*. 2015; XIII(3):28-39. (In Russ.)]. doi: 10.17816/ecogen13328-39.
 12. Снегин Э.А. Пространственные и временные аспекты эколого-генетической структуры популяций беспозвоночных животных (на примере наземных моллюсков и насекомых юга Среднерусской возвышенности): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Белгород, 2012. [Snegin EA. Extensional and temporal aspects of ecological and genetic structure of invertebrates populations (for example, land snails and insects of the Southern Mid-Russian Upland). [dissertation]. Belgorod; 2012. (In Russ.)]
 13. Снегин Э.А. Улитка степная ребристая (*Helicopsis striata* Müll) // Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. Официальное издание / Под ред. А.В. Присного. — Белгород: Белгородская областная типография, 2004. [Snegin EA. Ulitka stepnaya rebristaya (*Helicopsis striata* Müll). In: *Krasnaya kniga Belgorodskoy oblasti. Redkie i ischezayushchie rasteniya, griby, lishayniki i zhivotnye*. Ofitsial'noe izdanie. Ed by A.V. Prsnogo. Belgorod: Belgorodskaya oblastnaya tipografiya; 2004. (In Russ.)]
 14. Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. — М.: Наука, 1980. [Shvarts SS. Environmental laws of evolution. Moscow: Nauka; 1980. (In Russ.)]
 15. Шилейко А.А. Наземные моллюски надсемейства Helicoidea. Фауна СССР. Моллюски. — Л.: Наука, 1978. — Т 3(6). — 384 с. [Shileiko AA. Terrestrial molluscs superfamily Helicoidea. Fauna USSR. Molluscs. Leningrad: Nayka; 1978;3(6). (In Russ.)]
 16. Arnaud JF, Madec L, Bellido A, Guiller A. Microspatial genetic structure in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Heredity*. 1999;83: 110-119.
 17. Arnaud JF, Madec L, Guiller A, Bellido A. Spatial analysis of allozyme and microsatellite DNA polymorphisms in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Molecular Ecology*. 2001;10:1563-1576. doi: 10.1046/j.1365-294x.2001.01292.x.
 18. Goudet J. F-stat Software ver. 2.9.3.2. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. 2002.
 19. Livshits GM. Survival, behaviour and spatial distribution of shell morphs in a population of the snail *Brephulopsis bidens* (Pulmonata). *Oecologia (Berl)*. 1981;51:220-226.
 20. Mathew CG. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. *Nucleic Acids*. 1984;2:31-34.
 21. Peakall R., Smouse PE. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*. 2006;6:288-295.
 22. Pfenninger M. Relationship between microspatial population genetic structure and habitat heterogeneity in *Pomatias elegans* (O.F. Müller, 1774) (Caenogastropoda, Pomatiasidae). *Biological J of the Linnean Society*. 2002;76:565-575.
 23. Pfenninger M, Bahl A, Streit B. Isolation by distance in a population of a small land snail *Trochoida geyeri*: Evidence from direct and indirect methods. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 1996;263(1374):1211-1217.
 24. Selander RK, Kaufman DW. Genetic structure of populations of the brown snail (*Helix aspersa*). I. Microgeographic variation. *Evolution*. 1975;29:385-401.
 25. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugen*. 1951;15:323-354.

MICROSPATIAL STRUCTURE OF POPULATION GENE POOL IN THE LAND SNAIL *HELICOPSIS STRIATA* (PULMONATA, HYGROMIIDAE) IN CONDITIONS OF THE SOUTHERN MID-RUSSIAN UPLAND

A.A. Sychev, E.A. Snegin

For citation: Ecological genetics. 2016;14(2):28-38

☼ **SUMMARY: Background.** The formation of the subdivided genetic pattern is key to the successful adaptation of population. Consequently work on the conservation and restoration of protected steppe snail *Helicopsis striata* (Müller 1774) should be based on the analysis microprotrusions differentiation of population gene pools. **Materials and methods.** The genetic structure of six populations of *H. striata* was studied in a variety conditions of the Southern Mid-Russian Upland. In each population collected snails from five locations, located at an equal distance from each other (150-200 m). As the genetic markers used six polymorphic loci of allozymes (polyacrylamide gel electrophoresis) and DNA loci (ISSR-PCR). **Results.** In general, on the Southern Mid-Rus-

sian Upland *H. striata* is characterized by a different degree of the spatial differentiation population gene pools (for example, according to the ISSR-loci $0,078 \leq \Phi_{st} \leq 0,251$). In comparison with the other investigated species of land snail in the study area *H. striata* is distinguished by the high degree of a differentiation population gene pools. It is shown that populations with a high degree of genetic structure found in the biotopes with different levels of the landscape fragmentation. **Conclusion.** Based on these results it can be stated that an important role in shaping the populations genetic structure in *H. striata* is not so much the level of diversity environmental conditions, as the degree of migratory activity individuals, which was the highest in genetically rich populations of the basin Seversky Donets river. At the same time the biology of this snail decrease the speed of its active and passive migration, which probably leads to increased isolation of populations. The highest probability of extinction, in our opinion, are isolated populations of *H. striata* with low genetic variability.

☼ **KEYWORDS:** Land snail; *Helicopsis striata*; microspatial genetic structure; Mid-Russian Upland.

☼ Информация об авторах

Антон Александрович Сычев — аспирант, кафедра экологии, физиологии и биологической эволюции. ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». E-mail: syvuch20@yandex.ru.

Эдуард Анатольевич Снегин — д-р биол. наук, доцент, кафедра экологии, физиологии и биологической эволюции. ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». E-mail: snegin@bsu.edu.ru.

☼ Information about the authors

Anton A. Sychev — postgraduate, Department of Ecology, Physiology and Evolutionary Biology. Belgorod national research university. E-mail: syvuch20@yandex.ru.

Eduard A. Snegin — Dr. Biol. Sci., senior lecturer, Department of Ecology, Physiology and Evolutionary Biology. Belgorod national research university. E-mail: snegin@bsu.edu.ru.