

© Э.А. Снегин, Е.А. Снегина

ФГАОУ ВО «Белгородский национальный исследовательский университет»

С использованием аллозимов и ДНК-маркеров было проведено исследование популяционной структуры реликтового и особо охраняемого вида *Cerpea vindobonensis* Fer. (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях северо-восточной части современного ареала. Выявлены группы как с высоким, так и с низким уровнем генетического разнообразия. Отмечена высокая степень дифференциации изучаемых популяций ($F_{st} = 0,231$, $G_{st} = 0,265$, $\Phi_{st} = 0,261-0,263$, $N_m = 0,630-0,832$), что говорит о нарушении каналов миграции и длительной изоляции их друг от друга. Расчет эффективной численности и сопоставление ее с аналогичными показателями фоновых и уязвимых видов наземных моллюсков продемонстрировали высокий уровень жизнеспособности популяций *C. vindobonensis* в районе исследования.

✿ **Ключевые слова:** наземный моллюск; аллозимы; ДНК-маркеры; популяционная структура; эффективная численность.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ ОСОБО ОХРАНЯЕМОГО МОЛЛЮСКА *CERPEA VINDOBONENSIS* (MOLLUSCA, GASTROPODA, PULMONATA) В УСЛОВИЯХ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ СОВРЕМЕННОГО АРЕАЛА

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных сторон работы по сохранению среды жизни стало создание и ведение Красных книг растений и животных. Причем в последние десятилетия такая работа все больше проводится с упором на региональные системы мониторинга, так как особенности урбанизации и возникающие при этом экологические проблемы специфичны для различных ландшафтов. Известно, что исчезновение любого вида начинается с исчезновения его популяций, в результате значительно сокращается ареал, уменьшается генетическое разнообразие и, как следствие, происходит потеря устойчивости и вымирание. При этом первыми, как правило, страдают группы, расположенные на краях видовых ареалов или на каких-то изолированных территориях, так как при расселении, в силу генетического дрейфа, они унаследовали небольшую часть видового генофонда. Причем утрата части аллелей порой не восполняется появлением новых генетических факторов в ходе мутационного процесса. Оказавшись в условиях антропогенного прессинга, такие популяции, не имея запаса генетической прочности, оказываются в более уязвимом положении, чем другие виды сообщества. Часто бывает так, что вид, занесенный в охранные списки отдельных регионов, в целом широко распространен и в отдельных частях ареала достигает большой численности, соответственно не нуждается в охране. Однако такое кажущееся благополучие может смениться в ряде мест депрессивным состоянием. В условиях нормально колеблющейся среды такое вымирание локальных периферийных группировок легко восполняется притоком особей из центральных областей. Но в настоящее время из-за разрушения биокоридоров такое поддержание стабильности вида все более оказывается неосуществимым. Причем сама по себе редкость встречаемости вида в регионе может служить только косвенным аргументом, так как она может быть вызвана случайным заносом особей из соседних благополучных частей ареала и приравнена к попытке освоения новых территорий. Иной вариант возникает, когда дело касается исконных реликтовых популяций. Для оценки их жизнеспособности, помимо традиционных демографических характеристик, необходимы глубокие знания о состоянии популяционных генофондов, включая оценку аллельного и генотипического разнообразия, степени мутагенной нагрузки и адаптационных перестроек на генетическом уровне. Эти сведения должны стать серьезным аргументом для принятия решений.

Одним из таких уязвимых видов является реликтовый наземный брюхоногий моллюск *Cerpea vindobonensis* Fer.¹ (австрийская улитка), известный из плейстоценовых отложений Европы. Его современный ареал охватывает Юго-Восточную Европу, Крым и Северный Кавказ [1]. Наши исследования в основном проводились на южном макросклоне Среднерусской возвышенности (Белгородская и Харьковская области), где проходит северо-восточная граница естественного ареала этого вида. На данной территории улитки обитают в реликтовых сообществах доледникового и послеледникового периодов, таких как меловые боры и нагорные дубравы, а также они встречаются

Поступила в редакцию 04.08.2016
Принята к публикации 07.10.2016

¹ В ряде работ по молекулярной таксономии данный вид относят к роду *Caucasotachea* [16, 17].

на сухих, хорошо прогреваемых склонах, на меловых обнажениях и суходольных лугах [2]. Вид занесен в Красную книгу Белгородской области [3].

Стоит отметить, что изучению популяционной структуры данного вида был посвящен ряд работ, проведенных с учетом признаков раковины и охватывающих центральные и западные участки видового ареала [4–13]. В указанных публикациях приводятся данные о зависимости метрических и окрасочных признаков раковины этого моллюска от микроклиматических условий естественной и урбанизированной среды. Кроме того, с использованием молекулярных маркеров ДНК (*RAPD*) была изучена одна континуальная популяция *C. vindobonensis*, обитающая в условиях города Николаева на юге Украины [14]. В наших предыдущих исследованиях были получены предварительные данные о популяционной структуре австрийской улитки на юге Среднерусской возвышенности, полученные с помощью конхиологических признаков и аллозимов [15].

Цель работы: на основании селективно значимых локусов изоферментов и нейтральных маркеров ДНК (*RAPD*, *ISSR*) оценить состояние популяционных генофондов *C. vindobonensis* в условиях северо-восточной части ареала в природоохранных целях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили образцы тканей особей *C. vindobonensis*, хранящиеся в криобанке, созданном в лаборатории популяционной генетики и генотоксикологии НИУ «БелГУ». Выборки особей из популяций *C. vindobonensis* осуществлялись во время экспедиции с 2006 по 2010 год из шести пунктов юга Среднерусской возвышенности. Для сопоставления нами были взяты выборки из западной части ареала вида (пункты с 7-й по 10-й), а также адвентивная группа из г. Пензы (пункт 11) (табл. 1, рис. 1). Всего по аллозимам было исследовано 999 особей, а по ДНК-маркерам — 488 особей.

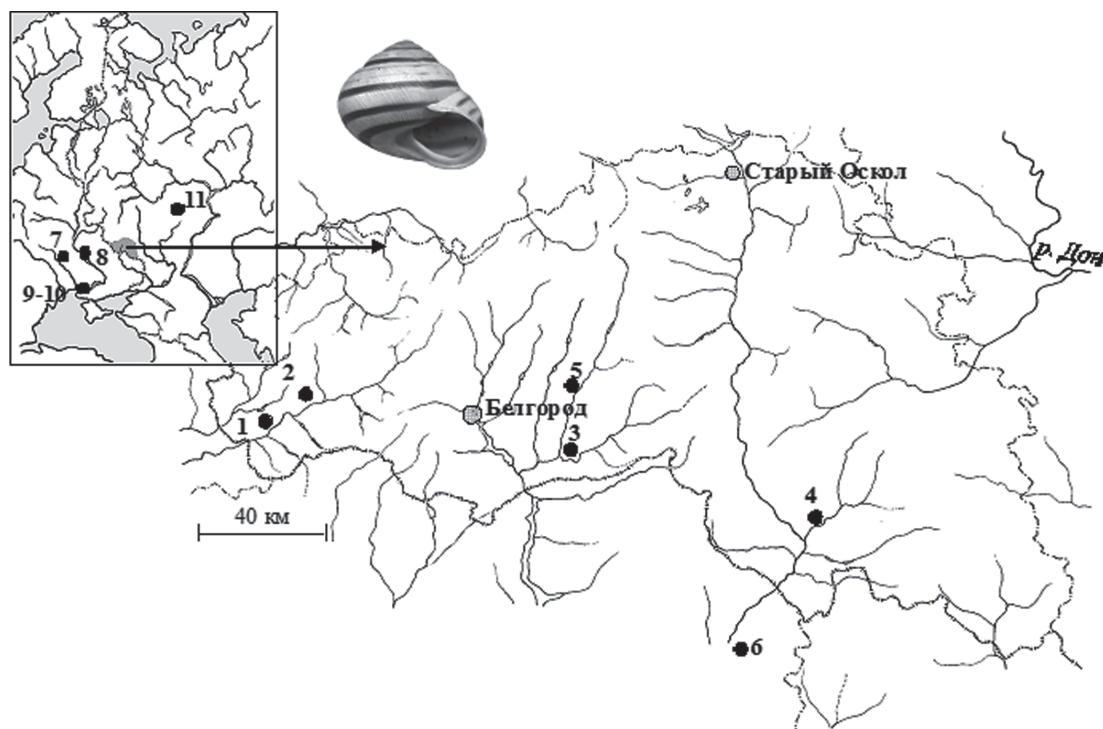
Экстракцию аллозимов проводили из ноги моллюсков путем замораживания при -80°C с последующим оттаиванием и механическим измельчением в 0,05 М трис-НСI-буфере (рН 6,7). Электрофорез изоферментов проводился в 10 % полиакриламидном геле в камере VE-3 (Helicon, Russia). Гелевый трис-НСI-буфер (концентрирующий гель рН 6,7, разделяющий гель рН 8,9); электродный трис-глициновый-буфер (рН 8,3). Окрашивание блоков на выявление неспецифических эстераз проводилось в субстратной смеси: трис-НСI (рН 7,4),

Таблица 1

Пункты сбора *C. vindobonensis*

The collection points of the *C. vindobonensis*

№	Пункт	Описание пункта	Координаты
1	«Головчино»	Долина р. Ворскла возле с. Головчино, нагорная дубрава	50°33'57.29" с. ш., 35°48'12.29" в. д.
2	«Хотмыжск»	Долина р. Ворскла, пойменный луг возле пос. Хотмыжск	50°35'05.99" с. ш. 35°52'24.83" в. д.
3	«Бекарюковский бор»	Памятник природы Бекарюковский бор, пойма р. Нежеголь (Шебекинский район), меловой склон, посадки клена и сосны	50°25'43.87" с. ш. 37°04'12.07" в. д.
4	«Валуйки»	Долина р. Валуй, подножие мелового склона, окрестности г. Валуйки, рядом с автомобильной трассой	50°13'24.38" с. ш. 38°00'34.61" в. д.
5	«Ржевка»	Меловой склон западной экспозиции в пойме р. Короча возле пос. Ржевка	50°26'32.63" с. ш., 36°58'22.89" в. д.
6	«Купянск»	Пойменный луг долины р. Оскол, возле г. Купянск (Украина)	49°42'37.60" с. ш. 37°37'26.18" в. д.
7	«Житомир»	Пойма р. Тетерев, г. Житомир (Украина). Заросли ивы и клена	50°14'31.06" с. ш. 28°40'23.52" в. д.
8	«Хортица»	Остров Хортица на р. Днепр. Окрестности г. Запорожье (Украина)	47°50'31.45" с. ш. 35°04'10.03" в. д.
9	«Дубки»	Парк Дубки на окраине г. Николаева (Украина). Молодые дубы. Местами имеются заросли кустарника. Достаточно сильно подвергается антропогенному воздействию. Часты пожары	46°58'42.47" с. ш. 32°03'51.29" в. д.
10	«ЮТЗ»	Г. Николаев. Парк около Южного турбинного завода. В основном состоит из дубков. Кое-где имеются заросли кустарника. Достаточно сильно подвергается антропогенному воздействию	46°56'26.17" с. ш. 32°03'03.45" в. д.
11	«Пенза»	Г. Пенза (р-н Арбеково). Зброшенный заболоченный участок. Кустарник, остатки плодового сада, посадки березы и ясеня	44°56'32.53" с. ш. 53°13'30.05" в. д.

Рис. 1. Пункты сбора *C. vindobonensis*Fig. 1. The collection points of the *C. vindobonensis*

α -нафтилацетат, прочный красный TR. В качестве генетических маркеров использовались три локуса неспецифических эстераз: *EST1* — димер с двумя аллелями, *EST2* — димер с двумя аллелями и *EST8* — мономер с тремя аллелями [15].

Анализ изменчивости по ДНК-маркерам проводили с использованием полимеразной цепной реакции методом *RAPD* (Random amplified polymorphic DNA) [18] и *ISSR* (Inter simple sequence repeats) [19]. Для анализа использовали два праймера: *OPA10* (5'-GTGATCGCAG-3'; метод *RAPD*), *SAS3* (5'-GAGGAGGAGGAGGC-3', метод *ISSR*). Амплификацию проводили в термоциклере MyCycler (Bio-Rad, США). Реакцию проводили в 20 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, ПЦР-буфер (10 мМ трис-НСl (рН 8,3), 50 мМ KCL, 2 мМ MgCl₂), 0,25 мМ dNTP, 0,5 мкМ праймера, 1 единицу Taq ДНК-полимеразы (ингибированной для горячего старта). Реакция проходила в следующих условиях: «горячий старт» — 2 мин/94 °С, 35 циклов (денатурация — 45 с/94 °С, отжиг праймера — 15 с/Т °С, синтез — 1 мин/72 °С), дополнительный синтез — 10 мин/72 °С. Для праймера *OPA10* температура отжига Т = 36 °С, для *SAS3* — Т = 55 °С. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера (охлажденного до + 4 °С), 10 В/см — 45 мин. Блоки окрашивали бромистым этидием.

По картинкам 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. По праймеру *OPA1* нами выделено 17 локусов, по *SAS3* — 18 локусов. Полученные ДНК-паттерны и их расшифровка приведены на рисунке 2.

Обработка полученных данных проводилась с использованием программ GenAlExv.6.5 [20], POPGENE32 [21], MEGA6 [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первым этапом наших исследований была оценка уровня генетической гетерогенности изучаемых популяций *C. vindobonensis*. Частоты аллелей и показатели генетической изменчивости по используемым локусам аллозимов представлены в таблицах 2 и 3, а по ДНК-маркерам — в таблице 4.

Ввиду того что для оценки состояния популяционных генофондов *C. vindobonensis* были использованы

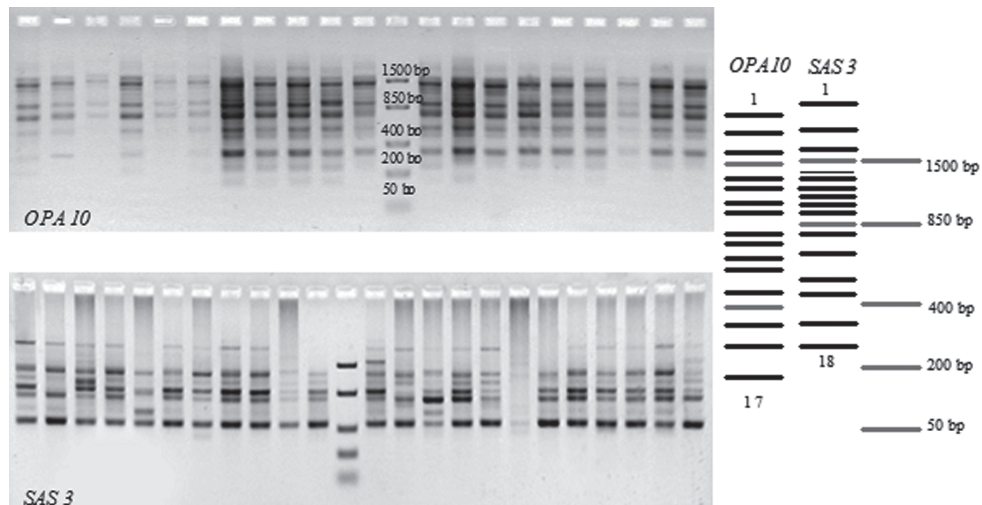


Рис. 2. RAPD- и ISSR-спектры ДНК *C. vindobonensis*
 Fig. 2. RAPD- and ISSR-DNA patterns of the *C. vindobonensis*

Таблица 2

Частоты аллелей и полокусные показатели генетической изменчивости аллозимов в популяциях *Ceraea vindobonensis*

The frequencies of alleles and indicators of genetic variability allozyme loci in the populations of *Ceraea vindobonensis*

Локус	Аллель	Популяции										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
EST2	1	0,141	0,028	0,068	0,260	0,038	0,132	0,310	0,071	0,064	0,000	0,200
	2	0,859	0,972	0,932	0,740	0,962	0,868	0,690	0,929	0,936	1,000	0,800
	H_o	0,196	0,037	0,113	0,247	0,077	0,242	0,494	0,143	0,128	0,000	0,350
	H_e	0,243	0,054	0,127	0,385	0,074	0,229	0,428	0,133	0,120	0,000	0,320
	F	0,194	0,314	0,106	-0,358	0,040	-0,059	-0,154	-0,077	-0,068	-	-0,094
EST3	1	0,891	0,949	0,968	0,990	0,256	0,913	0,684	0,929	0,974	0,840	0,875
	2	0,109	0,051	0,032	0,010	0,744	0,087	0,316	0,071	0,026	0,160	0,125
	H_o	0,217	0,102	0,064	0,019	0,359	0,163	0,354	0,143	0,051	0,320	0,250
	H_e	0,194	0,097	0,062	0,019	0,381	0,159	0,433	0,133	0,050	0,269	0,219
	F	-0,122	-0,054	-0,033	-0,010	0,059	-0,029	0,181	-0,077	-0,026	-0,190	-0,143
EST8	1	0,141	0,005	0,085	0,003	0,000	0,089	0,013	0,000	0,103	0,100	0,763
	2	0,152	0,102	0,058	0,208	0,000	0,200	0,108	0,000	0,154	0,120	0,238
	3	0,707	0,894	0,857	0,789	1,000	0,711	0,880	1,000	0,744	0,780	0,000
	H_o	0,370	0,176	0,185	0,026	0,000	0,379	0,177	0,000	0,282	0,400	0,225
	H_e	0,458	0,191	0,256	0,334	0,000	0,447	0,214	0,000	0,413	0,367	0,362
	F	0,193	0,080	0,277	0,922	-	0,153	0,173	-	0,317	-0,089	0,379

выборки ограниченной численности, содержащие лишь небольшую часть популяционного аллелофонда, в каждой группе было оценено общее количество мультилокусных генотипов (N_{MLG}) и число уникальных мультилокусных генотипов (N_{MLG-1}), т. е. тех комбинаций, которые были отмечены в одной-единственной выборке. В дальнейшем, основываясь на распределении частот мульт-

тилокусных генотипов, для каждой популяции было вычислено потенциальное генетическое разнообразие, ожидаемое при увеличении объема выборки до бесконечности (N_{max}). Анализ проводили с помощью двух непараметрических методов: метод Chao1-bc (bias-corrected form for the Chao1) [23] и метод «сломанного ножа» первого порядка (1^{st} order jackknife) [24].

Таблица 3

Показатели генетического разнообразия в популяциях *C. vindobonensis*, полученные на основе анализа аллозимов
Parameters of genetic diversity in the populations of *C. vindobonensis*, derived from allozyme analysis

Пункт	<i>N</i>	<i>N_e</i>	<i>P</i> %	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>I_{sh}</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F</i>	<i>N_e/N</i>
1	46	42,3	100,0	2,33 ± ± 0,33	1,47 ± ± 0,19	0,520 ± ± 0,145	0,261 ± ± 0,055	0,298 ± ± 0,081	0,088 ± ± 0,105	0,919
2	108	96,9	100,0	2,33 ± ± 0,33	1,13 ± ± 0,05	0,229 ± ± 0,068	0,105 ± ± 0,04	0,114 ± ± 0,041	0,114 ± ± 0,108	0,898
3	265	237,5	100,0	2,33 ± ± 0,33	1,18 ± ± 0,08	0,299 ± ± 0,109	0,121 ± ± 0,035	0,148 ± ± 0,057	0,116 ± ± 0,09	0,896
4	154	108,1	100,0	2,33 ± ± 0,33	1,38 ± ± 0,18	0,387 ± ± 0,166	0,097 ± ± 0,075	0,246 ± ± 0,114	0,424 ± ± 0,271	0,702
5	39	29,1	66,7	1,67 ± ± 0,33	1,23 ± ± 0,19	0,244 ± ± 0,169	0,145 ± ± 0,109	0,152 ± ± 0,117	0,340 ± ± 0,331	0,746
6	190	186,1	100,0	2,33 ± ± 0,33	1,43 ± ± 0,19	0,488 ± ± 0,149	0,261 ± ± 0,063	0,278 ± ± 0,087	0,021 ± ± 0,066	0,979
7	79	74,0	100,0	2,33 ± ± 0,33	1,59 ± ± 0,16	0,550 ± ± 0,071	0,342 ± ± 0,092	0,358 ± ± 0,072	0,067 ± ± 0,11	0,937
8	14	10,9	66,7	1,67 ± ± 0,33	1,10 ± ± 0,05	0,172 ± ± 0,086	0,095 ± ± 0,048	0,088 ± ± 0,044	0,282 ± ± 0,359	0,780
9	39	36,3	100,0	2,33 ± ± 0,33	1,30 ± ± 0,20	0,366 ± ± 0,191	0,154 ± ± 0,068	0,194 ± ± 0,111	0,074 ± ± 0,122	0,931
10	25	20,2	66,7	2,00 ± ± 0,58	1,32 ± ± 0,17	0,373 ± ± 0,199	0,24 ± ± 0,122	0,212 ± ± 0,11	0,24 ± ± 0,381	0,806
11	40	38,2	100,0	2,00 ± ± 0,00	1,44 ± ± 0,08	0,475 ± ± 0,051	0,275 ± ± 0,038	0,300 ± ± 0,043	0,047 ± ± 0,166	0,955
Среднее			90,9 ± 4,7	2,15 ± ± 0,32	1,33 ± ± 0,14	0,373 ± ± 0,128	0,191 ± ± 0,068	0,217 ± ± 0,080	0,165 ± ± 0,192	0,868 ± ± 0,028

Примечание. *N* — количество проанализированных особей; *N_e* — эффективная численность популяций; *P* % — процент полиморфных локусов; *A* — среднее число аллелей на локус; *A_e* — эффективное число аллелей; *I_{sh}* — индекс Шеннона; *H_e* — ожидаемая гетерозиготность

Таблица 4

Усредненные по совокупности ДНК-локусов меры генетической гетерогенности в популяциях *C. vindobonensis*
Parameters of the genetic heterogeneity in the populations of *C. vindobonensis*, averaged over the set of DNA loci

Пункт	<i>N</i>	Частоты аллелей		<i>P</i> %	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>H_e</i>	<i>I_{sh}</i>
		<i>p</i>	<i>q</i>					
1	30	0,351	0,649	85,7	1,86 ± 0,06	1,35 ± 0,05	0,219 ± 0,029	0,345 ± 0,04
2	19	0,278	0,722	68,6	1,69 ± 0,08	1,22 ± 0,05	0,146 ± 0,026	0,242 ± 0,038
3	120	0,340	0,660	74,3	1,74 ± 0,07	1,24 ± 0,05	0,160 ± 0,028	0,257 ± 0,041
4	64	0,330	0,670	80,0	1,80 ± 0,07	1,31 ± 0,06	0,193 ± 0,03	0,303 ± 0,043
5	39	0,336	0,664	40,0	1,58 ± 0,01	1,08 ± 0,01	0,178 ± 0,005	0,29 ± 0,007
6	40	0,319	0,681	31,4	1,47 ± 0,002	1,01 ± 0,002	0,165 ± 0,001	0,267 ± 0,001
7	53	0,337	0,663	71,4	1,71 ± 0,08	1,22 ± 0,05	0,142 ± 0,028	0,232 ± 0,04
8	24	0,398	0,602	54,3	1,54 ± 0,08	1,23 ± 0,05	0,143 ± 0,03	0,223 ± 0,044
9	34	0,363	0,637	57,1	1,57 ± 0,08	1,26 ± 0,06	0,154 ± 0,032	0,237 ± 0,046
10	25	0,178	0,822	68,6	1,69 ± 0,08	1,32 ± 0,06	0,191 ± 0,033	0,292 ± 0,047
11	40	0,387	0,613	51,4	1,51 ± 0,09	1,18 ± 0,05	0,112 ± 0,028	0,178 ± 0,041
Среднее		0,329 ± 0,018	0,671 ± 0,018	62,1 ± 1,5	1,65 ± 0,06	1,22 ± 0,04	0,164 ± 0,024	0,260 ± 0,035

Таблица 5

Количество отмеченных мультилокусных генотипов аллозимов и оценки потенциального генетического разнообразия, полученные разными методами для исследованных популяций *C. vindobonensis*
Ilozyme genotypes and assess the potential of genetic diversity obtained by different methods for the investigated populations of the *C. vindobonensis*

Популяция	N_{MLG}	N_{MLG-1}	Метод			
			Chao1-bc		1st order jackknife	
			$N_{max} \pm SE$	95 % CI	$N_{max} \pm SE$	95 % CI
1	16	0	22,8 ± 6,5	17,4–49,1	23,8 ± 3,9	19,1–35,8
2	9	0	10,5 ± 2,6	9,1–24,0	12,0 ± 2,4	9,7–21,1
3	17	0	20,3 ± 4,1	17,5–39,0	22 ± 3,2	18,6–32,5
4	8	1	8,5 ± 1,3	8,0–16,2	10,0 ± 2,0	8,4–18,2
5	5	0	5,2 ± 0,7	5,0–9,6	6,0 ± 1,4	5,1–12,7
6	20	1	23,3 ± 4,1	20,5–42,0	25,0 ± 3,1	21,6–35,5
7	20	5	28,9 ± 7,5	22,1–57,6	29,9 ± 4,4	24,3–42,9
8	2	0	2,0 ± 0,0	2,0–2,0	2,0 ± 0,0	2,0–2,0
9	9	0	10,5 ± 2,5	9,1–23,7	11,9 ± 2,4	9,7–20,9
10	6	0	7,0 ± 2,1	6,1–19,2	7,9 ± 1,9	6,4–15,9
11	11	4	12,0 ± 1,8	11,1–21,5	13,9 ± 2,4	11,7–23,0

Таблица 6

Усредненные по совокупности локусов меры генетической дифференциации и гетерогенности для популяции *C. vindobonensis* по аллозимам
Averages of genetic differentiation and heterogeneity of the population of *C. vindobonensis* on set of the allozymes loci

Параметры	<i>EST2</i>	<i>EST3</i>	<i>EST8</i>	Среднее
H_e	0,192	0,183	0,277	0,217
H_o	0,184	0,186	0,202	0,191
F_{is}	0,040	-0,014	0,271	0,099
F_{it}	0,123	0,299	0,487	0,303
F_{st}	0,087	0,309	0,297	0,231
Nm	2,628	0,558	0,591	0,832
df	9	9	22	40
χ^2	38,4	6,0	218,9	263,3
P	0,000	0,700	0,000	0,000

Примечание. F_{it} — коэффициент инбридинга особи относительно большой популяции; F_{is} — коэффициент инбридинга особи относительно субпопуляции; F_{st} — коэффициент инбридинга субпопуляции относительно большой популяции; P — вероятность значимости критерия χ^2 ; df — число степеней свободы

Все расчеты были проведены с помощью программы SPADE [25]. Результаты анализа мультилокусных генотипов представлены в таблице 5.

Следующим этапом наших исследований была оценка уровня подразделенности популяций *C. vindobonensis* на изучаемых территориях. Для описания генетической дифференциации популяций на разных уровнях иерархической структуры по аллозимам была применена модель С. Райта [26] (табл. 6). Кроме того, уровень разобщенности популяций был вычислен на основе модели

М. Неи [27] (табл. 7), а также с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) [28] (табл. 8, 9). Результаты кластерного анализа на основе генетических расстояний невзвешенным парногрупповым методом (UPGMA) представлены на рисунке 3, а график зависимости уровня потока генов от географических дистанций между группами — на рисунке 4.

На заключительном этапе нами была проведена оценка эффективной численности популяций *C. vindobonensis* с использованием различных моделей.

Таблица 7

Показатели генетической дифференциации популяций *C. vindobonensis* по ДНК-локусам
Parameters of genetic differentiation of the populations of *C. vindobonensis* for DNA loci

Локус	№	H_t	\bar{H}_s	G_{st}
ОРА10	1	0,163	0,135	0,172
	2	0,167	0,147	0,118
	3	0,414	0,247	0,405
	4	0,123	0,091	0,258
	5	0,497	0,348	0,300
	6	0,157	0,141	0,106
	7	0,221	0,175	0,207
	8	0,100	0,061	0,395
	9	0,081	0,064	0,210
	10	0,197	0,166	0,158
	11	0,387	0,149	0,616
	12	0,232	0,152	0,345
	13	0,037	0,036	0,028
	14	0,043	0,037	0,149
	15	0,274	0,140	0,489
	16	0,424	0,210	0,505
	17	0,021	0,021	0,035
SAS3	1	0,500	0,376	0,248
	2	0,045	0,042	0,053
	3	0,212	0,193	0,087
	4	0,216	0,203	0,061
	5	0,054	0,052	0,043
	6	0,362	0,292	0,193
	7	0,024	0,023	0,034
	8	0,494	0,363	0,266
	9	0,015	0,014	0,016
	10	0,334	0,269	0,196
	11	0,031	0,030	0,031
	12	0,405	0,279	0,310
	13	0,054	0,048	0,100
	14	0,120	0,115	0,043
	15	0,371	0,334	0,100
	16	0,202	0,165	0,181
	17	0,028	0,028	0,022
	18	0,006	0,006	0,031
Среднее		$0,200 \pm 0,028$	$0,147 \pm 0,020$	0,265

Примечание. G_{st} — доля межпопуляционного генного разнообразия в общем разнообразии; H_t — ожидаемая доля гетерозиготных генотипов во всей популяции; \bar{H}_s — среднее для всех субпопуляций значение внутрипопуляционного разнообразия

Первый способ расчета был проведен на основании коэффициента инбридинга: $N_e = N / (1 + F)$ [29]. Для получения сопоставимых данных мы вычислили отношение эффективного размера выборки к ее общему объему (см. табл. 3).

Второй способ расчета основан на коэффициентах линейной функции между попарными оценками потока генов (N_m) и географического расстояния между популяциями (Dg): $\log N_m = a + b \cdot \log Dg$. Эффективную численность популяции (для всех исследованных попу-

Таблица 8

Результат анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) в популяциях *C. vindobonensis*
The result of analysis of molecular variance (AMOVA) of the populations of *C. vindobonensis*

Маркеры	Изменчивость	df	SS	MS	V	%	Φ_{st}	P	Nm
Аллозимы	Между популяциями	10	241,052	24,105	0,277	26	0,263	0,010	0,676
	Внутри популяций	988	767,090	0,776	0,776	74			
	Итого	998	1008,142	24,882	1,053	—			
ДНК	Между популяциями	10	401,573	40,157	0,882	26	0,261	0,010	0,630
	Внутри популяций	477	1187,796	2,490	2,490	74 %			
	Итого	487	1589,369	42,647	3,372	—			

Таблица 9

Попарные оценки генетической дифференциации (Φ_{st}) между исследованными популяциями *C. vindobonensis* по изоферментным локусам и ДНК-маркерам

Pairwise genetic differentiation (Φ_{st}) between populations of the *C. vindobonensis* at allozyme loci and DNA markers

Аллозимы											
Пункт	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		0,010	0,010	0,030	0,010	0,410	0,010	0,010	0,260	0,090	0,010
2	0,124		0,020	0,010	0,010	0,010	0,010	0,170	0,010	0,010	0,010
3	0,076	0,021		0,010	0,010	0,010	0,010	0,110	0,020	0,010	0,010
4	0,050	0,129	0,119		0,010	0,010	0,010	0,030	0,010	0,010	0,010
5	0,546	0,708	0,665	0,542		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
6	0,000	0,090	0,072	0,049	0,549		0,010	0,010	0,260	0,040	0,010
7	0,136	0,296	0,297	0,146	0,360	0,175		0,030	0,010	0,010	0,010
8	0,106	0,032	0,028	0,099	0,673	0,112	0,177		0,030	0,010	0,010
9	0,008	0,062	0,025	0,063	0,649	0,008	0,230	0,110		0,040	0,010
10	0,030	0,084	0,070	0,134	0,587	0,042	0,188	0,135	0,036		0,010
11	0,463	0,729	0,683	0,513	0,765	0,513	0,567	0,667	0,544	0,571	
ДНК											
Пункт	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
2	0,174		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
3	0,165	0,283		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
4	0,071	0,165	0,087		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
5	0,172	0,215	0,164	0,150		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
6	0,410	0,527	0,412	0,399	0,489		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
7	0,082	0,117	0,179	0,103	0,085	0,437		0,010	0,010	0,010	0,010
8	0,135	0,305	0,337	0,222	0,378	0,602	0,169		0,010	0,010	0,010
9	0,183	0,310	0,164	0,107	0,301	0,522	0,156	0,252		0,010	0,010
10	0,338	0,247	0,402	0,321	0,438	0,427	0,368	0,482	0,436		0,010
11	0,215	0,392	0,184	0,176	0,347	0,588	0,204	0,353	0,161	0,521	

Под диагональю приведены оценки Φ_{st} , а над диагональю — уровень их значимости (на основе 99 пермутаций)

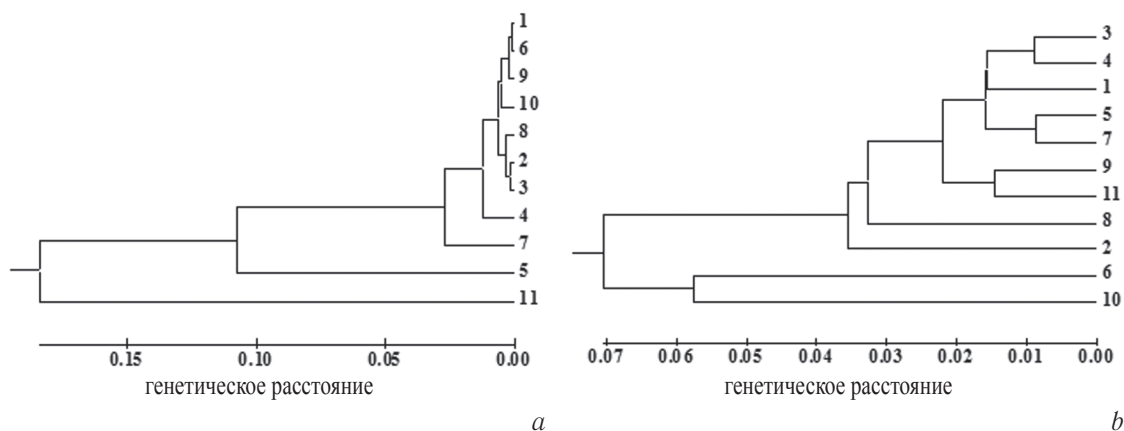


Рис. 3. Дендрограмма генетических расстояний по Неи [33] (UPGMA) между популяциями *C. vindobonensis* по изоферментным локусам (a) и ДНК-маркерам (b)

Fig. 3. The dendrogram of genetic distances by Nei [33] (UPGMA) between populations of the *C. vindobonensis* at allozyme loci (a) and DNA markers (b)

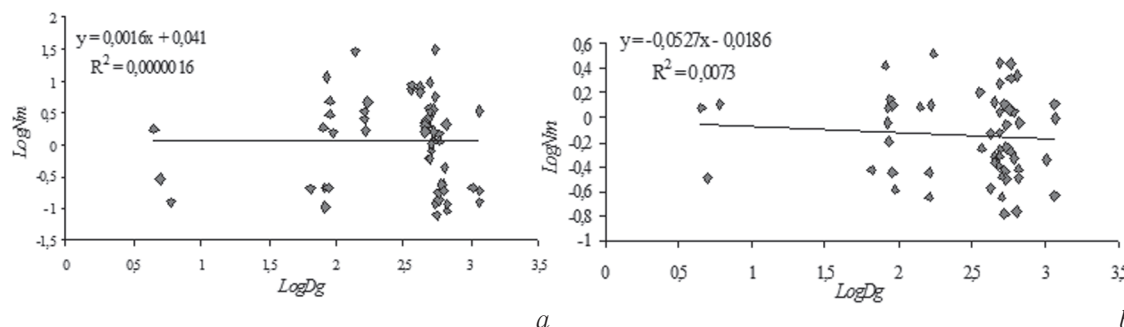


Рис. 4. Линейная регрессия логарифма потока генов N_m между парами популяций *C. vindobonensis* на логарифм географического расстояния между ними D_g (a — по аллозимам, b — по ДНК-маркерам)

Fig. 4. The linear regression logarithm of gene flow N_m between the populations pairs *C. vindobonensis* on logarithm geographic distance D_g between them (a — for Allozymes, b — for DNA markers)

Таблица 10

Значения эффективной численности, рассчитанные на основе коэффициентов линейной функции между парными оценками потока генов (N_m) и географического расстояния между популяциями различных видов наземных моллюсков

The values of the effective number calculated on the basis of a linear function coefficients between pairwise estimates of gene flow (N_m) and geographic distances between populations of the different species of terrestrial molluscs

Виды	Изоферменты		ДНК	
	N_e	95 %, Δ	N_e	95 %, Δ
<i>Helix pomatia</i>	9,8	3,9–25,1	3,1	2,0–4,9
<i>Bradybaena fruticum</i>	4,1	2,2–7,6	1,7	1,2–2,5
<i>Chondrula tridens</i>	3,8	2,6–5,7	1,2	0,8–1,8
<i>Helicopsis striata</i>	5,1	2,6–10,0	1,9	1,3–2,7
<i>Cerpea vindobonensis</i>	1,1	0,14–8,5	0,96	0,36–2,6

Данные по *Br. fruticum*, *Ch. tridens*, *H. striata* и *H. pomatia* взяты из наших предыдущих публикаций [38–44]. То же и для таблицы 11

ляций в целом) вычисляли как $N_e = 10^a$, где a — коэффициент, полученный в уравнении [30]. Используемые

уравнения приведены на рисунке 4. Полученные результаты приведены в таблице 10.

Еще один примененный нами способ вычисления эффективного размера популяций основан на модели, в которой учитываются значения индекса подразделенности популяции [31]:

$$F_{st} = \frac{1-t_k}{1+t_k}, \text{ где}$$

$$t_k = \exp - \left\{ \left[\frac{1}{N_e} [\ln(K-0,5)+0,5772] + \left(\frac{1}{2 \cdot N_e^2} \right) \left[1,6449 \frac{2}{2 \cdot K-1} \right] + \left(\frac{1}{3 \cdot N_e^3} \right) \left[1,202 \frac{2}{(2 \cdot K-1)^2} \right] \right] \right\},$$

где K — количество использованных популяций. Ввиду того что для определения степени подразделенности популяций в данной работе нами вместе с индексом 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. Результаты приведены в таблице 11.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным по аллозимам (см. табл. 2) в 30,3 % случаев наблюдается достоверный дефицит гетерозигот², в остальных вариантах достоверных отличий между фактической и теоретической гетерозиготностью не зафиксировано. Об этом же свидетельствуют данные, приведенные на рисунке 5, где намечается незначительный тренд в сторону дефицита гетерозигот, при этом коэффициент регрессии оказался равным $0,958 \pm 0,195$ (при $p = 0,05$).

Согласно данным, приведенным в таблице 3, среди исследуемых шести популяций юга Среднерусской возвышенности (пункты 1–6) наименьший уровень измен-

² Достоверность дефицита гетерозигот оценивалась по формуле $\chi^2 = F^2N(k-1)$, $df = k-1$, где F — коэффициент инбридинга, N — объем выборки, k — число аллелей по данному локусу [29].

Таблица 11

Значения эффективной численности в популяциях различных видов, вычисленные на основе индексов подразделенности (F_{st} , G_{st} и Φ_{st})
The values of the effective number of the populations of different species, calculated on the basis of subdivision index (F_{st} , G_{st} и Φ_{st})

Показатель	<i>Br. fruticum</i> ($K = 35$)	<i>Ch. tridens</i> ($K = 25$)	<i>H. striata</i> ($K = 19$)	<i>H. pomatia</i> ($K = 12$)	<i>C. vindobonensis</i> ($K = 11$)
N_e (F_{st} по аллозимам)	9,2	10,5	4,9	5,3	6,0
N_e (Φ_{st} по аллозимам)	7,0	6,2	3,5	3,1	6,1
N_e (G_{st} по ДНК)	7,3	10,3	4,9	5,9	6,6
N_e (Φ_{st} по ДНК)	6,2	9,9	4,4	3,8	6,3
Среднее	$7,4 \pm 0,6$	$9,2 \pm 1,0$	$4,4 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,6$	$6,3 \pm 0,1$

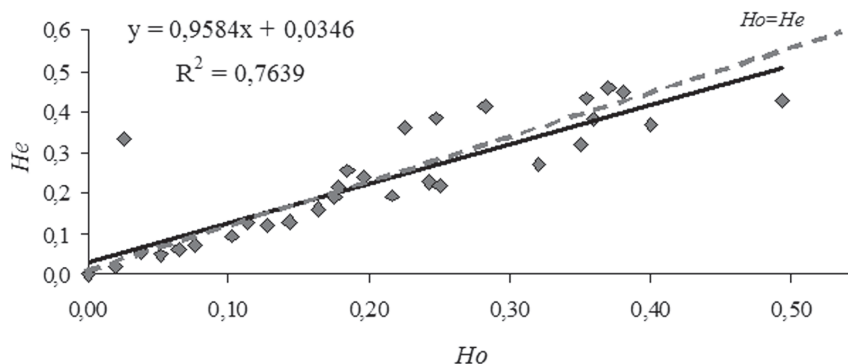


Рис. 5. Соотношение теоретической (H_e) и фактической гетерозиготности (H_o) в популяциях *C. vindobonensis*
Fig. 5. The ratio of expected (H_e) and observed heterozygosity (H_o) in the populations of *C. vindobonensis*

чивости и повышенное значение коэффициента инбридинга по изоферментным локусам отмечены в группах из пунктов «Валуйки» (№ 4), «Ржевка» (№ 5) и «Хотмыжск» (№ 2). За пределами Среднерусской возвышенности самой мономорфной оказалась группа с острова Хортица (№ 8). В последнем случае низкие показатели генетической изменчивости возможны из-за обособленности и малочисленности островной группы. Наиболее полиморфными в восточной части ареала являются естественные популяции из пунктов «Головчино» (№ 1) и «Купянск» (№ 6), а в западной части — популяция из пункта «Житомир» (№ 7). Также весьма высокими показателями генетической изменчивости отличается адвентивная колония из г. Пензы (№ 11). Анализ мультилокусной изменчивости по аллозимам во многом подтвердил эти выводы (см. табл. 5). Наибольшее фактическое и потенциальное генетическое разнообразие отмечено в пунктах 1, 3, 6 и 7. Также в пунктах 7 и 11 отмечено наибольшее количество уникальных генотипов (N_{MLG-1}). Самой однообразной оказалась группа с острова Хортица (№ 8).

Судя по усредненным по совокупности ДНК-локусов показателям генетической гетерогенности (см. табл. 5), наиболее мономорфными оказались популяции «Ржевка» (№ 5) и «Купянск» (№ 6). В отношении пятой группы такой результат является закономерным, так как по изоферментным маркерам здесь также наблюдалось снижение аллельного разнообразия³. Однако шестая группа по аллозимам отличалась повышенной изменчивостью. Из популяций, обитающих за пределами Среднерусской возвышенности, самой мономорфной оказалась адвентивная популяция из г. Пенза (№ 11). Полученный результат выглядит несколько неожиданным, так как по аллозимам эта группа выделяется среди остальных большей гетерогенностью. Кроме того, согласно полученным ранее данным эта колония отличалась высоким разнообразием цветовых вариантов раковины [15]. В этой связи мы полагаем, что этот случай еще раз демонстрирует различие генетических процессов, протекающих в кодирующей части генома, подверженных естественному отбору, и подчиняющихся генетико-автоматическим законам в остальной части «молчащей» ДНК. Ранее мы уже пытались объяснить значительную морфологическую изменчивость этой колонии особыми микроклиматическими условиями городской среды, а также конкурентным вакуумом и отсутствием хищников [15]. В формате этих рассуждений повышенная мономорфность, выявленная по ДНК-маркерам, вероятно, есть результат генетического дрейфа, вызванного «эффектом основателя».

В отношении отдельных ДНК-локусов наиболее полиморфными среди *RAPD*-маркеров являются локусы

³ Данное явление, вероятно, обусловлено колебаниями численности из-за выжигания сухой растительности в весенний период, наблюдаемого в этом пункте, в результате чего особи, находящиеся в активной фазе, погибают.

3, 5 и 16, а среди *ISSR*-маркеров более изменчивыми оказались локусы 1, 8 и 15 (табл. 7). В группу более мономорфных локусов по праймеру *OPA10* вошли локусы 8, 9, 13, 14 и 17, а по праймеру *SAS3* — локусы 2, 5, 7, 9, 11, 13, 17 и 18. Примечательно, что в среднем гетерозиготность по *RAPD*-локусам ($H_t = 0,208 \pm 0,035$, $H_s = 0,136 \pm 0,020$) достоверно не отличается от гетерозиготности по *ISSR*-локусам ($H_t = 0,192 \pm 0,041$, $H_s = 0,157 \pm 0,031$).

В целом стоит отметить, что уровень изменчивости популяций *C. vindobonensis* на юге Среднерусской возвышенности не уступает, а в некоторых случаях превосходит аналогичный уровень изменчивости в западных группах, что, полагаем, является положительным сигналом в плане оценки жизнеспособности популяций этого вида.

Оценка степени дифференциации популяций по аллозимным локусам с использованием *F*-статистики С. Райта в среднем показала довольно большую разобщенность изучаемых групп улиток (см. табл. 6). Аналогичную картину мы наблюдаем при сопоставлении данных, полученных на основе анализа молекулярной дисперсии (AMOVA, см. табл. 8). В обоих случаях показатель интенсивности обмена генами между популяциями (*Nm*) оказался меньше единицы, что согласно «теории эволюции со смещающимся равновесием» нарушает панмиксию между популяциями [31]. Об этом же свидетельствуют и относительно высокие значения коэффициента инбридинга F_{it} . При этом нужно отметить, что наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие, оцениваемое по коэффициенту инбридинга F_{st} (см. табл. 6), вносит локус *EST3*. Однако тест на гетерогенность с помощью критерия χ^2 достоверного разделения групп по этому локусу не выявил ($p = 0,7$).

По используемым ДНК-маркерам наибольшая разобщенность отмечается по локусам № 11, 15, 16 (*OPA10*) и № 1, 8, 10, 12 (*SAS3*) (см. табл. 7). Известно, что средние величины G_{st} соответствуют уровню генетической дифференциации при селективно-нейтральном процессе. В таком случае локусы с большими значениями G_{st} , вероятнее всего, могут испытывать действие дизруптивного отбора, а локусы с низкими показателями индекса подразделенности подвержены влиянию стабилизирующего отбора [32]. При этом различия по *RAPD*-спектрам ($G_{st} = 0,264$) оказались выше, чем по *ISSR*-спектрам ($G_{st} = 0,112$).

Анализ молекулярной дисперсии как по аллозимам, так и по ДНК-маркерам продемонстрировал сходную картину. И в том и в другом случае на внутривидовую изменчивость пришлось 26 %, а показатели подразделенности популяций Φ_{st} незначительно отличаются от индексов F_{st} и G_{st} . Соответственно, уровень потока генов (N_m) составил 0,630–0,676 особи за поколение (см. табл. 8).

Результаты кластерного анализа продемонстрировали явное отличие в расхождении групп по кластерам между дендрограммами, построенными на основе аллозимов и маркеров ДНК (см. рис. 3). При этом в обоих случаях географическое положение популяций не оказывает влияния на схожесть в соотношении частот аллелей и их комбинаций. Так, например, соседние популяции, обитающие в долине реки Ворскла (пункты 1, 2), несмотря на близкое пространственное расположение, оказались, согласно схемам, в разных кластерах. При этом уровень дифференциации между ними по аллозимам составил $\Phi_{st} = 0,124$, а по ДНК-маркерам — $\Phi_{st} = 0,174$ ($p = 0,01$) (см. табл. 9). Примечательно, что такой оригинальности мог способствовать антропогенный прессинг. Дело в том, что группа «Хотмыжск» (№ 2) обитает на распахивавшихся ранее пойменных участках, которые заброшены человеком более 30 лет назад. Освоение этой территории, вероятно, происходило из сохранившихся естественных островков пойменной растительности, в которых остались небольшие группы улиток. Испытав так называемый «эффект бутылочного горлышка» и, возможно, «эффект генетической революции» [34], группа стала более мономорфной по сравнению с популяцией «Головчино» (№ 1), обитающей в естественном лесном биотопе. Данный факт, вероятно, свидетельствует о склонности вида к образованию метапопуляционной структуры в условиях урбанизированной территории юга Среднерусской возвышенности [35].

Наиболее оригинальной группой в отношении генетических комбинаций изоферментных маркеров является колония из г. Пензы (№ 11). Именно здесь зафиксирована высокая частота аллеля *EST8-1* (0,763). Во всех других популяциях его доля не превышает 0,141. Это явление можно рассматривать либо как следствие дрейфа генов из-за «принципа основателя», либо как результат естественного отбора в городской среде.

По ДНК-маркерам дальше всех дистанцируется группа «Купянск» (№ 6) и группа «ЮТЗ» из г. Николаева (№ 10). Причем последняя популяция значительно отличается не только от удаленных групп, но и от соседней группы, обитающей в том же городе (№ 9). Уровень дифференциации между ними достиг $\Phi_{st} = 0,436$ ($p = 0,01$) (см. табл. 9), что свидетельствует о значительной изоляции колоний улиток в урбанизированной среде. При этом стоит отметить, что полученные нами данные отчасти не согласуются с предположением С.С. Крамаренко [14], согласно которому в городских условиях изучаемая автором группа *C. vindobonensis* существует в виде множества дискретных, полуизолированных колоний, что отвечает «островной модели» Райта.

Данные кластерного анализа подтверждаются графиками и уравнениями линейной регрессии (см. рис. 4), которые демонстрируют отсутствие корреляции между географическими дистанциями и попарными оценками потока генов как по аллозимам (мантель-

тест $R_M = 0,001$, $p = 0,518$, 9999 перестановок), так и по ДНК-маркерам ($R_M = -0,085$, $p = 0,315$, 9999 перестановок). Все это говорит о нарушении каналов миграции между изучаемыми группами *C. vindobonensis* и их длительной изоляции друг от друга.

Расчет эффективной численности популяций *C. vindobonensis* с помощью коэффициента инбридинга показал, что отношение эффективного размера к общей численности популяции (N_e/N) в целом для вида равно $0,868 \pm 0,028$ (см. табл. 3), что укладывается в общий диапазон доли N_e , предложенный Кроу и др. [36, 37]⁴. Кроме того, среднее значение доли N_e , полученное для *C. vindobonensis*, достоверно превышает аналогичные значения, полученные нами ранее для аборигенных фоновых видов наземных моллюсков, обитающих в районе исследования: *Br. fruticum* — $0,800 \pm 0,021$, *Ch. tridens* — $0,661 \pm 0,013$ [38, 39], а также для реликтового моллюска *Helicopsis striata* — $0,720 \pm 0,080$ [39, 40]. При этом доля эффективной численности *C. vindobonensis* оказалась сопоставимой с аналогичным показателем у обитающей здесь виноградной улитки *Helix pomatia* — $0,870 \pm 0,043$, имеющей высокий жизненный потенциал [41]. Все эти данные косвенно указывают на высокий уровень жизнеспособности изучаемых популяций австрийской улитки.

Сопоставление полученных оценок эффективного размера популяций *C. vindobonensis*, вычисленных на основе уравнения линейной регрессии, с аналогичными данными по другим видам моллюсков демонстрирует явное уменьшение этого показателя в группах австрийской улитки (табл. 10), хотя рассчитанные доверительные интервалы показывают, что достоверные отличия отсутствуют.

Несколько иной результат был получен нами при вычислении эффективной численности с учетом уровня подразделенности популяций (табл. 11). Согласно полученным данным наибольший эффективный размер популяций имеют *Ch. tridens* и *Br. fruticum*. В популяциях *C. vindobonensis* эффективный размер оказался ниже, чем у этих двух фоновых видов, и выше, чем у *H. striata* и *H. pomatia*, относящихся к уязвимым моллюскам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исходя из приведенных данных, в целом можно констатировать, что с точки зрения генетических параметров по сравнению, например, с уязвимым видом *H. striata*, обитающего зачастую в одних и тех же сообществах с *C. vindobonensis*, изучаемые популяции австрийской улитки имеют более высокий жизненный потенциал. Это обеспечено отчасти тем, что *C. vindobonensis* эвритопный вид. Благодаря полиморфизму популяции этих улиток могут обитать на откры-

⁴ Авторы определили, что для большинства организмов доля N_e составляет в среднем 0,75.

тых остепненных склонах, в лесных сообществах и на припойменных участках. Отмечены случаи успешного освоения моллюсками садов и огородов. Тем не менее снижение аллельного разнообразия, повышение коэффициента инбридинга в ряде групп и высокий уровень изоляции популяций *C. vindobonensis* в северо-восточной части ареала вызывает обеспокоенность и требует корректировки природоохранных мероприятий в отношении этого вида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность Т. Г. Стойко и С. С. Крамаренко за предоставленный материал для анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шилейко А.А. Наземные моллюски надсемейства Helicoidea. Фауна СССР. Моллюски. — Л.: Наука, 1978. — Т. 3. — Вып. 6. — 384 с. [Shileiko AA. Terrestrial mollusks superfamily Helicidae. Fauna of the USSR. Shellfish. Leningrad: Nauka; 1978;3(6):384. (In Russ).]
2. Снегин Э.А. Использование видов наземных моллюсков в качестве индикаторов реликтовых ценозов // Вестник Житомирского педагогического университета. — 2002. — Вып. 10. — С. 128–129. [Snegin EA. The use of species of terrestrial molluscs as a relic cenoses indicators. *Vestnik Zhitomirskogo pedagogicheskogo universiteta*. 2002;10:128-129. (In Russ).]
3. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. — Белгород, 2004. — 532 с. [The Red Book of the Belgorod region. Rare and endangered plants, fungi, lichens and animals. Belgorod; 2004. 532 p. (In Russ).]
4. Rotarides M. Über die Bändervariationen von *Cepaea vindobonensis* *Fér Zool Anz*. 1926;67(½):28-44.
5. Jones JS. Environmental selection in the snail *Cepaea vindobonensis* in the Lika area of Yugoslavia. *Heredity*. 1974;32(2):165-170. doi: 10.1038/hdy.1974.20.
6. Jones JS. The genetic structure of some steppe populations of the snail *Cepaea vindobonensis*. *Genetica*. 1975;45:217-225. doi: 10.1007/BF01517198.
7. Sacchi CF. Population ecology of *Cepaea nemoralis* and *C. vindobonensis* along the north Adriatic coasts of Italy. *Malacologia*. 1984;25(2):315-323.
8. Хлус Л.М., Хлус К.М. Конхиологичні особливості буковинських популяцій *Cepaea vindobonensis* Fer. (Geophyla, Helicidae) // Матеріали конф. «Гори і люди (у контексті сталого розвитку)». — Рахів, 2002. — Т. 2. — С. 522–526. [Khilus LM, Khilus KM. Konkhiologichni osoblivosti bukovin'skikh populyatsii *Cepaea vindobonensis* Fer. (Geophyla, Helicidae). Materiali konf. "Gori i lyudi (u konteksti stalogo razvitku)" (conference proceedings). Rakhiv; 2002;2:522-526. (In Ukrainian).]
9. Honek A. Shell-band color polymorphism in *Cepaea vindobonensis* at the northern limit of its range. *Malacologia*. 2003;25:133-140.
10. Сверлова Н.В., Кирпан С.П. Фенетична структура популяцій *Cepaea vindobonensis* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae) на заході України // Наук. зап. Держ. природозн. музею. — Львів, 2004. — Т. 19. — С. 107–114. [Sverlova NV, Kirpan SP. Phenetic Structure of Populations of *Cepaea vindobonensis* (Gastropoda, Pulmonata; Helicidae) in Western Ukraine. *Naukovi Zapiski DPM*. 2004;19:107-114. (In Ukrainian).]
11. Гураль-Сверлова Н.В., Мартынов В.В. Конхологические особенности популяций *Cepaea vindobonensis* на территории Донецкой области // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. — Донецк: Изд-во Донецкого национального ун-та, 2007. — Вып. 7. — С. 85–91. [Gural'-Sverlova NV, Martynov VV. Conchological particular populations of *Cepaea vindobonensis* on the territory of Donetsk region. In: Problems of Ecology and Nature Protection technogenic region. Donetsk: Publishing House of the Donetsk National University Press; 2007;7:85-91. (In Russ).]
12. Крамаренко С.С., Хохуткин И.М., Гребенников М.Е. Особенности фенетической структуры наземного моллюска *Cepaea vindobonensis* в урбанизированных и природных популяциях // Экология. — 2007. — № 1. — С. 42–48. [Kramarenko SS, Khokhutkin IM, Grebennikov ME. Specific Features of Phenetic Structure of the Terrestrial Snail *Cepaea vindobonensis* (Pulmonata; Helicidae) in Urbanized and Natural Populations. *Russian J of Ecology*. 2007;38(1):39-45. (In Russ).] doi: 10.1134/S1067413607010079.
13. Ożgo M, Komorowska A. Shell banding polymorphism in *Cepaea vindobonensis* in relation to habitat in southeastern Poland. *Malacologia*. 2009;51(1):81-88. doi: 10.4002/040.051.0105.
14. Крамаренко С.С. Анализ генетической структуры популяций наземного моллюска *Cepaea vindobonensis* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae) с использованием RAPD-маркера // Вестник зоологии. — 2009. — Т. 43. — № 5. — С. 449–455. [Kramarenko SS. Analysis of the genetic structure of terrestrial mollusk populations of *Cepaea vindobonensis* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae) using RAPD-marker. *Vestnik zoologii*. 2009;43(5):449-455. (In Russ).]
15. Снегин Э.А. Оценка жизнеспособности популяций особо охраняемого вида *Cepaea vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях юга лесостепи Среднерусской возвышенности // Вестник КрасГАУ. — 2011. — № 11. — С. 142–148. [Snegin EA. Vitality estimation of the *Cepaea*

- vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) especially protected species populations in the conditions of the Central Russian Upland forest-steppe south. *Vestnik KrasGAU*. 2011a;(11):142-148. (In Russ.)
16. Neiber MT, Hausdorf B. Molecular phylogeny reveals the polyphyly of the snail genus *Cepaea* (Gastropoda: Helicidae). *Mol Phyl and Evol*. 2015;93:143-149. doi: 10.1016/j.ympev.2015.07.022.
 17. Neiber MT, Sagorny C, Hausdorf B. Increasing the number of molecular markers resolves the phylogenetic relationship of '*Cepaea*' *vindobonensis* (Pfeiffer 1828) with *Caucasotachea* Boettger 1909 (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae). *J Zool Syst Evol Res*. 2016;54(1):40-45. doi: 10.1111/jzs.12116.
 18. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using CR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(22):7213-7219. doi: 10.1093/nar/18.24.7213.
 19. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994;20(2):176-181. doi: 10.1006/geno.1994.1151.
 20. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*. 2006;(6):288-295.
 21. Yeh FC, Yang R, Boyle TJ, et al. POPGENE32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada. 2000. http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html.
 22. Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Phyl and Evol*. 2013;30:2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
 23. Chao A. Species richness estimation. In: Balakrishnan N., Read C.B., Vidakovic B., editors. *Encyclopedia of Statistical Science*. New York: Wiley; 2005. P. 7907-7916.
 24. Burnham KP, Overton WS. Estimation of the size of a closed population when capture probabilities vary among animals. *Biometrika*. 1978;(65):625-633. doi: 10.1093/biomet/65.3.625.
 25. Chao A, Shen T-J. 2009. SPADE. <http://chao.stat.nthu.edu.tw>.
 26. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugenics*. 1951;(15):323-354.
 27. Nei M. *Molecular population genetics and evolution*. Amsterdam; 1975. 278 p.
 28. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;(131):479-491.
 29. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. — М.: Мир, 1978. — 560 с. [Li C. First course in population genetics. The Boxwood Press. Pacific Grove. California. 1976. 631 p.]
 30. Slatkin M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*. 1993;47(1):294-299. doi: 10.2307/2410134.
 31. Wright S. Random drift and shifting balance theory of evolution. *Mathematical Topics in Population Genetics*. Berlin: Springer Verlag; 1970. P. 1-31. doi: 10.1007/978-3-642-46244-3_1.
 32. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю. П. Алтухова. — М.: Наука, 2004. — 619 с. [The dynamics of population gene pools under anthropogenic influences. Ed Yu.P. Altukhov. Moscow: Nauka; 2004. P. 619. (In Russ).]
 33. Nei M. Genetic distance between populations. *Am Nat*. 1972;106(949):283-292. doi: 10.1086/282771.
 34. Майр Э. Зоологический вид и эволюция. — М.: Мир, 1968. — 398 с. [Mayr E. Animal species and evolution. London: Oxford University Press; 1965. 797 p.]
 35. Hanski I. *Metapopulation Ecology*. Oxford: Oxford University Press; 1999. 328 p.
 36. Crow JF, Morton NE. Measurement of gene frequency drift in small population. *Evolution*. 1955;9:202-214. doi: 10.2307/2405589.
 37. Crow JF, Kimura M. *An introduction to population genetics theory*. N.Y.: Harpers and Row; 1970. 591 p.
 38. Снегин Э.А. Генетическая структура популяций модельных видов наземных моллюсков в условиях урбанизированного ландшафта на примере *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) // Экологическая генетика. — 2011. — 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 J of Genetics: Applied Research*. 2012;9(2):160-170.] doi: 10.1134/S2079059712020128.
 39. Снегин Э.А. Пространственные и временные аспекты эколого-генетической структуры популяций беспозвоночных животных (на примере наземных моллюсков и насекомых юга Среднерусской возвышенности): Дис. ... д-ра биол. наук. — Белгород: НИУ БелГУ, 2012. — 394 с. [Snegin EA. Spatial and temporal aspects of the ecological and genetic structure of populations of invertebrates (for example, terrestrial mollusks and insects of Southern Central Russian Upland. [dissertation]. Belgorod: BSU; 2012. P. 394 (In Russ).]
 40. 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. 84–93. [Snegin EA, Sichev AA. Assessment of the viability of populations of specially protected species *Helicopsis striata* Müller (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) in

- the conditions of the Southern Upland. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2011;(2):84-93. (In Russ).]
41. Снегин Э.А., Артемчук О.Ю. Морфогенетический анализ популяций *Helix pomatia* L. (Pulmonata, Helicidae) юго-восточной и восточной части современного ареала // Экологическая генетика. — 2014. — Т. XII. — № 4. — С. 25–37. [Snegin EA, Artemchuk OYu. Morphogenetic analysis of *Helix pomatia* L. (Pulmonata, Helicidae) populations from south-eastern and eastern parts of the modern area. *Russian J of Genetics: Applied Research*. 2016;6(2):152-162.] doi: 10.1134/S207905971602012X.
42. Снегин Э.А. Оценка состояния популяционных генофондов наземных моллюсков в условиях влияния горнообогатительных 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* Müll. (Gastropoda, Pulmonata). *Russian J of Genetics: Applied Research*. 2011;1(5):379-389.] doi: 10.1134/S2079059711050133.
43. Снегин Э.А. Анализ генетической изменчивости популяций наземного моллюска *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) с использованием RAPD- и ISSR-маркеров // Экологическая генетика. — 2013. — Т. XI. — № 3. — С. 37–47. [Snegin EA. 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*. 2014;4(5):444-454.] doi: 10.1134/S207905971405013X.
44. 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. *Ecologicheskaya Genetika*. 2015;13(3):28-39. (In Russ).].

THE GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS OF SPECIALLY PROTECTED MOLLUSK *CEPAEA VINDOBONENSIS* (MOLLUSCA, GASTROPODA, PULMONATA) IN A NORTH-EASTERN PART OF THE MODERN AREA

E.A. Snegin, E.A. Snegina

For citation: *Ecological genetics*. 2016;14(3):13-27

✿ **SUMMARY: Background.** The population structure of relict and protected species *Cepaea vindobonensis* Fer. (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) in a north-eastern part of the modern area has been studied. State population gene pools (11 populations) for environmental activities need to be assessed. **Materials and Methods.** Using allozymes (esterases) and DNA markers (RAPD, ISSR) analysis was performed. The methods polyacrylamide gel electrophoresis and the DNA in the agarose gel were used. **Results.** The populations with a low level of heterozygosity and high heterozygosity were identified. Group located in the east, did not differ in allelic diversity of the western groups. The average expected heterozygosity for allozyme $H_e = 0,217 \pm 0,080$ and DNA markers $H_e = 0,164 \pm 0,024$. However, the population of the Austrian snail in the study area is strongly separated from each other ($F_{st} = 0,231$, $G_{st} = 0,265$, $\Phi_{st} = 0,261-0,263$, $N_m = 0,630-0,832$). The effective population size (N_e), calculated on the basis of the inbreeding coefficient, was level $0,868 \pm 0,028$ of the total population. The effective population size, calculated on the basis of the linear regression equation between genetic and geographic distance ($N_e = 0,36-2,6$) and calculated by a factor of subdivision of populations ($N_e = 6,3 \pm 0,1$), in comparison with the effective size of the populations of common species of terrestrial mollusks was the same. **Conclusion.** Thus, on the basis of these data, in general, we can say, the Austrian population snails have a higher potential for life. However, the reduction of allelic diversity, the increase in the coefficient of inbreeding in some groups and a high level of isolation of populations of *C. vindobonensis* in the north-eastern part of the range is a concern and requires an adjustment in respect of environmental protection measures of this species.

✿ **KEYWORDS:** terrestrial mollusks; allozymes; DNA markers; population structure; the effective number.

✿ Информация об авторах

Эдуард Анатольевич Снегин — д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией популяционной генетики и генотоксикологии. ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». E-mail: snegin@bsu.edu.ru.

Елена Андреевна Снегина — научный сотрудник лаборатории популяционной генетики и генотоксикологии. ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». E-mail: snegina@bsu.edu.ru.

✿ Information about the authors

Eduard A. Snegin — Dr. Biol. Sci., senior lecturer, Head of the Laboratory of Population Genetics and Genetotoxicology. Belgorod national research university. E-mail: snegin@bsu.edu.ru.

Elena A. Snegina — Researcher of the Laboratory of Population Genetics and Genetotoxicology. Belgorod national research university. E-mail: snegina@bsu.edu.ru.