



© О. Ю. Конева
Институт генетики и цитологии
НАН Республики Беларусь

✿ **Посредством проведения молекулярно-генетического типирования популяций моллюсков *Lymnaea stagnalis* из регионов с разной экологической нагрузкой (озеро Персток и затока реки Припять, Беларусь) было установлено, что популяции являются генетически идентичными, не существует значимых различий генетической изменчивости ни между индивидами внутри популяций, ни между популяциями. На это указывают проведенный межпопуляционный анализ частот RAPD-фрагментов и частот нулевых аллелей RAPD-локусов, индекс генетического подобия. Результаты кластерного анализа и популяционного анализа также подтвердили, что популяции моллюсков генетически тесно связаны. Однако популяция озера Персток генетически более однородна.**

✿ **Ключевые слова:** генетический мониторинг; популяционный анализ; генотипирование; RAPD; *Lymnaea stagnalis*.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИЙ МОЛЛЮСКОВ *LYMNAEA STAGNALIS* ИЗ РЕГИОНОВ С РАЗЛИЧНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ КАК ПЕРВЫЙ ШАГ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ

ВВЕДЕНИЕ

Одной из первостепенных задач современной генетики стала оценка и последующее длительное динамическое слежение (мониторинг) за возможными отрицательными генетическими последствиями применения химикатов и других техногенных факторов, присутствующих в окружающей среде, как для самого человека, так и для животных, растений и микроорганизмов.

Выполнение этой задачи в рамках экологического мониторинга выражается в существующей в настоящее время тенденции к проведению исследований видовой разнообразия окружающей среды (присутствия/отсутствия множества видов и т. д.) на основе ДНК (Holthausen et al., 2005).

Наблюдение за последствиями антропогенных изменений и их воздействием на природные популяции становится сегодня все более и более важным. Многие национальные и международные организации установили принципы и стратегии для мониторинга за биологическим разнообразием (Holthausen et al., 2005; Kurtz J. C. et al., 2001; Marchetti M. (ed.), 2004), однако в рамках реализации этих проектов преимущества молекулярно-генетических маркеров используются в малой степени. Тем временем новые лабораторные и статистические методики делают возможным использование молекулярных маркеров для мониторинга и контроля уровня миграции, инвазии, гибридизации и др. в диких популяциях.

Данные о ДНК и данные популяционной генетики способны предоставить ценную информацию, часто недостижимую через другие подходы, для осуществления эффективного управления видами, биоразнообразием и сохранения экологического благополучия.

Хотя термин «генетический мониторинг» становится широко используемым всюду: в области экологии, дикой природы, защиты окружающей среды, — не существует согласия относительно его определения. Для одних *генетический мониторинг* — это просто использование генетических данных для изучения демографии и более сложных экологических процессов, тогда как для других он предполагает систематические измерения популяционных генетических параметров во времени (Schwartz M. K et al., 2007).

Так как повсеместное внедрение инновационных методов проведения экологического мониторинга на основе молекулярно-генетических технологий только начинается, существует необходимость в более глубоком исследовании, разработке и совершенствовании методологии и подходов в этой области для обеспечения качественного роста эффективности процессов ведения экологического мониторинга.

В свете вышеизложенного **целью данной работы** являлось молекулярное генетическое типирование на примере популяций моллюска *Lymnaea stagnalis* из регионов с различной экологической нагрузкой, как важная часть комплексного подхода в экологическом мониторинге в целом, позволяющая оптимизировать систему охраны окружающей среды посредством использования генетических подходов и технологий.

Поступила в редакцию 26.12.2011
Принята к публикации 10.05.2012

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований послужили моллюски *Lymnaea stagnalis* — потомки животных из двух природных популяций: озера Персток и затоки реки Припять Гомельской области Беларуси — из регионов с различной экологической нагрузкой.

Lymnaea stagnalis (водный брюхоногий легочный моллюск) относится к наиболее высокоорганизованным видам моллюсков. Преимущественно распространен в умеренном поясе Северного полушария. Живет, главным образом, в пресной воде, особенно в прудах и болотах или медленно текущих водах.

Главное преимущество модели животных *Lymnaea stagnalis* для целей данного исследования заключается в повсеместной распространенности вида на территории Беларуси, что позволяет проводить генетический мониторинг животных по всей территории республики, сопоставлять данные, производить объективный анализ. Следует также отметить возможность собирать материал для генетического исследования моллюска, не причиняя вреда животному, что соответствует мировой тенденции исключать животных из экспериментов и проводить неинвазивные исследования образцов.

Затока в низовьях реки **Припять** находится в квартале № 86 Оревичского лесничества Полесского государственного радиационно-экологического заповедника (ПГРЭЗ) в зоне загрязнения ЧАЭС (расстояние от ЧАЭС по прямой — около 20 км).

Озеро Персток находится в квартале № 132 Радинского лесничества ПГРЭЗ (расстояние до ЧАЭС по прямой — около 14 км). Озеро относится к бассейну р. Припять, является непроточным. Во время разливов Припяти оно пополняется водой.

Расстояние между точками сбора образцов порядка 10 км (рис. 1).

На момент отбора животных γ -активность моллюсков из Припяти составила 12,7 Бк/кг, а из Перстка — 585 Бк/кг. В целом концентрация обоих радионуклидов (^{137}Cs , ^{90}Sr) у *Limnaea stagnalis* из озера Персток была значительно выше, чем у моллюсков из затоки реки Припять, что хорошо коррелирует с уровнями радиоактивного загрязнения донных отложений обоих водоемов (Golubev A. P. et al., 2005; Голубев А. П. и др., 2007).

Для генотипирования животных использовали RAPD-анализ. RAPD-маркеры, генерируемые посредством ПЦР, делают возможным быструю идентификацию геномной изменчивости без предварительного знания последовательности ДНК. Анализ позволяет выявлять мутации (нуклеотидные замены, инсерции, делеции и др.) на участках отжига праймеров, которые случайным образом распределены *по всему геному* (другие техники, например, микросателлитный анализ, не могут обеспечить аналогичное условие) и проявляют менделевское наследование (Williams J. G. K. et al., 1990). Эта методи-

ка недорогая, доступна для массового анализа; позволяет выявить высокий уровень полиморфизма популяций.

RAPD-маркеры обладают высокой разрешающей способностью при определении популяционной принадлежности (Mogin S., 2004). Согласно литературным данным RAPD позволяет идентифицировать популяционную принадлежность индивида с точностью, значительно превышающей точность таких методик, как микросателлиты и SNP (Хрусталева А. М., 2007).

Использование RAPD-анализа в филогенетических исследованиях и популяционной генетике описано для широкого диапазона организмов. У водных моллюсков с помощью этой техники успешно анализировался генетический полиморфизм на межвидовом уровне у двусторчатых, таких как устрицы, мидии, и на внутривидовом уровне у гребешка, морского ушка и устриц.

Преимущество данного метода для целей нашего исследования состоит в том, что RAPD-анализ может служить своеобразным экспресс-методом выявления генетического полиморфизма и источником уникальных локус-специфичных маркеров. Это особенно актуально, поскольку *Lymnaea stagnalis* относится к малоизученному с точки зрения генетического маркирования виду животных. Существует лишь несколько публикаций, касающихся поиска с использованием RAPD-анализа генетических маркеров, связанных с резистентностью моллюсков к некоторым болезням (Abdel-Hamid A-Z. et al., 2006).

Выделение ДНК производили из гемоцитов мантийной жидкости моллюсков методом фенолхлороформной экстракции.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro UV/Visible (Biochrom Ltd.). Качество выделенной ДНК проверяли электрофоретически в 2% агарозном геле (Top Vision™ LE GQ Agarose, Fermentas).

Для оценки гетерогенности генотипов моллюсков использовали ПЦР с произвольными декамерными праймерами, аналогами фирмы Oregon Technologies, Inc. (серии OPB, OPE и OPF), а также несколькими универсальными праймерами конструкции *Булата А. С. и соавторов* (1995) (табл. 1).

ПЦР-смесь (25 мкл) содержала 2,5 мкл 10x ПЦР-буфера (SibEnzyme, Россия); 2,5 мкл 25мМ MgCl_2 ; 2,5 мкл 10x dNTP-mix (Праймтех, Беларусь); 1 мкл праймера (≈ 10 пмоль/мкл, Праймтех, Беларусь); $\approx 0,15$ мкл Hot Start *Taq* ДНК-полимеразы (5 е.а./мкл, SibEnzyme, Россия); 1 мкл ДНК-матрицы (≈ 45 мкг/мл) и Milli-Q воду до общего объема 25 мкл.

Аmplификацию проводили на амплификаторе MyCycler™ (Bio-Rad, США) при следующих условиях (рис. 2):

Ориентировочную температуру отжига праймеров подбирали с помощью сервиса NCBI/Primer-BLAST, оптимальную температуру отжига затем устанавливали эмпирически.

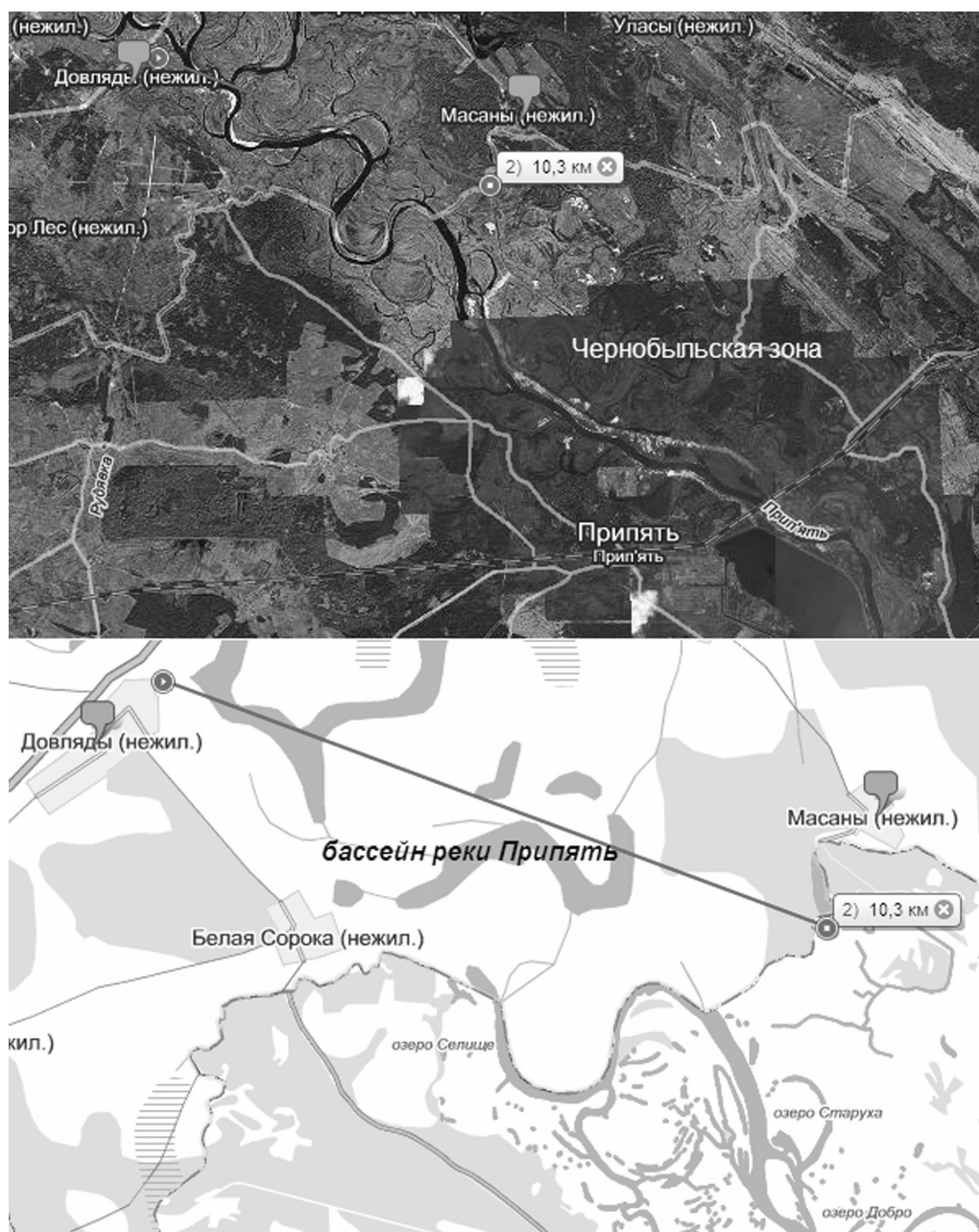


Рис. 1. Карта региона вблизи Чернобыльской зоны, где осуществлялся отбор моллюсков *Lymnaea stagnalis*

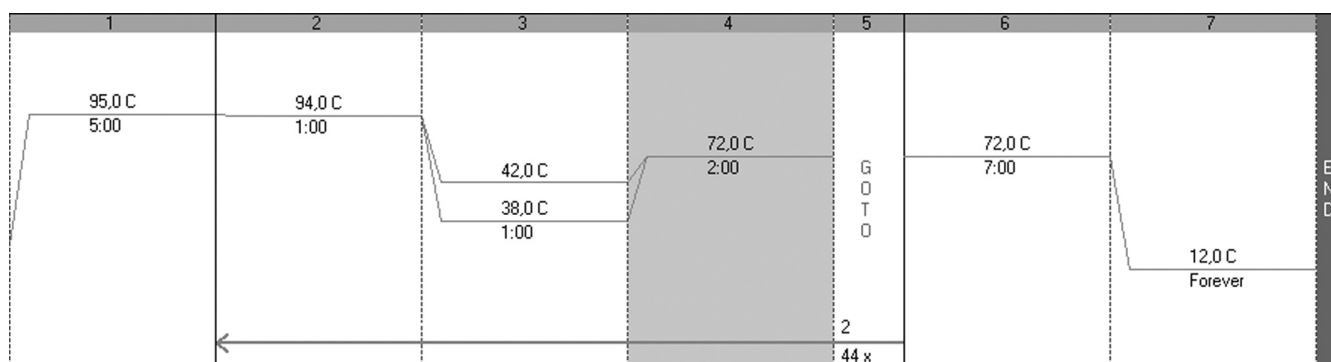


Рис. 2. Протокол проведения ПЦР

Таблица 1

Характеристики праймеров

Название праймера	Последовательность	Температура отжига, °С	% GC
ОРВ-01	5'-GTTTCGCTCC-3'	38	60,00
ОРЕ-06	5'-AAGACCCCTC-3'	42	60,00
ОРФ-05	5'-CCGAATCCCC-3'	42	60,00
ОРЕ-16	5'-GGTGACTGTG-3'	38	60,00
L21	5'-GGATCCGAGGGT GGCGTTCT-3'	38	66,67
L45	5'-GTA AACGAC GGCCAGT-3'	47	52,94
L15/AS19	5'-GAGGGTGGC GGCTAG-3'	42	73,33

Продукты амплификации подвергали электрофоретическому разделению в 2% агарозном геле (Top Vision™ LE GQ Agarose, Fermentas) в 1x TAE-буфере (40 mM Tris-основание; ~31,2 mM ледяная уксусная кислота; 1 mM ЭДТА, pH=7,6) в устройстве для горизонтального электрофореза Vagorhor 11 (Эстония). Затем окрашивали в водном растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 20 минут.

Амплификации с каждым из праймеров проводили дважды или трижды и получали воспроизводимые электрофоретические образцы.

Визуализацию геля осуществляли с помощью системы гель-документирования GelDoc XR (Bio-Rad, США). Полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quantity One 4.4 (Bio-Rad, США).

В анализе использовались 19 особей: первое лабораторное поколение от природных популяций от внутривидового перекрестного оплодотворения.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Статистическую обработку полученных данных производили с помощью программы Statistica 6 (StatSoft, Inc.). Использовали следующие критерии: критерий Фишера, U-тест Манна–Уитни, *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В сумме 154 RAPD-локуса были идентифицированы для популяций моллюсков *Lymnaea stagnalis* озера Персток и затоки реки Припять. Из выявленных в популяции Персток полиморфными были 93 локуса, в популяции Припять — 109 локусов, с долей полиморфных локусов в популяциях 67,81 и 77,76% соответственно (табл. 2).

Как можно видеть из таблицы 2, численные значения долей полиморфных локусов, генерируемых используемыми в работе праймерами, популяций озера Персток и затоки реки Припять несколько различаются. Однако статистически значимые межпопуляционные разли-

Таблица 2

Обзор праймеров на основе RAPD-фингерпринтов моллюсков *Lymnaea stagnalis* популяций озера Персток и затоки реки Припять

Праймер	Число амплифицированных RAPD-локусов по праймеру		Число RAPD-локусов на индивид		Число мономорфных RAPD-локусов		Число полиморфных RAPD-локусов		Доля полиморфных локусов, %	
	Персток	Припять	Персток	Припять	Персток	Припять	Персток	Припять	Персток	Припять
ОРВ-01	21	17	7–11	7–11	5	3	16	14	76,19	82,35
ОРЕ-06	20*	22*	11–16	4–13	10	3	10**	19**	50,00	86,36
ОРФ-05	21	23	8–14	8–16	6	5	15	18	71,43	78,26
ОРЕ-16	16	17	9–12	8–14	7	5	9	12	56,25	70,59
L21	13	16	6–13	7–10	4	4	9	12	69,23	75,00
L45	22	22	6–15	6–15	3	2	19	20	86,36	90,91
L15/AS19	23	23	9–18	7–17	8	9	15	14	65,22	60,87
Итого	(136)	(140)			(43)	(31)	(93)	(109)	67,81 ± 4,60	77,76 ± 3,82

^ — ≥87,5% от общего количества индивидов; *, ** — $p < 0,05$.

чия ($p = 0,02$) выявлены посредством критерия Фишера только в долях полиморфных локусов по праймеру OPE-06 (U-тест Манна–Уитни также не обнаружил статистически значимых различий между медианами значений показателей доли полиморфных локусов по всем праймерам двух популяций, $p > 0,1$). Популяция моллюсков озера Персток (если основываться на общих характеристиках RAPD-фингерпринта, генерируемого праймером OPE-06) характеризуется меньшим уровнем полиморфных локусов и бóльшим количеством мономорфных локусов, чем популяция моллюсков затоки реки Припять. Для популяции Персток отмечается более узкий спектр амплифицируемых ПЦР-фрагментов: в большинстве случаев число амплифицируемых фрагментов с помощью заявленных праймеров было больше у моллюсков популяции Припять. То, что озеро Персток является непроточным, может объяснить данный факт:

популяция животных является генетически более однородной, возможно, из-за фактора изоляции.

Более глубокий анализ вариаций, обнаруженных с помощью RAPD-PCR амплификации, производили посредством оценки частот RAPD-фрагментов, частот аллелей для каждого RAPD-локуса и индекса генетического подобия внутри и между популяциями.

Данные электрофоретических ДНК-профилей по всем семи праймерам, полученные в ходе обработки изображений гелей с помощью программы Quantity One 4.4 (рис. 3), представляли в виде общей бинарной матрицы типа «объект-признак» (объект — определенный индивид, признак — определенный RAPD-локус). Присутствие/отсутствие ампликона в локусе обозначали как 1/0.

Анализировали спектр полученных ампликонов по каждому праймеру, наличие уникальных ампликонов

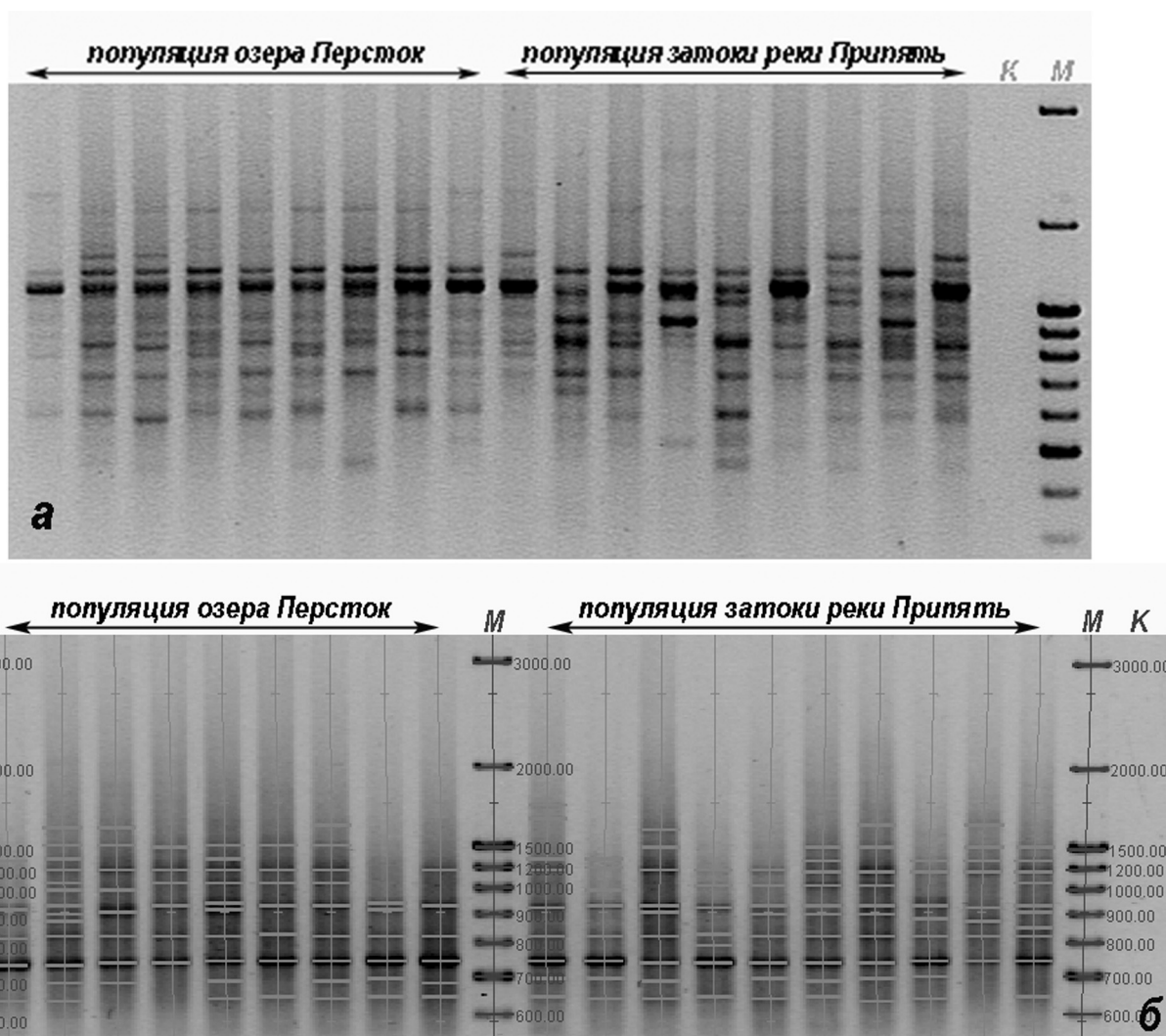


Рис. 3. Электрофореграмма с продуктами амплификации по праймерам OPF-05 (а) и L21 (б, наложение обработки Quantity One 4.4) моллюсков *Lymnaea stagnalis*; К — контроль, М — маркер молекулярного веса GeneRuller™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

для каждой популяции и вычисляли частоту их встречаемости в выборке. **Частоты RAPD-фрагментов** рассчитывались на основе числа индивидов в выборке с положительными фрагментами по RAPD-локусу.

В ходе анализа полученных электрофореграмм были выявлены уникальные RAPD-фрагменты как для популяции озера Персток, так и для популяции затоки реки Припять по всем праймерам. Однако большинство уникальных RAPD-фрагментов встречалось в популяциях с низкой частотой, в связи с чем они не могут использоваться в качестве молекулярных маркеров для популяционной идентификации индивида.

Однако были обнаружены несколько уникальных ПЦР-фрагментов, которые встречались с удовлетворительной частотой (30% и выше) внутри популяций и они могут использоваться для характеристики популяций.

Уникальными для моллюсков *Lymnaea stagnalis* популяции озера Персток и удовлетворительными по частоте встречаемости внутри популяции оказались следующие маркеры: RAPD_OPE-06₅₃₉; RAPD_OPB-01₈₂₉; RAPD_OPE-16₅₈₆; RAPD_OPF-05₁₅₅₀ (обозначение RAPD-локусов согласно статье Дромашко С.Е. и Коневой О.Ю. (2010)).

Уникальными для моллюсков *Lymnaea stagnalis* популяции затоки реки Припять и удовлетворительными по частоте встречаемости оказались следующие маркеры: RAPD_OPE-06_{1758, 597}; RAPD_OPF-05_{1064, 667}; AP-PCR_45₁₈₁₈; AP-PCR_15/19₂₅₈₄.

Такие генетические маркеры можно использовать для идентификации популяций животных и мониторинга за некоторыми популяционными параметрами, например, миграцией.

Следует отметить, что встречались ампликоны, которые, несмотря на то, что присутствовали у представителей обеих популяций, существенно отличались по частоте встречаемости внутри популяций (на 30% и более). Значительные различия в частоте встречаемости этих ампликонов внутри двух популяций также могут использоваться для дополнительной характеристики этих популяций.

Однако для проведения полноценных популяционных исследований, которые предполагают оценку генетической структуры популяции, лучше конвертировать профиль RAPD-PCR амплификации в частоту генов.

Конвертация данных профиля RAPD-PCR амплификации в частоту генов осуществляется посредством такого допущения, как двухаллельная система (Saitoh K., 1998). Т.к. RAPD-праймеры генерируют доминантные маркеры, невозможно получить прямую оценку частот аллелей. В случае RAPD предполагается, что каждый ПЦР-фрагмент представляет доминантный фенотип в локусе, в то время как отсутствие того же фрагмента у другого организма означает альтернативный рецессив-

ный гомозиготный фенотип (предполагается 2 аллеля на локус). Из двух аллелей только один способен к амплификации RAPD-фрагмента посредством отжига праймера в неизвестной позиции генома (=локус), другой аллель — это «нулевой» аллель, неспособный к амплификации, главным образом из-за отсутствия участка отжига праймера вследствие мутации.

В случае двух аллелей, когда гетерозигота не может быть установлена, потенциальная оценка частоты рецессивного аллеля — это просто корень квадратный из частоты наблюдаемых «пустот» (отсутствующих RAPD-фрагментов) в локусе (Weir B. S. et al., 1990). Метод требует предположения, что частоты генотипов распределены согласно уравнению Харди–Вайнберга.

Двухаллельное предположение в большинстве случаев приемлемо, потому что кодоминантных локусов, демонстрирующих смещение полос, немного (Welsh J. et al., 1990; Elo K. et al., 1997). В этой системе детектируются только нулевые гомозиготы, как отсутствие RAPD-фрагмента на интересующем участке. Согласно уравнению Харди–Вайнберга генные частоты нулевых аллелей вычисляются с помощью формулы:

$$q = \sqrt{\frac{n - N}{n}},$$

где q — частота нулевого аллеля; N — число индивидов в выборке с положительными ПЦР-фрагментами по локусу; n — общий объем выборки.

Таким образом, исходя из предположения, что RAPD-фрагменты являются независимо наследуемыми доминантными признаками, рассчитывали **частоты аллелей** для каждого локуса.

Если в дальнейшем сравнивать оценки частот RAPD-фрагментов с оценками частот нулевых аллелей по этим RAPD-локусам, то можно сделать следующее заключение: анализ генных частот нулевых аллелей RAPD-локусов несколько снижает количество молекулярно-генетических маркеров, пригодных одновременно и для идентификации популяций, и для описания различий структуры популяций. Локусов, имеющих значимые различия (30% и более) между популяциями в частоте нулевых аллелей оказалось значительно меньше.

Уникальные для какой-либо популяции RAPD-маркеры, частоты встречаемости которых в этой популяции превышали 30%, оказались неэффективными для характеристики различий в структуре популяций, т.к. генные частоты их нулевых аллелей не отличались в популяциях более чем на 25% (т.е. разница оказалась значительно ниже в случае этого параметра). Однако уникальные маркеры, чьи частоты встречаемости составляли 50% и выше оставались пригодными и для характеристики различий в структуре изучаемых популя-

ций, т. к. частоты нулевых аллелей этих локусов различались в популяциях на 30% и более.

К RAPD-маркерам, частоты нулевых аллелей которых в сравниваемых нами популяциях отличались на 30% и больше, относятся следующие ампликоны: RAPD_OPE-06_{1285, 1095, 921, 619, 571}; RAPD_OPB-01_{1631, 1594, 1440, 1214}; RAPD_OPE-16_{1445, 913}; RAPD_OPF-05_{2090, 683}; AP-PCR_45_{1619, 975}; AP-PCR_15/19₁₄₉₆. Частоты встречаемости таких RAPD-фрагментов отличались в изучаемых нами популяциях на 39% и больше. В случае уникальных для какой-либо популяции ампликонов частоты встречаемости их в популяциях должны были превышать 50%, чтобы частоты их нулевых аллелей в популяциях различались на 30% и более. В нашем случае это следующие уникальные для популяции Припять RAPD-фрагменты: RAPD_OPF-05_{1064, 667}. Иначе говоря, из всех выявленных нами ранее уникальных ампликонов, пригодных для идентификации популяций, только два оказались пригодными для характеристики различий в структуре популяций.

В свете вышесказанного логичным представляется для подбора эффективных специфических для популяции молекулярно-генетических маркеров использовать параметр частоты встречаемости RAPD-фрагментов в комбинации с параметром частоты нулевых аллелей этих локусов, чтобы различия в частоте встречаемости этих фрагментов в популяциях отражали и различия в структуре популяций по анализируемому локусу.

Также рассчитывали индекс генетического подобия между индивидами популяций моллюсков *Lymnaea stagnalis* озера Персток и затоки реки Припять и между индивидами внутри популяций.

Значения индекса генетического подобия вычислялись по Nei & Li (Nei M., Li W-H., 1979; Aranishi F., Okimoto T., 2004) посредством попарного сравнения профилей RAPD-PCR амплификации (154 локуса) каких-либо двух индивидов моллюсков внутри и между популяциями на основе присутствия или отсутствия ПЦР-фрагмента одного и того же молекулярного размера с использованием формулы из статьи Aranishi F., Okimoto T. (2004).

Анализ был проведен по 154 RAPD-фрагментам. Среднее значение индекса генетического подобия между двумя популяциями составило $0,665 \pm 0,005$; внутри популяции моллюсков озера Персток $0,670 \pm 0,013$; внутри популяции затоки реки Припять $0,674 \pm 0,008$.

Таким образом, можно сделать вывод, что не существует значимых различий генетической изменчивости ни между индивидами внутри популяций, ни между популяциями.

Кластерный анализ попарных генетических расстояний индивидов производился с помощью метода невзвешенных парных групп с арифметическим средним (UPGMA). Дендрограмму (рис. 4) строили с помощью

программы MEGA версии 5.0 на основе данных индексов генетического подобия (Aranishi F., Okimoto T., 2004).

Как можно видеть на рисунке 4, все кластеры дендрограммы комплексные, т.е. включают индивидов как из популяции озера Персток, так и из популяции затоки реки Припять, и значительно не отличаются по генетическому расстоянию. Первые кластеры отделяются от общей оси небольшими группами, включающими по 1 особи из популяции озера Персток или по 2 особи из обеих популяций. В конечном итоге в центре формируется достаточно однородный кластер (выделен на рис. 3 пунктиром), который также является комбинированным.

Для оценки достоверности построенного дерева проводили *bootstrap*-анализ для 100 альтернативных вариантов выборки. Варианты, идентичные оригинальной выборке, генерировали с помощью пакета *seqboot* программы Phylip 3.69. Консенсусное дерево строили с помощью пакета *consense* программы Phylip 3.69. Индексы *bootstrap*-анализа консенсусного дерева, отражающие процент деревьев, поддерживающих исходную топологию, для всех узлов ветвления в основном имели значения в районе 50%, по отдельным ветвям до 80%, что свидетельствует об удовлетворительной степени надежности представленного дерева.

Дополнительно с помощью программы POPGENE 1.32 был проведен популяционный генетический анализ. На основе бинарной матрицы по 154 RAPD-локусам моллюсков *Lymnaea stagnalis* популяций озера Персток и затоки реки Припять рассчитывали следующие параметры:

Число и доля полиморфных локусов. Популяционный генетический анализ, проведенный с помощью программы POPGENE 1.32, также подтвердил, что доля полиморфных локусов в популяции моллюсков *Lymnaea stagnalis* затоки реки Припять несколько выше, чем в популяции озера Персток (табл. 3). Статистический анализ (посредством *t*-критерия Стьюдента) выявил значимые различия ($p < 0,05$) между популяциями по параметру гетерозиготности h (генное разнообразие), рассчитанной по Nei (Nei M., 1987). В популяции Припять генное разнообразие оказалось выше, чем в популяции Персток.

Параметры F-статистики (статистика генетического разнообразия) рассчитывали по Nei (Nei M., 1987) (табл. 3). Среднее внутривидовое генное разнообразие H_s (внутрипопуляционная гетерозиготность) популяций моллюсков оказалось ниже, чем среднее общее генное разнообразие (общая гетерозиготность) H_t популяций ($p < 0,001$). Если H_t и H_s сходны, то это свидетельствует об отсутствии дифференциации популяций; если $H_t > H_s$, то это указывает на существенный вклад межпопуляционной компоненты в дифференциацию популяций. Значение коэффициента генной дифференциации G_{st} , характеризующего долю межпопуляционных разли-

Таблица 3

Параметры популяционного генетического анализа

Генетические параметры	Персток	Припять
Число полиморфных локусов (процент)	110 (71,43 %)	123 (79,87 %)
	142 (92,21 %)	
Гетерозиготность (h)	0,2439 \pm SD 0,1849*	0,2914 \pm SD 0,1789*
F-статистика		
H_t	0,2968 \pm SD0,0249**	
H_s	0,2676 \pm SD0,0211**	
G_{st}	0,0982	
Эффективное число аллелей (n_e)	1,4071 \pm SD 0,3546*	1,4983 \pm SD 0,3536*
Поток генов (N_m)	4,5905	
Информационный индекс Шеннона (I)	0,3694 \pm SD0,2616**	0,4346 \pm SD0,2484**
Генетическая идентичность	0,9425	
Генетическое расстояние	0,0592	
SD — стандартное отклонение; *, ** — статистически значимые различия, $p < 0,05$.		

чий в общем генетическом разнообразии (степень чужеродности популяций), составило для анализируемых популяций 9,82%, что указывает на небольшие генетические различия между ними, т. е. популяции дифференцированы слабо.

Эффективное число аллелей n_e (Nei M., 1987), характеризующее количество аллелей, которое было бы, если бы все аллели имели одинаковую частоту, также выше ($p < 0,05$) для популяции Припять (табл. 3).

Показатель потока генов N_m , или число особей, мигрирующих в популяцию за одно поколение, рассчитанный на основе G_{st} (Slatkin M., Barton N.H., 1989), составил 4,5905, что говорит о достаточном сходстве популяций (табл. 3). Обычно, если $N_m < 1$, то результатом будет локальная дифференциация популяций (частоты аллелей регулируются дрейфом генов), а если $N_m > 1$, то это говорит о малой дифференциации среди популяций (частоты аллелей регулируются потоком генов). Поток генов в данном случае мог бы быть обеспечен разливами Припяти, птицами (перенос на лапках), скотом, рыбаками. Но так как данная территория нежилая, то наиболее вероятными механизмами остаются только разливы Припяти и птицы.

Информационный индекс Шеннона I (SI , или SWI , или H) (Nei M., 1987). Данный параметр тоже использу-

ется как мера генного разнообразия (гетерозиготности) популяций. Индекс Шеннона был разработан в рамках теории информации и подходит для расчета разнообразия любых объектов. Особенностью индекса является то, что он придает большее значение редким аллелям, чем другие индексы. Вычисляется как

$$\sum p_i \times \log_n(p_i),$$

где p_i — частота i -го аллеля в локусе. Чем больше индекс Шеннона, тем больше видовое разнообразие сообщества. Это следует из того, что возрастание индекса указывает на возрастание неопределенности и однородности структуры системы. Этот параметр не ограничен диапазоном от 0 до 1. При этом следует помнить, что обычно значения индекса лежат в пределах от 1,5 до 3,5, редко превышая 4,5 (по основанию 2). Индекс является более чувствительным, чем H_e . Его применение не требует предположения о соблюдении в популяции равновесия Харди–Вайнберга. Это индекс разнообразия и энтропии. Нет конкретной генетической интерпретации для данного параметра.

В случае изучаемых нами популяций Персток и Припять информационный индекс Шеннона оказался выше ($p < 0,05$) опять же для популяции Припять (табл. 3), что говорит о большем генетическом разнообразии данной популяции.

Также для установления генетической структуры исследуемых популяций мы применили *тест на нейтральность* Ewens–Watterson (Manly V. F. J., 1985). Данный тест оценивает селективную нейтральность полиморфизма изучаемых участков ДНК (аллелей).

Теория нейтральности в популяционной генетике предполагает, что большая часть молекулярных вариантов имеет равную приспособленность относительно друг друга. Тест сравнивает наблюдаемую гомозиготность по Харди–Вайнбергу с ожидаемой равновесной гомозиготностью (т. е. с ожидаемой гомозиготностью в условиях селективной нейтральности исследуемых локусов).

Тест используется, чтобы оценить согласуется ли наблюдаемое распределение аллельных частот в различных локусах с прогнозами нейтральности. Если наблюдаемая гомозиготность ниже, чем ожидаемая в условиях нейтральности, то это может указывать на протекание процессов балансирующего отбора в популяциях, если выше — то о прямом, или очищающем, отборе, элиминирующем вредные аллели (Хедрик Ф., 2003, ст. 433–435).

В нашем случае тест Ewens–Watterson не выявил статистически ($p < 0,05$) значимых различий наблюдаемой гомозиготности по Харди–Вайнбергу с ожидаемой гомозиготностью при нейтральности по всем 154-м RAPD-локусам популяций Персток и Припять, что говорит о селективной нейтральности этих локусов

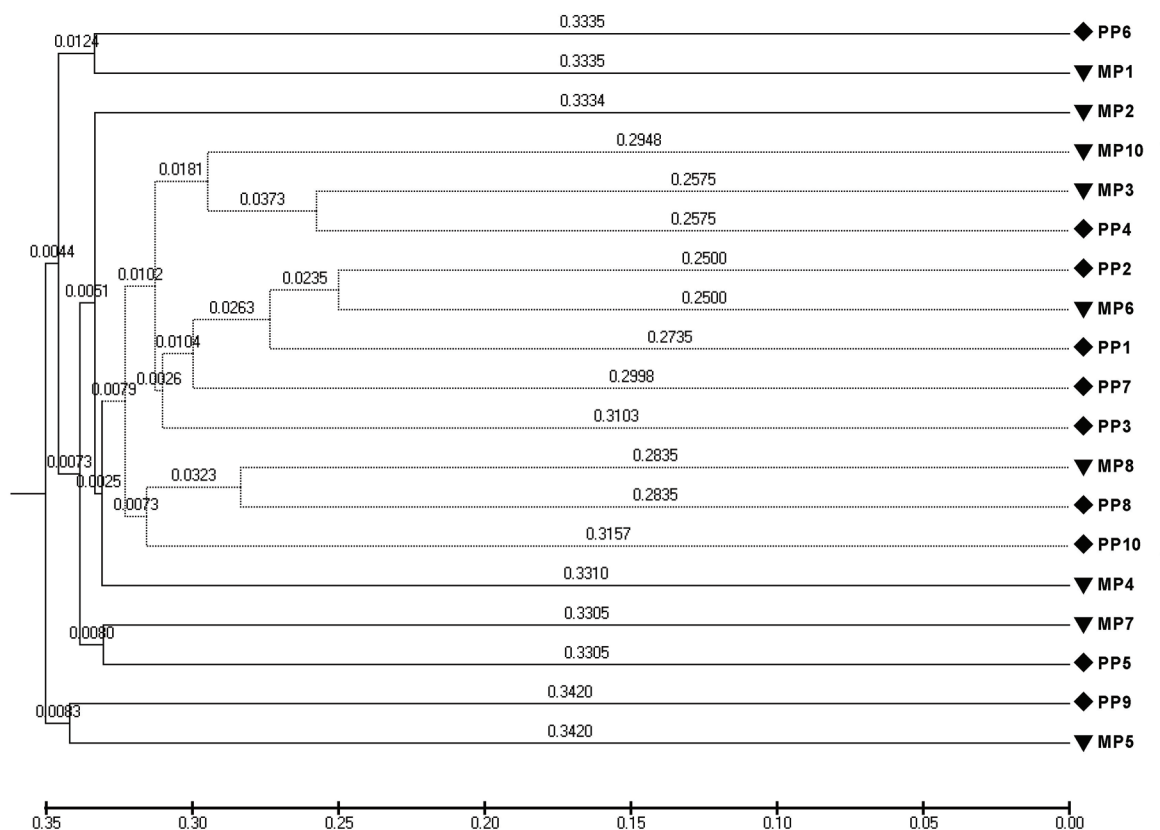


Рис. 4. UPGMA-дендрограмма генетических расстояний, построенная на основе значений индекса генетического подобия, вычисленных по данным на основе 7 случайным образом выбранных праймеров для индивидов *Lymnaea stagnalis* популяций озера Персток (MP) и затоки реки Припять (PP)

в обеих выборках. Ожидаемая гомозиготность в условиях нейтральности для популяций Персток и Припять рассчитывалась на основе 1000 симуляций основной выборки.

Генетическая идентичность популяций моллюсков *Lymnaea stagnalis*, рассчитанная по *Nei* (*Nei M.*, 1978) составила 0,9425; генетическое расстояние (*Nei M.*, 1978) между ними 0,0592 (табл. 3).

Таким образом, все вычисленные параметры демонстрируют одну и ту же тенденцию. Следовательно, можно сделать заключение, что популяции моллюсков *Lymnaea stagnalis* озера Персток и затоки реки Припять генетически идентичны, однако популяция затоки реки Припять характеризуется более высоким генетическим разнообразием, чем популяция озера Персток.

Таким образом, мы выяснили, что наблюдаемые нами популяции, несмотря на то, что обитают в достаточно отдаленных друг от друга для данного вида регионах, являются генетически весьма близкими. Однако проведенные нами ранее биоиндикаторные исследования моллюсков *Lymnaea stagnalis* с помощью метода ДНК-комет (данные в печати), показали существенные различия между популяциями по биоиндикаторным параметрам

животных из этих популяций, а также в чувствительности животных к воздействию агрессивных факторов среды обитания. На основе результатов проведенного нами генетического мониторинга (генетической оценки) можно сделать вывод, что эти различия в биоиндикаторных параметрах не обусловлены генетической изменчивостью животных разных популяций, а являются, скорее всего, результатом воздействия эпигенетических факторов (приводят к изменению фенотипа без изменения последовательности ДНК: факторы, влияющие на активность экспрессии определенных генов; изменения в метилировании ДНК и т. д.), различиями в экологической нагрузке на среду обитания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты указывают на то, что RAPD-маркеры являются полезными для оценки:

- генетических отношений внутри и между популяциями моллюсков *Lymnaea stagnalis* (для оценки межпопуляционного компонента генетической изменчивости);

- генетической структуры популяций (аллельные частоты, гетерозиготность, полиморфизм);
- протекающих популяционных процессов: миграция, изоляция и т. д.

Оценка генетических отношений между изучаемыми популяциями, структуры популяций, протекающих в них популяционных процессов, на наш взгляд, является платформой, отправной точкой для проведения мониторинговых исследований.

С помощью данных, полученных с использованием генетических подходов, а также сопутствующих знаний по экологии определенного вида, могут быть разработаны практические рекомендации, построена оптимальная стратегия в отношении оптимизации системы охраны, эксплуатации окружающей среды или популяционного контроля видов.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает благодарность Голубеву А. П. (д. б. н., доцент Международного государственного экологического университета им. А. Д. Сахарова) за предоставление животных для исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булат С. А., Мироненко Н. В., Жолкевич Ю. Г. 1995. Генетическая структура почвенной популяции гриба *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr.: Молекулярная реидентификация вида и генетическая дифференциация изолятов методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП-ПЦР) // Генетика. Т. 31, № 3, С. 315–323.
2. Голубев А. П., Сикорский В. Г., Калинин В. Н. и др., 2007. Динамика радиоактивного загрязнения экосистем разнотипных водоемов белорусского сектора зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 47, № 3. С. 322–332.
3. Дромашко С. Е., Конева О. Ю. 2010. Генетическая паспортизация пород белорусского карпа // Наука и инновации. № 11 (93). С. 36–40.
4. Хедрик Ф., 2003. Генетика популяций. М.: Техносфера. 592 с.
5. Хрусталёва А. М. 2007. Генетическая дифференциация нерки (*Oncorhynchus Nerka*) азиатских стад: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 25 с.
6. Abdel-Hamid A.-Z., Rawi S. M., Arafa A. F. 2006. Identification of a genetic marker associated with the resistance to *Schistosoma mansoni* infection using random amplified polymorphic DNA analysis // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 101. No 8. P. 863–868.
7. Aranishi F., Okimoto T. 2004. Genetic relationship between cultured populations of Pacific oyster revealed by RAPD analysis // *Journal of Applied Genetics*. Vol. 45. No 4. P. 435–443.
8. Elo K., Ivanoff S., Vuorinen J. A., Piironen J. 1997. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon // *Aquaculture*. Vol. 152. P. 55–65.
9. Golubev A. P., Afonin V., Maksimova S., Androsov V. 2005. The current state of pond snail *Lymnaea stagnalis* populations from water reservoirs of the Chernobyl nuclear accident zone // *Radioprotection*. Vol. 40. Suppl. 1. P. S511–S517.
10. Holthausen R., Czaplewski R. L., DeLorenzo D. et al., 2005. Strategies for monitoring terrestrial animals and habitats. General Technical Report RMRS-GTR-161. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 34 p.
11. Kurtz J. C., Jackson L. E., Fisher W. S. 2001. Strategies for evaluating indicators based on guidelines from the Environmental Protection Agency's Office of Research and Development // *Ecological Indicators*. Vol. 1. P. 49–60.
12. Manly B. F. J. 1985. The statistics of natural selection on animal populations. London: Chapman & Hall. 440 p.
13. Monitoring and indicators of forest biodiversity in Europe — from ideas to operationality. 2004 / Marchetti M. (ed.). EFI Proceedings. No. 51. 526 p.
14. Morin C., Breuil C., Bernier L. 2004. Genetic Variability and Structure of Canadian Populations of the Sapstain Fungus *Ceratocystis resinifera* // *Phytopathology*. Vol. 94. No. 12. P. 1323–1330.
15. Nei M., Li W.-H. 1979. Genetics Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. Vol. 76. No 10, P. 5269–5273.
16. Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*. Vol. 89. P. 583–590.
17. Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press. 512 p.
18. Saitoh K. 1998. Genetic variation and local differentiation in the Pacific cod *Gadus macrocephalus* around Japan revealed by mtDNA and RAPD markers // *Fisheries Science*. Vol. 64. P. 673–679.
19. Schwartz M. K., Luikart G., Waples R. S. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management // *Trends in Ecology and Evolution*. Vol. 22. No 1. P. 25–33.
20. Slatkin M., Barton N. H., 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow // *Evolution*. Vol. 43. P. 1349–1368.

21. Weir B. S., Reynolds J., Dodds K. G. 1990. The variance of sample heterozygosity // Theoretical Population Biology. Vol. 37. No 1. P. 235–253.
22. Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucleic Acids Research. Vol. 18. No 24. P. 7213–7218.
23. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J. et al., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucleic Acids Research, Vol. 18, No 22. P. 6531–6535.

GENETIC ESTIMATION OF SNAIL *LYMNAEA STAGNALIS* POPULATIONS FROM REGIONS WITH DIFFERENT ANTHROPOGENIC LOAD AS A FIRST STEP IN GENETIC MONITORING

Koneva A. Yu.

✿ **SUMMARY:** The paper deals with carrying out molecular-genetic typing of populations of snail *Lymnaea stagnalis* from regions with a different ecological load (the lake Perstok and zatoka of the river Pripyat, Belarus). By means of interpopulation analysis of frequencies of RAPD-fragments, frequencies of zero alleles of RAPD-loci and genetic similarity index we established that these populations are genetically identical because there are no significant distinctions of genetic variability neither between individuals within a population, nor between populations. Results of the cluster analysis and the population analysis also have confirmed that populations of snails are genetically closely related. However the snail population of the lake Perstok is genetically more homogeneous.

✿ **KEY WORDS:** genetic monitoring; population analysis; genotyping; RAPD; *Lymnaea stagnalis*.

✿ Информация об авторах

Конева Оксана Юрьевна — младший научный сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. Лаборатория моделирования генетических процессов. 220072 г. Минск, ул. Академическая, 27. E-mail: office@igc.bas-net.by.

Koneva Aksana — Junior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus. Laboratory of simulation of genetic processes. Akademicheskaya st., 27. 220072 Minsk, Republic of Belarus. E-mail: office@igc.bas-net.by.