

На правах рукописи



Артемчук Олеся Юрьевна

**ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА АДВЕНТИВНОГО ВИДА *HELIX*
ROMATIA L. В УСЛОВИЯХ ЮГО-ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА**

Специальность 03.02.08 – экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Научный руководитель: **Снегин Эдуард Анатольевич**,
доктор биологических наук,
ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет Институт инженерных технологий и естественных наук, профессор кафедры биологии, директор НИЦ геномной селекции

Официальные оппоненты: **Зотин Алексей Александрович**
доктор биологических наук,
ФГБУН «Институт биологии развития им. Н. К.Кольцова РАН», ведущий научный сотрудник лаборатории эволюционной биологии развития

Беспалая Юлия Владимировна
кандидат биологических наук,
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова РАН», заведующая лабораторией «Российский музей центров биологического разнообразия»

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пензенский государственный университет»**

Защита диссертации состоится «18» апреля 2019 г. в 15.00 часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д212.203.38 при Российском университете дружбы народов по адресу: 115093, г.Москва, Подольское шоссе, д.8/5, экологический факультет.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г.Москва, ул.Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте dissovet.rudn.ru.

Автореферат разослан «___» февраля 2019 г.

Ученый секретарь.....

Диссертационного совета Д212.203.38,

кандидат биологических наук ...



Е.А.Ванисова

.....
.....

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одним из негативных последствий воздействия человека на экосистемы планеты является сокращение численности, а порой и полное уничтожение все большего числа диких видов. Известно, что этот длительный процесс начинается с постепенного исчезновения популяций, которые вследствие сокращения ареала и уменьшения генетического разнообразия, теряют устойчивость и вымирают. На этом фоне весьма актуальным видится создание и ведение региональных Красных книг, в задачу которых входит сохранение таких локальных группировок, особенно на периферии ареалов.

Одним из таких видов является центрально-европейский вид виноградная улитка *Helix pomatia* L., современный ареал которого сейчас охватывает территорию от Испании до Поволжья. Стоит отметить, что во многих европейских странах и в ряде областей Украины и России этот вид внесен в охранные списки. При этом сохранение популяций виноградной улитки, особенно на границах ее современного ареала важно не только с точки зрения сохранения регионального биоразнообразия, но и потому что этот моллюск является классическим лабораторным животным и имеет важное эстетическое значение, а в ряде регионов рассматривается как объект искусственного разведения. Кроме того, актуальность исследования популяций *Helix pomatia* диктуется тем, что этот моллюск может быть переносчиком различных паразитарных заболеваний человека и домашних животных, а также в некоторых ситуациях может выступать вредителем культурных растений.

Цель исследования: Провести анализ популяционной структуры *Helix pomatia* в юго-восточной части его современного ареала, для понимания микроэволюционных процессов, протекающих в адвентивных группах наземных моллюсков на фоне все возрастающего антропогенного пресса.

Задачи исследования:

1. Изучить структуру расселения *Helix pomatia* L. в различных ландшафтах Русской равнины с определением векторов естественного отбора по морфогенетическим признакам.
2. Оценить долговременные изменения морфологических показателей раковины моллюсков рода *Helix*.
3. Изучить особенности генетических процессов, протекающих в адвентивных популяциях *Helix pomatia* L.
4. Оценить степень устойчивости популяций *H. pomatia* L. к действию генотоксичных компонентов среды в условиях урбанизированного ландшафта.
5. Провести расчет эффективной численности изучаемых популяций виноградной улитки и определить уровень их жизнеспособности.

Объектом исследования стали популяции виноградной улитки, населяющие различные биотопы на территории Среднерусской возвышенности и Восточной Европы.

Предметом исследования были генетико-автоматические и селективные процессы, происходящие в популяциях виноградной улитки на территории Среднерусской возвышенности и Восточной Европы.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Впервые был проведен анализ популяционной структуры *Helix pomatia* в различных ландшафтных зонах юго-восточной части современного ареала с использованием морфометрических и биохимических маркеров. Полученные данные позволят расширить наши представления о микроэволюционных процессах, протекающих в популяциях адвентивных видов наземных моллюсков в современных условиях.

Практическая значимость. Сохранение локальных популяций виноградной улитки на территории России важно для сохранения этого вида в целом. В связи с этим анализ состояния популяционных генофондов имеет первостепенное значение при определении уровня жизнеспособности и выяснении естественных механизмов поддержания и регуляции численности этих групп. Опираясь на эти данные, можно решать задачи планирования нагрузки на популяции, в которых ведется ограниченный сбор улиток, разрабатывать методики лабораторного содержания, оценивать состояние популяций и определять меры по их охране.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Морфометрические показатели адвентивных популяций виноградной улитки в большей степени определяются их происхождением и микроклиматическими особенностями урбанизированной среды и в меньшей степени зависят от зональных характеристик климата.

2. Частоты генетически детерминированных окрасочных признаков раковины в аборигенных популяциях моллюсков рода *Helix* остаются стабильными на протяжении длительного времени, в то время как изменчивость конхиометрических признаков диктуется климатическими флуктуациями.

3. Генетическая структура адвентивных популяций *H. pomatia* сформировалась под влиянием дрейфа генов и компенсаторных реакций геномов.

4. Большинство изученных популяций *H. pomatia* обладают повышенной жизнеспособностью, что объясняется большой устойчивостью их геномов к негативным воздействиям различных факторов, включая антропогенные.

Личный вклад автора. В основу диссертационной работы положены материалы, собранные автором в период с 2009 г. по 2014 г. Экспериментальные исследования проводились лично автором на базе НИЛ Популяционной генетики и генотоксикологии НИУ «БелГУ». Автором лично выполнена статистическая обработка, анализ и обобщение полученных данных. Суммарно личное участие автора составляет около 80 %.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на: XI международной научно-практической экологической конференции «Видовые популяции и сообщества в антропогенно трансформированных ландшафтах:

состояние и методы его диагностики» (Белгород, 20-25 сентября 2010 г.); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования» (г. Нижний Тагил, 26-29 марта 2012 г.); Всероссийской научной конференции с международным участием «Животные: экология, биология и охрана» (г. Саранск, 2012 г.); XII научно-практической экологической конференции «Структурные и функциональные изменения в популяциях и сообществах на территориях с разным уровнем антропогенной нагрузки» (г. Белгород, 9-12 октября 2012 год); XIII Международной научно-практической экологической конференции «Биоразнообразии и устойчивость живых систем» (г. Белгород, 6-11 октября 2014 г.), 1 Всероссийской научной конференции "Эволюционные и экологические аспекты изучения живой материи" (Череповец, 8-9 февраля 2017 г.).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы. Основной текст изложен на 134 страницах, включающих 20 рисунков и 28 таблиц. Список литературы включает 372 источника, из них 173 на иностранных языках. Общий объем диссертации составляет 176 страница.

Благодарности. Выражаю благодарность моему научному руководителю Э.А. Снегину за многочисленные консультации и помощь на всех этапах написания работы, а также Ф.Н. Лисецкому, А. Корабеку, И.А. Балашеву, С.С. Крамаренко, Е.Н. Иванцовой и Я.Н. Коваленко за оказанное содействие в сборе материала.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе даётся общая характеристика роли популяционного уровня организации живых организмов, а также краткий обзор содержания работ, посвященных роли полиморфизма в эволюционном процессе, вышедших в свет более чем за полувековой период времени. Рассматриваются генетические основы полиморфизма. Освещаются вопросы, касающиеся изменчивости в популяциях моллюсков – морфологической и биохимической, а также изменчивости ДНК. Обобщены данные по биологии виноградной улитки и особенностям расселения и ареала обитания вида. Собрана современная информация по охранному статусу изучаемого объекта в различных частях ареала обитания. Поскольку большинство изучаемых нами групп *H. pomatia* располагались на восточной границе его ареала, были затронуты вопросы, связанные с особенностями существования популяций, занимающих периферийные участки ареала. Эти краевые группы, как правило, изолированы, в них происходят более резкие колебания численности. Кроме того, на периферии могут действовать иные векторы естественного отбора, т.к. пограничные микросреды отличны от микросред внутренней части ареала. Итогом действия перечисленных факторов может стать гомозиготизация аллелофонда таких периферийных популяций и, как следствие, выщепление рецессивных мутаций, что создает условия для

оживления явлений первичного формообразования. Известно также, что экстремальные для данного вида абиотические и биотические условия среды обитания, которые существуют на краю ареала, в свою очередь, могут способствовать усилению географической изменчивости, следствием чего внутрипопуляционное разнообразие в центре ареала может переходить в межпопуляционное разнообразие на периферии (Тимофеев-Ресовский и др., 1973).

Глава 2. РАЙОН ИССЛЕДОВАНИЯ: ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ

В главе дается краткая характеристика физико-географических условий юга Среднерусской возвышенности, включающего лесостепную и степную зоны, а также других регионов, где осуществлялся сбор материала. Проведено сопоставление биотопических и климатических условий. Рассмотрены экологические проблемы районов исследования.

Глава 3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал для исследования был собран в 15-ти пунктах, охватывающих разные ландшафтные зоны (рис.1). Основные исследования проводились на юге лесостепи Среднерусской возвышенности (пункты № 2-8, 11). Часть выборок была сделана в зоне широколиственных лесов (Московская область, пос. Быково, пункт № 12), в зоне хвойно-широколиственных лесов (г. Тверь, пункт № 1), в зоне смешанных и широколиственных лесов Приднепровской возвышенности (г. Киев, пункт № 10) и Полесской низменности (г. Житомир, № 9), а также в Центральной Европе из окрестностей городов Прага (пункт № 13), Буковце (пункт № 14) и Вроцлав (пункт № 15).

Ввиду особого охранного статуса исследуемого вида, для экспериментального анализа у животного отщипывали небольшой фрагмент ноги, избегая тем самым его умерщвления.

В качестве маркеров популяционной структуры *H. pomatia* нами были использованы метрические и фенетические признаки раковины, локусы аллозимов и межмикросателлитные (*ISSR*) участки ДНК.

Измерение раковин моллюсков осуществляли при помощи штангенциркуля с точностью до 0,1 мм. Анализу подвергали только раковины особей, закончивших рост и имеющих отворот устья. Измерение конхиологических параметров раковины производили по стандартной схеме (Шилейко, 1978) с небольшими изменениями: измеряли большой диаметр раковины (*БДР*), высота раковины (*ВР*), высота устья (*ВУ*), ширина устья (*ШУ*), высота завитка (*ВЗ*), ширина завитка (*ШЗ*). Далее вычисляли объем раковины ($V = \pi R^2 \times ВР / 2$) и площадь устья ($S = 3,145 \times ВУ \times ШУ / 4$) (Rensch, 1932). Также рассчитывали индексы $ВР/БД$, $ВУ/ШУ$, $ВЗ/ВР$, $ВЗ/ШЗ$ и V/S .

Фенетический анализ проводили по комбинации и степени выраженности пяти продольных коричневых лент на раковине. Ленты нумеровали от 1 до 5, если полоса отсутствовала, то ставили цифру 0. Номера слившихся полос заключали в скобки (Крамаренко, Крамаренко, 2009 и др.). После этого оценивали частоту каждой морфы в популяции, вычисляли среднее число морф (μ), частоту редких морф (h), а также рассчитали показатель сходства популяций по фенетическим признакам (r) (Животовский, 1979, 1991).

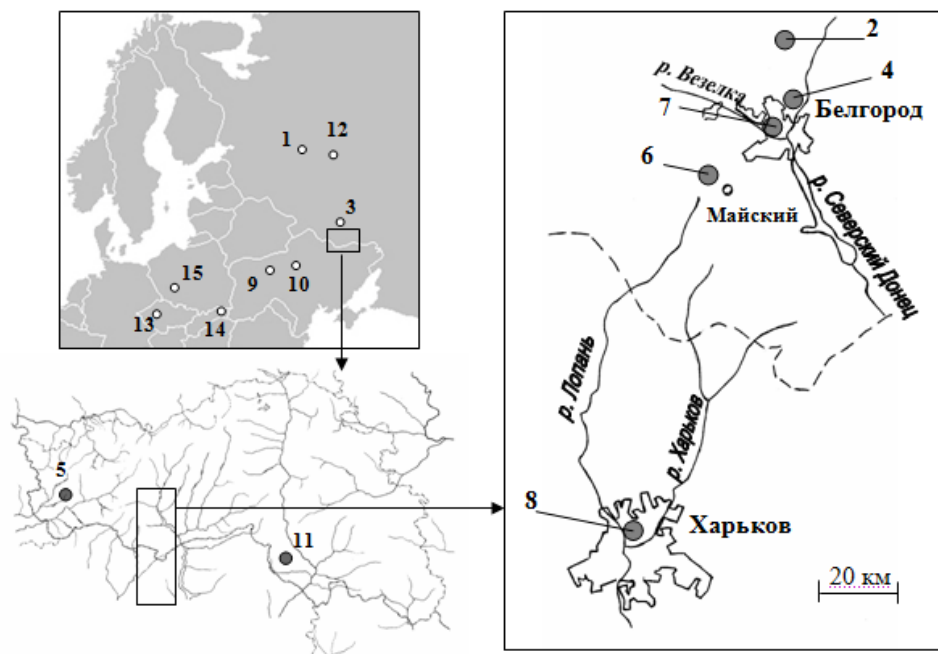


Рис. 1 Пункты сбора *N. rotatia*: 1 – «Тверь», 2 – «Шопино», 3 – «Курск», 4 – «Донец», 5 – «Хотмыжск», 6 – «Майский», 7 – «Белгород», 8 – «Харьков», 9 – «Житомир», 10 – «Киев», 11 – «Яблоново», 12 – «Быково», 13 – «Прага», 14 – «Буковце», 15 – «Вроцлав»

Электрофорез изоферментов проводили в вертикальных пластинах 10% полиакриламидного геля (ПААГ) по общепринятой методике (Остерман, 1981). В качестве генетических маркеров использовали два локуса мономерных эстераз (*EST3* и *EST4* с тремя аллелями каждый), димерный локус супероксиддисмутазы с двумя аллелями (*SOD1*) и димерный локус малатдегидрогеназы с двумя аллелями (*MDH1*) (Снегин, Артемчук, 2014).

Анализ полиморфизма ДНК проводили с использованием полимеразной цепной реакции методом *ISSR* (*Inter Simple Sequence Repeats*) (Zietkiewicz et al., 1994). ДНК выделяли согласно протоколу набора реактивов *Silica uni* на основе сорбента (Биокот, Россия). Для исследования были использованы праймеры: *UBS-809* (5'-(AG)₈G-3'), *UBS-811* (5'-(GA)₈C-3'), *UBS-827* (5'-(AC)₈G-3'). Амплификацию проводили в термоциклерах MJ Mini и MyCycler (Bio-Rad, США). Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с использованием TAE буфера. Блоки окрашивали бромистым этидием. По картинам амплифицированных

фрагментов, полученных в ходе электрофореза, составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось как «1» (аллель p), отсутствие «0» (аллель q). У *H. pomatia* нами диагностировано 57 локусов.

Степень устойчивости популяций *H. pomatia* к действию генотоксичных ксенобиотиков среды определяли с помощью метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет) (Rydberg, Johanson, 1978). При этом из анализируемых групп отбирали по 10 особей, в каждой из которых анализировали не менее 100 ядер. Ядра ранжировали по пяти степеням разрушения ДНК. Анализ изображений проводили в программе CometScore™. В дальнейшем полученные данные использовали для расчета индекса ДНК-комет (Struwe et al., 2007): $I_{ДНК} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma$, где n_0 - n_4 - число «ДНК-комет» каждого из 5 условных типов, а Σ - общая сумма подсчитанных комет. Дополнительно, на каждом препарате мы учитывали клетки, находящиеся в состоянии апоптоза.

Всего по морфометрическим показателям изучено 1109 особей, по аллозимам – 499 особей, по ДНК-локусам – 511 особей. Ввиду того, что в пункте № 11 «Яблоново» найдено всего 3 живых особи, анализ этой группы был проведен только по конхиологическим признакам. В пунктах № 13 «Прага», № 14 «Буковце», № 15 «Вроцлав» собранный материал представлял собой заспиртованные фрагменты животных, поэтому исследования были проведены только по ДНК-локусам.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакетов программ Statistica 6 (TL 835), GenAlEx (Peakall, Smouse, 2006), PopGene 1.32 (Yeh et al., 2000) и MEGA6 (Tamura et al., 2013).

ГЛАВА 4. ФЕНЕТИЧЕСКИЙ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ *HELIX POMATIA*

Согласно полученным данным, подавляющее большинство изученных популяций оказались фенетически сходными, с преобладанием в них фенотипов со слившимися 2 и 3 лентами (табл. 1). В общем популяционном разнообразии на долю межпопуляционных отличий пришлось лишь 2 % изменчивости, при этом индекс подразделенности популяций $F_{st} = 0,024$. Наибольшее разнообразие комбинаций отмечено в группах из г. Киев и пос. Хотмыжск Белгородского области. Самой мономорфной оказалась группа из пос. Майский. По результатам расчетов показателя фенетического сходства (r) наименьшие фенетические дистанции ($r = 0,999$) отмечены между группами, «Курск»-«Майский» и «Яблоново»-«Майский», «Курск»-«Яблоново». Дальше всех дистанцировалась группа из г. Тверь ($r_{сред} = 0,836$). Таким образом, анализ фенотипического облика популяций *H. pomatia* позволил с одной стороны говорить о сходных генетических процессах, протекающих в изучаемых группах, а с другой стороны, позволил выявить наиболее оригинальные по данным признакам популяции, что отчасти говорит об их происхождении и различиях векторов естественного отбора.

Таблица 1

Частоты фенотипов и показатели фенетического разнообразия в популяциях *Helix pomatia*

Фено- типы	Пункты											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
12345	0,286	0,059	0,226	0,220	0,229	0,191	0,315	0,085	0,132	0,222	0,200	0,095
1(23)	0,429	0,833	0,774	0,660	0,657	0,809	0,676	0,831	0,842	0,689	0,800	0,857
10345	0,000	0,000	0,000	0,120	0,057	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000
(123)	0,286	0,000	0,000	0,000	0,057	0,000	0,000	0,070	0,026	0,000	0,000	0,048
1(234)	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,044	0,000	0,000
0(23)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000
02345	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000
$\mu \pm$ $S\mu$	2,971 $\pm 1,308$	2,085 $\pm 0,549$	1,836 $\pm 0,553$	2,650 $\pm 0,480$	3,122 $\pm 0,588$	1,786 $\pm 0,370$	2,186 $\pm 0,308$	2,516 $\pm 0,399$	2,081 $\pm 0,519$	3,277 $\pm 0,521$	1,800 $\pm 0,517$	2,110 $\pm 0,701$
$h \pm$ Sh	0,576 $\pm 0,187$	0,702 $\pm 0,078$	0,738 $\pm 0,079$	0,621 $\pm 0,069$	0,554 $\pm 0,084$	0,745 $\pm 0,053$	0,688 $\pm 0,044$	0,641 $\pm 0,057$	0,703 $\pm 0,074$	0,532 $\pm 0,074$	0,743 $\pm 0,074$	0,699 $\pm 0,100$
<i>N</i>	7	34	31	50	35	68	111	71	38	45	35	21

Примечание: μ - среднее число морф, h - доля редких морф (Животовский, 1991).

Пункты: 1-«Тверь», 2-«Шопино», 3-«Курск», 4-«Донец», 5-«Хотмыжск», 6-«Майский», 7-«Белгород», 8-«Харьков», 9-«Житомир», 10-«Киев», 11-«Яблоново», 12-«Быково»

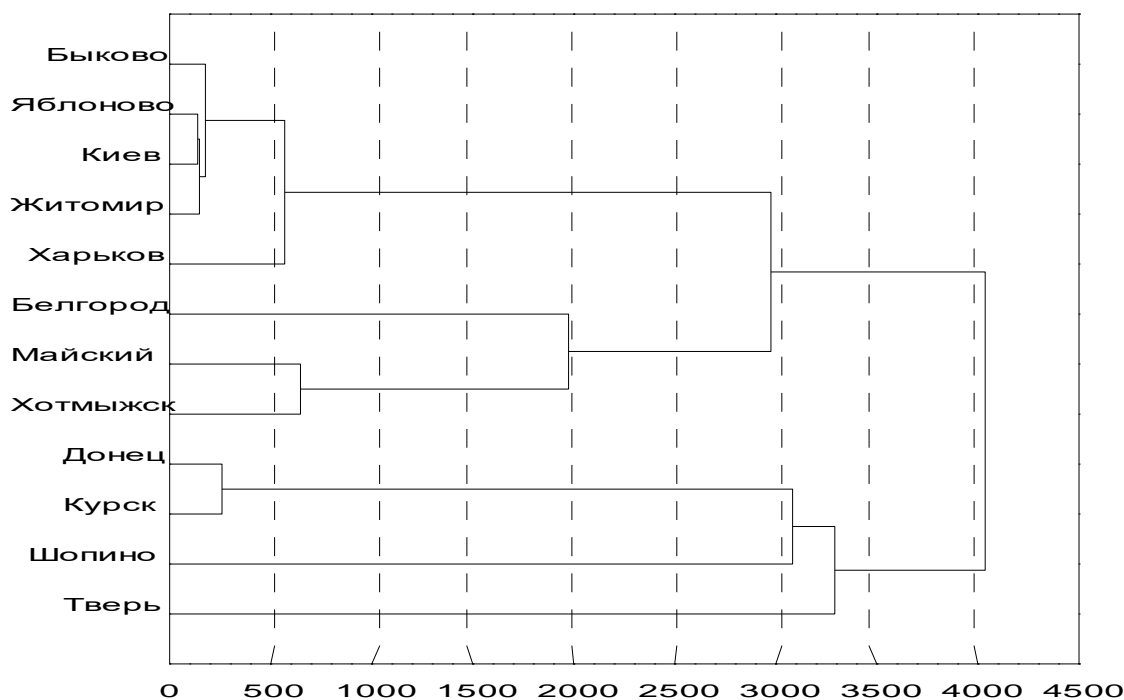
Несколько иной результат был получен по конхиметрическим показателям (табл. 2).

Таблица 2

Значения метрических признаков раковины в колониях *H. pomatia*
(мм, $M \pm \Delta$, $P < 0,05$, обозначение популяций как в таблице 1)

Пункт	<i>N</i>	<i>BP</i>	<i>БДР</i>	<i>ВУ</i>	<i>ШУ</i>	<i>ВЗ</i>	<i>ШЗ</i>	<i>ВЗ/ШЗ</i>	<i>ВЗ/ВР</i>	<i>ВР/БДР</i>	<i>ВУ/ШУ</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>V/S</i>
1	7	37,5 $\pm 2,4$	36,6 $\pm 2,4$	27,8 $\pm 1,1$	24,5 $\pm 2,5$	10,9 $\pm 1,1$	27,2 $\pm 1,8$	0,40 $\pm 0,02$	0,29 $\pm 0,01$	1,02 $\pm 0,03$	1,16 $\pm 0,12$	25635,0 $\pm 4751,6$	534,1 $\pm 56,3$	47,5 $\pm 4,5$
2	24	38,3 $\pm 0,7$	39,9 $\pm 0,8$	27,4 $\pm 0,6$	24,7 $\pm 0,8$	12,1 $\pm 0,6$	29,5 $\pm 0,6$	0,41 $\pm 0,02$	0,31 $\pm 0,01$	0,96 $\pm 0,01$	1,12 $\pm 0,06$	30698,0 $\pm 1702,8$	532,5 $\pm 24,4$	58,1 $\pm 4,0$
3	14	42,8 $\pm 1,1$	41,6 $\pm 1,1$	30,2 $\pm 0,9$	26,7 $\pm 0,9$	13,4 $\pm 0,9$	30,8 $\pm 0,9$	0,43 $\pm 0,02$	0,31 $\pm 0,01$	1,03 $\pm 0,02$	1,13 $\pm 0,02$	37331,8 $\pm 2799,0$	634,4 $\pm 37,2$	58,7 $\pm 2,1$
4	40	37,6 $\pm 0,6$	37,5 $\pm 0,8$	26,2 $\pm 0,4$	23,7 $\pm 0,5$	13,0 $\pm 1,4$	27,5 $\pm 0,9$	0,47 $\pm 0,04$	0,34 $\pm 0,04$	1,01 $\pm 0,02$	1,11 $\pm 0,01$	26661,9 $\pm 1349,9$	489,8 $\pm 16,4$	54,3 $\pm 1,8$
5	29	36,9 $\pm 0,7$	37,3 $\pm 0,7$	25,9 $\pm 0,5$	23,8 $\pm 0,5$	11,2 $\pm 0,4$	27,6 $\pm 0,7$	0,40 $\pm 0,01$	0,30 $\pm 0,01$	0,99 $\pm 0,01$	1,09 $\pm 0,01$	25805,6 $\pm 1439,0$	485,0 $\pm 19,4$	53,0 $\pm 1,3$
6	656	38,3 $\pm 0,3$	36,3 $\pm 0,3$	26,9 $\pm 0,2$	22,9 $\pm 0,2$	11,4 $\pm 0,2$	26,9 $\pm 0,3$	0,42 $\pm 0,01$	0,29 $\pm 0,01$	1,05 $\pm 0,01$	1,19 $\pm 0,01$	26092,2 $\pm 615,0$	489,4 $\pm 8,5$	52,5 $\pm 0,6$
7	167	35,0 $\pm 0,6$	33,4 $\pm 0,5$	23,7 $\pm 0,4$	20,3 $\pm 0,4$	11,3 $\pm 0,4$	25,5 $\pm 0,5$	0,44 $\pm 0,01$	0,32 $\pm 0,01$	1,05 $\pm 0,01$	1,18 $\pm 0,02$	20043,9 $\pm 813,3$	381,5 $\pm 13,1$	52,4 $\pm 1,4$
8	61	35,3 $\pm 0,9$	35,5 $\pm 0,7$	25,1 $\pm 0,4$	19,1 $\pm 0,7$	10,6 $\pm 0,9$	25,0 $\pm 0,8$	0,42 $\pm 0,04$	0,28 $\pm 0,01$	0,99 $\pm 0,01$	1,32 $\pm 0,08$	22662,7 $\pm 1387,2$	379,1 $\pm 18,6$	61,0 $\pm 5,0$
9	38	40,2 $\pm 0,9$	38,8 $\pm 1,0$	27,6 $\pm 0,8$	25,1 $\pm 0,6$	12,5 $\pm 0,5$	29,4 $\pm 1,0$	0,43 $\pm 0,02$	0,31 $\pm 0,01$	1,03 $\pm 0,02$	1,10 $\pm 0,02$	34040,2 $\pm 1926,1$	581,7 $\pm 26,0$	58,5 $\pm 1,5$
10	31	36,1 $\pm 1,2$	34,5 $\pm 1,2$	25,1 $\pm 0,7$	21,9 $\pm 0,8$	10,9 $\pm 0,7$	25,3 $\pm 0,9$	0,43 $\pm 0,02$	0,30 $\pm 0,01$	1,04 $\pm 0,01$	1,15 $\pm 0,03$	22017,6 $\pm 2030,4$	434,5 $\pm 26,0$	50,0 $\pm 2,4$
11	26	38,3 $\pm 1,2$	40,0 $\pm 1,1$	28,3 $\pm 0,7$	24,0 $\pm 0,7$	10,4 $\pm 0,6$	26,5 $\pm 0,7$	0,39 $\pm 0,02$	0,27 $\pm 0,02$	0,96 $\pm 0,02$	1,18 $\pm 0,02$	30957,4 $\pm 2345,2$	534,7 $\pm 26,4$	57,6 $\pm 2,7$
12	15	36,9 $\pm 1,5$	37,0 $\pm 1,2$	26,6 $\pm 0,6$	23,6 $\pm 1,3$	11,9 $\pm 0,4$	26,5 $\pm 0,9$	0,45 $\pm 0,01$	0,32 $\pm 0,01$	0,995 $\pm 0,01$	1,14 $\pm 0,04$	25944,2 $\pm 2652,9$	498,4 $\pm 38,7$	51,3 $\pm 1,3$

Согласно однофакторному дисперсионному анализу (ANOVA), по всем признакам межпопуляционные варианты достоверно превосходили внутривидовые (P<0,05). При этом, кластеризация выборок по конхиологическим признакам не выявила какой-либо зависимости средних параметров раковины от географического положения группы (рис. 2). Так, в один и тот же кластер со смежными популяциями «Житомир», «Киев», «Харьков» и «Яблоново» попала довольно удаленная от них группа «Быково» из Подмосквья. А популяции Белгородской области попали в разные кластеры. Кроме того, у данного вида нами не отмечено достоверной связи размерных характеристик с широтной зональностью, которая прослеживается у аборигенных видов (т.е. мы должны были ожидать клинальное увеличение размеров тела виноградной улитки по мере продвижения с северо-востока на юго-запад, однако этого не произошло). Например, в южных городах Киев, Харьков, Белгород улитки обладают достоверно меньшими морфометрическими показателями, сходными с северными группами из г. Тверь и Подмосквья, а самые крупные особи отмечены в популяции г. Курска и г. Житомира. Это объясняется тем, что все анализируемые нами популяции являются адвентивными и сравнительно молодыми группами, генофонды которых сформировались в иных климатических зонах. Кроме того, эти колонии в большинстве приурочены к урбанизированным территориям, где городская среда создает определенный микроклимат, который может сильно отличаться от зональных характеристик.



Эвклидово расстояние

Рис.2 Дендрограмма морфометрических признаков популяций *H. pomatia*

Среди изученных групп весьма примечательной является популяция из Валуйского района Белгородской области (№ 11), которая была описана еще в начале XX века (Величковским, 1910) и является единственной из изученных популяций натурализовавшейся в естественной среде. В настоящее время эта популяция, вероятно, находится в состоянии депрессии. Здесь нами было найдено только три живых экземпляра, поэтому сравнительный анализ нам удалось провести, используя только раковины отмерших моллюсков. Стоит упомянуть, что по данным секвенирования консервативных последовательностей м-ДНК чешским исследователем Анжеем Корабеком (Korabek et al., 2015), которому мы предоставили материал, было выдвинуто предположение, что данная группа относится к форме *Helix thessalica*.

Также нами был рассмотрен вопрос о временных изменениях морфологических показателей раковины моллюсков рода *Helix*. Для этого было проведено сопоставление морфометрических показателей раковин родственного вида *Helix albescens*, собранных на месте раскопок поселений человека на Северо-Западе Крымского полуострова возраста 2280 лет (поселение Кельшейх - 45°26'14" с.ш; 32°42'28" в.д.) (Столба и др. 2013) с аналогичными показателями раковин современных улиток, обитающих в этом же районе.

Результаты показывают, что в аборигенных популяциях моллюсков присутствует временная стабильность генетически детерминированных окрасочных признаков (комбинаций продольных лент на раковине), об этом говорят высокие значения показателей фенетического сходства между современными и ископаемыми раковинами ($r=0,967-0,982$), а также малое значение индекса генетической дифференциации $\Phi_{st}=0,006$. При этом было установлено, что изменчивость конхиометрических признаков во многом определяются климатическими флуктуациями. В частности, достоверно более мелкие размеры ископаемых раковин по сравнению с современными раковинами этого ксеромезофильного вида (табл. 3), указывают на то, что климат в районе исследования в прошедшую эпоху был более мягким. Этот вывод подтверждается палеоботаническими и археологическими данными, согласно которым ранее на этом ныне степном участке произрастали широколиственные леса, уничтоженные впоследствии человеком (Подгородецкий, 1962; Щеглов, 1976).

Таблица 3

Конхиометрические признаки популяций *Helix albescens*

Пункт	BP	БДР	ВУ	ШУ	V мм ³	S мм ²	V/S	BP/БДР	ВУ/ШУ
1 - современные (N=92)	30,6 ±0,4	33,1 ±0,4	23,0 ±0,3	20,9 ±0,3	16888,3 ±592,5	377,4 ±10,1	44,7 ±0,8	0,927 ±0,009	1,102 ±0,013
2 - современные (N=76)	30,1 ±0,3	32,1 ±0,5	22,4 ±0,3	20,5 ±0,3	15571,3 ±525,8	361,1 ±9,5	43,1 ±0,8	0,941 ±0,013	1,095 ±0,010
3 - ископаемые (N=104)	28,6 ±0,4	30,8 ±0,4	21,4 ±0,3	19,3 ±0,3	13744,2 ±573,7	325,4 ±9,9	42,0 ±0,7	0,928 ±0,007	1,110 ±0,011

Учитывая родственные связи *H. albescens* и *H. pomatia* и сходные варианты изменчивости конхиологических признаков у обоих видов, можно с большой уверенностью утверждать, что полученные результаты можно проецировать и на *H. pomatia*, ископаемые раковины которых можно также использовать для реконструкции палеоусловий.

Глава 5. АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ И ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ *HELIX POMATIA* НА ОСНОВЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Следующим этапом наших исследований был анализ популяционной структуры виноградной улитки с помощью полиморфных локусов аллозимов и ДНК-маркеров.

Уровни генетической гетерогенности исследуемых популяций по аллозимам приведены в таблице 4.

Таблица 4

Показатели генетической изменчивости в изучаемых популяциях *H. pomatia*

Популяция	<i>N</i>	<i>P</i> %	<i>Aa</i>	<i>Ae</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>
1. Тверь	7	50,0	1,50	1,32	0,273±0,167	0,214±0,137	0,184±0,117	-0,167
2. Шопино	24	75,0	2,00	1,32	0,277±0,189	0,167±0,153	0,164±0,125	0,271
3. Курск	31	100,0	2,25	1,58	0,568±0,075	0,185±0,062	0,356±0,050	0,488
4. Донец	40	50,0	1,75	1,50	0,364±0,244	0,181±0,114	0,220±0,148	0,131
5. Хотмыжск	29	75,0	1,75	1,55	0,445±0,159	0,328±0,164	0,306±0,114	0,029
6. Майский	223	100,0	2,50	1,68	0,575±0,134	0,286±0,094	0,366±0,098	0,323
7. Белгород	28	50,0	1,75	1,40	0,313±0,225	0,196±0,163	0,187±0,138	0,090
8. Харьков	31	25,0	1,25	1,22	0,165±0,165	0,121±0,121	0,117±0,117	-0,037
9. Житомир	35	75,0	2,00	1,15	0,242±0,088	0,050±0,034	0,124±0,044	0,519
10. Киев	28	100,0	2,50	1,87	0,703±0,072	0,295±0,101	0,453±0,052	0,415
12 Быково	23	75,0	2,00	1,77	0,553±0,218	0,359±0,124	0,354±0,133	-0,043
Среднее		70,4 ±7,4	1,93 ±0,11	1,49 ±0,08	0,407 ±0,051	0,217 ±0,035	0,257 ±0,033	0,236 ±0,061

Примечание: *N* – число особей в выборке; *Aa* – среднее число аллелей; *Ae* – эффективное число аллелей; *I* – индекс Шеннона; *Ho* – наблюдаемая гетерозиготность; *He* – ожидаемая гетерозиготность; *F* – индекс фиксации (коэффициент инбридинга)

Согласно данным, полученным в результате расчета частот аллелей по используемым локусам, в 27,2 % случаев в изучаемых популяциях был отмечен достоверный ($P \geq 0,05$) дефицит гетерозиготных генотипов, в 29,5 % процентов случаев выявлена гомозиготность по одному из аллелей. Достоверный избыток гетерозигот зафиксирован только в одном случае (пункт 5, локус *EST4*). В остальных случаях достоверных различий между фактической и теоретически ожидаемой гетерозиготностью не отмечено.

При этом не прослеживается связи генного разнообразия с географическим положением групп улиток. Наиболее мономорфной

оказалась популяция из г. Житомир. Также пониженные значения показателей генетической изменчивости характерны для популяций из пунктов Шопино и Харьков, а наиболее разнообразными оказались группы Курск, Майский и Киев.

Стоит отметить, что в изучаемых популяциях нами зафиксирована достоверная корреляция между объемом раковины и коэффициентом инбридинга ($r_{F/V} = 0,598 \pm 0,214$, $t = 2,79$, $P < 0,05$). Дело в том, что некоторые адвентивные группы могли быть основаны единичными особями. В ходе близкородственного скрещивания (а возможно и аутомиксиса) после достижения инбредного минимума отбор мог способствовать выживанию улиток с наиболее удачными генетическими комбинациями, побочным эффектом действия которых было увеличение размеров животных. Сохранению инбредных линий мог способствовать конкурентный вакуум, в котором оказались адвентивные группы. В дальнейшем, вполне возможно, происходило ассортативное скрещивание, в ходе которого наиболее крупные особи предпочитали образовывать пары с себе подобными.

Ввиду того, что для изучения генетической структуры популяций *H. pomatia* были использованы относительно небольшие выборки, в которых содержалась лишь небольшая часть популяционного аллелофонда, не дающая полноценного представления об общем разнообразии в группах, нами был проведен анализ потенциальной мультилокусной изменчивости, позволяющей оценить потенциальное разнообразие популяций. С этой целью для каждой из 476 особей мы рассчитали мультилокусные комбинации. После чего, в каждой популяции мы подсчитали общее количество мультилокусных генотипов (N_{MLG}) и число уникальных мультилокусных генотипов (N_{MLG-1}), которые были обнаружены в одной единственной выборке. Далее с учетом распределения частот мультилокусных генотипов, в каждой популяции было вычислено потенциальное генетическое разнообразие, которое можно было ожидать при увеличении объема выборки до бесконечности (N_{max}). Данный анализ мы провели, используя два непараметрических метода: метод Chao1-bc (bias-corrected form for the Chao1) (Chao, 2005) и метод «складного ножа» первого порядка (1st order jackknife) (Burnham, Overton, 1978). Расчеты были проведены нами с помощью программы SPADE (Chao, Shen, 2009). Результаты анализа мультилокусных генотипов представлено в таблице 5.

Анализ продемонстрировал, что среди изученных популяций наиболее потенциально богатым генофондом обладают группы из окрестностей г. Курск (№ 3) и из поселка Майский (№ 6). Самой мономорфной оказалась группа, обитающая в г. Харьков (№ 8). По количеству уникальных генетических комбинаций (N_{MLG-1}) также лидирует группа «Майский», а также популяция из г. Киев. Стоит отметить, что И. И. Шмальгаузен (1968) назвал аллельное разнообразие «мобилизационным резервом» популяции, обеспечивающим ей более стабильное существование во времени. Таким образом, учитывая данное обстоятельство, выявленная нами дифференциация популяций *Helix pomatia* по потенциальному количеству

мультилокусных генотипов, позволяет судить об уровне жизнеспособности изученных групп.

Таблица 5

Количество отмеченных мультилокусных генотипов и оценки потенциального генетического разнообразия, полученные разными методами для исследованных популяций *Helix pomatia*

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. «Тверь»	4	0	4,4±1,1	4,0 – 11,3	5,7±1,8	4,3 – 13,2
2. «Шопино»	6	1	8,9±4,2	6,3 – 29,7	8,9±2,4	6,7 – 17,8
3. «Курск»	19	3	120,6±54,4	57,0 – 290,7	33,5±5,3	26,2 – 48,2
4. «Донец»	10	0	11,5±2,5	10,1 – 24,8	12,9±2,4	10,7 – 22,0
5. «Хомыжск»	13	0	47,8±24,7	22,9 – 134,6	21,7±4,1	16,6 – 34,1
6. «Майский»	46	17	62,9±10,6	51,5 – 98,3	63,9±6,0	55,5 – 79,9
7. «Белгород»	9	1	11,9±4,0	9,4 – 31,3	12,9±2,8	10,1 – 22,6
8. «Харьков»	3	0	3,0±0,0	3,0	3,0±0,0	3,0
9. «Житомир»	7	1	8,2±1,6	7,2 – 15,7	8,9±2,0	7,4 – 17,0
10. Киев»	23	9	47,6±15,8	30,7 – 101,0	40,4±5,8	32,1 – 56,0
12. Быково	14	4	19,4±5,1	15,1 – 40,1	21,7±3,9	17,0 – 33,5

Несколько иной результат был получен по ДНК-локусам, согласно которому наиболее мономорфной группой является популяция из г. Киев (№ 10) (табл. 6). Чуть выше уровень генетической изменчивости отмечен в г. Харьков (№ 8).

Таблица 6

Усредненные по совокупности ДНК-локусов меры генетической гетерогенности в популяциях *H. pomatia* (обозначения см. в таблице 4)

Пункт	N	$P\%$	A	Ae	He	I
1. «Тверь»	7	49,12	1,491±0,067	1,333±0,052	0,188±0,028	0,275±0,040
2. «Шопино»	24	68,42	1,684±0,062	1,323±0,051	0,188±0,026	0,288±0,036
3. «Курск»	15	64,91	1,649±0,064	1,363±0,051	0,210±0,027	0,315±0,038
4. «Донец»	42	89,47	1,895±0,041	1,280±0,033	0,192±0,019	0,318±0,026
5. «Хомыжск»	29	64,91	1,649±0,064	1,327±0,048	0,193±0,026	0,293±0,037
6. «Майский»	115	80,70	1,807±0,053	1,325±0,046	0,197±0,025	0,306±0,035
7. «Белгород»	65	87,72	1,877±0,044	1,328±0,043	0,207±0,022	0,330±0,031
8. «Харьков»	68	84,21	1,842±0,049	1,262±0,036	0,175±0,020	0,287±0,029
9. «Житомир»	35	63,16	1,632±0,064	1,318±0,049	0,187±0,026	0,284±0,037
10. Киев»	28	50,88	1,509±0,067	1,295±0,051	0,169±0,027	0,253±0,038
12. «Быково»	23	82,46	1,825±0,051	1,377±0,048	0,226±0,025	0,349±0,034
13. «Прага»	20	78,95	1,789±0,054	1,361±0,041	0,227±0,023	0,354±0,032
14. «Буковце»	20	59,65	1,596±0,065	1,354±0,051	0,205±0,027	0,306±0,038
15. «Вроцлав»	20	59,65	1,596±0,065	1,383±0,050	0,222±0,027	0,329±0,039
Среднее		70,30±3,60	1,701±0,058	1,331±0,046	0,199±0,025	0,306±0,035

Самые высокие средние значения ожидаемой гетерозиготности и индекса Шеннона характерны для популяций из окрестностей г. Прага (№ 12) и Подмосковья (№ 11). Наибольший процент полиморфных локусов отмечен в популяциях «Донец» (№ 4) и «Белгород» (№ 7). Также для группы «Донец»

характерно самое большое среднее число аллелей на локус, а по эффективному числу аллелей среди изученных групп лидирует популяция из окрестностей г. Вроцлав (№14). Таким образом, показатели генетической гетерогенности популяций, полученные с помощью аллозимов не коррелируют с аналогичными показателями, вычисленными на основе *ISSR*-маркеров. Данный факт свидетельствует о различиях генетических процессов, протекающих по нейтральным и селективно значимым локусам генома. Вероятно, аллельный состав и набор генетических комбинаций по аллозимам в большей степени определяется естественным отбором, тогда как структура популяционных генофондов, выявляемая по используемым ДНК-локусам, являются результатом дрейфа генов.

Учитывая тот факт, что самые западные из исследованных популяций, обитающие в Чехии, Словакии и Польше (№ 13, 14, 15), можно считать аборигенными и находящимися ближе к центру ареала, их генетическая изменчивость сопоставимая с восточными группами, вероятно, свидетельствует о том, что в случае антропохории, традиционная модель об уменьшении аллелофонда в периферийных группах, вероятно, нарушается. Данное явление может быть следствием непреднамеренного хаотичного заноса улиток (как единичных экземпляров, так и целых групп) на новые территории. При этом не исключено, что часть вновь образованных поселений быстро вымирают и не становятся объектами наблюдений. В то время как выжившие колонии в силу «эффекта Людвига», пройдя через горнило естественного отбора и стадии так называемой «генетической революции» (Майр, 1968) уже смогли сформировать сбалансированную генетическую систему, аналогичную центральным популяциям.

Весьма примечательно выглядит и тот факт, что попарный уровень дифференциации Φ_{st} между западными группами оказался сопоставимым с аналогичными показателями, вычисленными между восточными колониями. При этом в 56% случаев уровень разобщенности между восточными группами ($\Phi_{st}=0,093-0,232$) был ниже, чем между западными популяциями ($\Phi_{st}=0,257-0,372$). Таким образом, ранее высказанное правило, согласно которому внутривидовое разнообразие в центре ареала переходит в межвидовое разнообразие на периферии в случае с адвентивными группами *H. rotatia*, вероятно, также нарушается.

Результаты кластерного анализа по ДНК-локусам приведены на рисунке 3. В ряде случаев данные демонстрируют определенную зависимость степени генетического сходства между популяциями от их географической близости. Так довольно близкими оказались группы «Житомир» и «Киев» (кластер 2). Единый кластер также образовали популяции, относящиеся к югу Среднерусской возвышенности (кластер 1), которые разбились на две группы. В одну вошли колонии, обитающие в г. Белгород и г. Харьков, а в другую – колонии из г. Курска и Белгородской области. По данному распределению, вероятно, можно судить о родственных связях адвентивных колоний, постепенно осваивающих новые территории. Исключение составили только улитки из Подмосковья (пункт № 11

«Быково»), которые также попали в данную группу. Но происхождение этой колонии неизвестно, поэтому нельзя исключать ее родственных связей с более южными «соседями». Причем, учитывая тот факт, что колония «Харьков» в этом кластере известна с начала XX-го века (Белецкий, 1918), то ее можно расценивать как материнскую группу, давшую начало остальным колониям юга Среднерусской возвышенности.

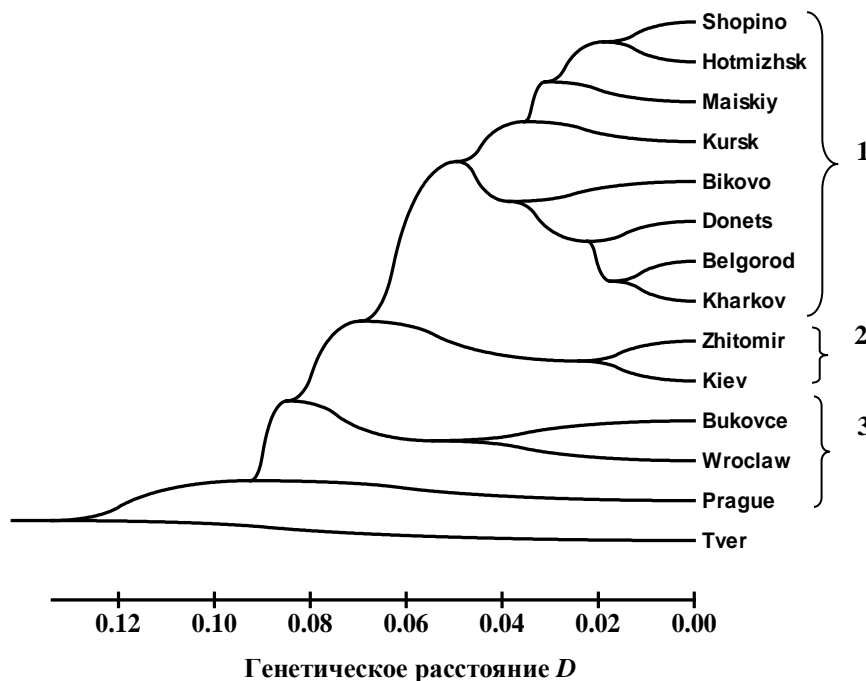


Рис. 3 Дендрограмма генетических расстояний по Неи (Nei, 1972) (UPGMA) между популяциями *H. romatia* по ISSR-маркерам

Сходные генофонды предсказуемо имеют западные группы из Чехии, Словакии и Польши (кластер 3). Наиболее удаленной, как генетически, так и географически, от всех групп оказалась популяция из г. Тверь (пункт 1).

Данные кластерного анализа по ДНК-локусам подтверждаются анализом регрессии между попарными значениями логарифмов уровня потока генов между популяциями и логарифмов географических дистанций между ними (рис. 4).

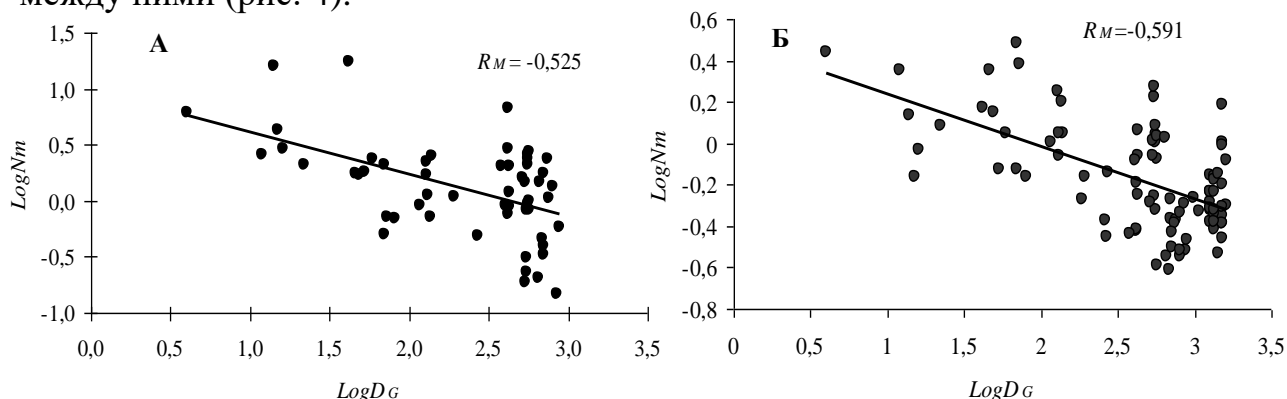


Рис. 4 Зависимость уровня потока генов Nm между парами популяций *H. romatia* от географического расстояния между ними D_G (км) (А – по аллозимам, Б – по ISSR-маркерам)

Коэффициент корреляции Мантеля $R_M = -0,591$ ($P=0,0004$, 9999 перестановок) указывает на имеющуюся обратную зависимость между этими показателями, что соответствует модели изоляции расстоянием, которая характерна для селективно нейтральных генов, и говорит о снижении роли стабилизирующего отбора в изучаемых группах (Slatkin, 1993). Аналогичный результат был нами получен при использовании в качестве генетических маркеров аллозимов $R_M = -0,525$ ($P=0,002$, 9999 перестановок), хотя распределение колоний по кластерам было несколько иным.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA, Excoffier et al., 1992) по изоферментным маркерам демонстрирует довольно сильную генетическую дифференциацию изучаемых популяций. Индекс дифференциации $\Phi_{st}=0,291$ незначительно превзошел аналогичный индекс, полученный с помощью F -статистики Райта $F_{st} = 0,254$. При этом уровень потока генов $Nm=0,609$ особи за поколение, а соотношение межпопуляционного разнообразия (Vap) к внутривидовому (Vwp) составило 30% / 70 % соответственно.

Весьма примечательным является тот факт, что уровень изменчивости и подразделенности изучаемых адвентивных колоний *H. pomatia* оказался сопоставимым с аналогичными показателями полученных ранее по аборигенным фоновым видам моллюсков, живущих на юге Среднерусской возвышенности *Br. fruticum* и *Ch. tridens*. Так у кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* – $\Phi_{st} = 0,300$, $F_{st} = 0,228$, $Vap / Vwp = 30 / 70$ %, а у *Chondrula tridens* – $\Phi_{st} = 0,295$, $F_{st} = 0,198$, $Vap / Vwp = 30 / 70$ %) (Снегин, 2012).

Анализ молекулярной дисперсии по ДНК-локусам выявил меньшую генетическую разобщенность между популяциями *H. pomatia*, чем по аллозимам. На межпопуляционные различия Vap пришлось 23 % изменчивости, при этом индекс дифференциации $\Phi_{st}=0,233$, а уровень потока генов $Nm=0,822$ особи за поколение.

Аналогичную картину мы наблюдаем при оценке степени дифференциации исследуемых популяций *H. pomatia* по различным локусам, полученных с помощью модели М. Неи (Nei, 1975). Полученный результат был сходен с показателями AMOVA. Так доля межпопуляционного генного разнообразия в общем разнообразии $G_{st}= 0,255$, при этом ожидаемая доля гетерозиготных генотипов во всей популяции $H_T=0,267\pm 0,030$, а среднее для всех субпопуляций значение внутривидового разнообразия $\bar{H}_s = 0,199\pm 0,017$.

У фоновых видов моллюсков указанные показатели дифференциации популяций по локусам ДНК были похожи. Например, у *Br. fruticum* $\Phi_{st}=0,298$, $Nm=0,708$, $Vap/Vwp=30/70$ %, а у *Ch. tridens* – $\Phi_{st}=0,185$, $Nm=0,954$, $Vap/Vwp=19/81$ %.

При этом стоит отметить, что уровень генетической разобщенности популяций виноградной улитки наравне с указанными фоновыми видами оказался значительно ниже, чем у популяций реликтового вида наземных моллюсков *Helicopsis striata* ($\Phi_{st}=0,404$, $Nm=0,360$, $Vap/Vwp=40/60$ %), также обитающего на юге Среднерусской возвышенности (Снегин, 2015).

Также нами была оценена степень устойчивости популяций *H. pomatia* к действию генотоксичных компонентов среды в условиях урбанизированного ландшафта. Уровень разрушения ДНК был оценен в четырех колониях *H. pomatia*, обитающих в г. Белгороде и его окрестностях. Согласно полученным данным во всех исследованных популяциях индекс ДНК-комет (ИДК) не превысил первой стадии разрушения (рис. 5), что свидетельствует с одной стороны об отсутствии в биотопах генотоксичных поллютантов, что весьма сомнительно, т.к. все изученные группы находятся в урбанизированной среде. С другой стороны, этот факт говорит об эффективной работе репаративной системы у *H. pomatia*, активно восстанавливающей поврежденную ДНК. Тем не менее, на основе сопоставления полученных индексов разрушения ДНК удалось установить, что более чистой зоной является пойма р. Северский Донец (пункт № 4), а наиболее загрязненной – биотоп в пос. Майский (№ 6). Аналогичный результат был получен при сопоставлении популяций виноградной улитки по проценту клеток, находящихся в состоянии апоптоза. Наибольшее количество таких клеток было отмечено в выборке из группы «Майский» ($6,0 \pm 0,5\%$), немного меньше в выборке «Белгород» ($4,9 \pm 0,5\%$). Достоверно им уступили выборки «Донец» ($1,0 \pm 0,3\%$) и «Шопино» ($0,2 \pm 0,1\%$).

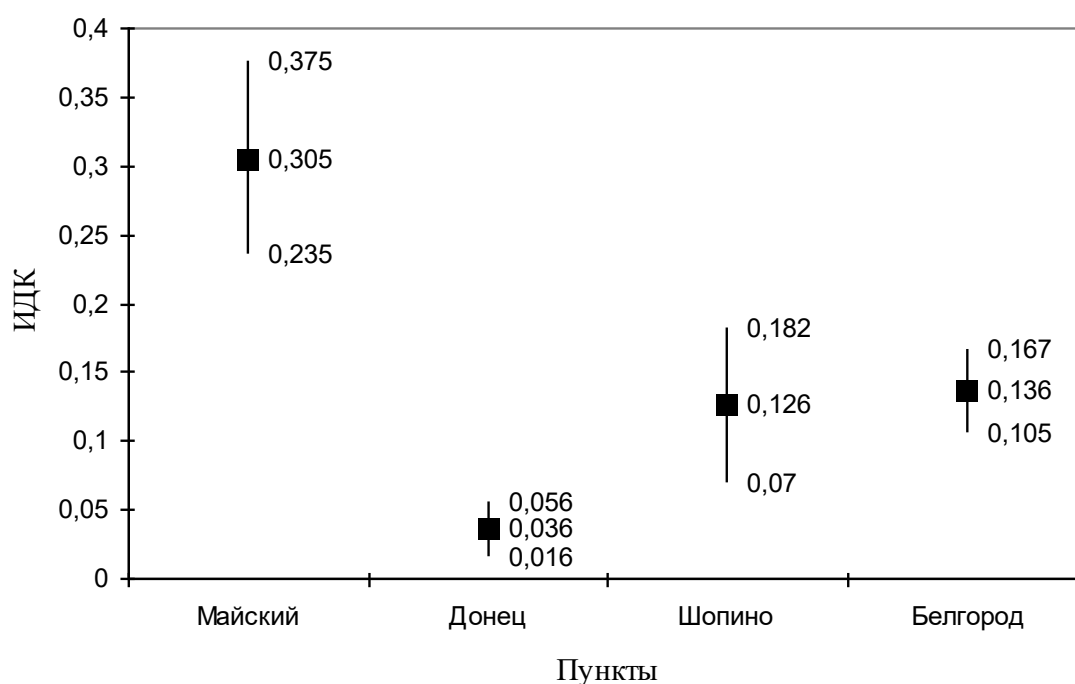


Рис. 5 Средние значения ИДК в популяциях *Helix pomatia* ($M \pm m$)

Стоит отметить, что популяция «Майский», где отмечены наибольшие показатели разрушения ДНК обитает в лесополосе, примыкающей к сельскохозяйственным угодьям, где распыляются пестициды. Кроме того, вдоль данной лесополосы проходит оживленная автомагистраль «Белгород-Харьков». Все это, вероятно вызывает накопление генотоксичных компонентов в данном биотопе, следствием чего является нарушение

цитогенетической стабильности, сбои в работе репарационных процессов в клетках обитающих здесь улиток и увеличение разрывов в цепи ДНК.

Для определения эффективного размера исследуемых групп улиток нами были применены две модели.

В первом варианте была использована формула, учитывающая уровень инбридинга в популяции (Ли, 1978):

$$Ne = \frac{N}{1+F}$$

Известно, что указанная формула подразумевает изменение коэффициента инбридинга от 0 до 1. В этой связи отрицательные значения коэффициента инбридинга F , полученные в двух популяциях (№ 1 и 8, табл. 4), мы считали равными нулю.

Так как используемые нами выборки имеют разный объем, для получения сопоставимых данных мы вычислили отношение эффективного размера выборки к ее общему объему (табл. 7). Полагаем, что полученные индексы можно будет использовать для определения эффективной численности популяций в случае определения их общей численности.

Таблица 7

Эффективная численность популяций *Helix pomatia*, рассчитанная с помощью коэффициента инбридинга

Популяция	Ne	Ne/N
1. Тверь	7	1,000
2. Шопино	19	0,787
3. Курск	21	0,672
4. Донец	35	0,884
5. Хотмыжск	28	0,972
6. Майский	169	0,756
7. Белгород	26	0,917
8. Харьков	31	1,000
9. Житомир	23	0,658
10. Киев	20	0,707

Согласно полученным значениям, наименьшее соотношение Ne/N отмечено в популяциях «Житомир» и «Курск», что связано с высокими показателями индбридинга в этих группах. Однако в среднем по всем популяциям доля эффективной численности оказалась равной $0,870 \pm 0,043$, что укладывается в общий диапазон доли Ne , предложенный Кроу, Мортон и Кимурой (Crow, Morton, 1955; Crow J. F., Kimura M., 1970). Указанные авторы вычислили, что для большинства организмов доля Ne в общей численности популяций составляет в среднем 0,75, а во многих популяций наиболее процветающего вида *Homo sapiens* колеблется в диапазоне 0,69 -

0,95. Кроме того, среднее значение доли N_e , полученное для *H. pomatia*, достоверно превышает аналогичные значения, полученные для аборигенных фоновых видов наземных моллюсков, обитающих в районе исследования *Br. fruticum* — $0,800 \pm 0,021$, *Ch. tridens* — $0,661 \pm 0,013$ и реликтового вида *H. striata* $0,725 \pm 0,039$ (Снегин, 2012), что косвенно указывает на высокий уровень жизнеспособности изучаемых популяций виноградной улитки.

Второй вариант, используемый нами для вычисления эффективной численности, был предложен М. Слаткиным (Slatkin, 1993). Данная модель основана на использовании уравнения прямолинейной регрессии и коэффициентов линейной функции между попарными оценками потока генов (Nm) и географического расстояния (D_G) между популяциями:

$$\log Nm = a + b \log D_G$$

При этом эффективная численность популяции (для всех исследованных популяций в целом) вычисляется как $N_e = 10^a$, где a – коэффициент, полученный в уравнении. Для аллозимов уравнение прямолинейной регрессии имело вид $\log Nm = 0,9936 - 0,3798 \log D_G$, а для ДНК-локусов – $\log Nm = 0,4931 - 0,2529 \log D_G$. Результаты вычислений эффективной численности приведены в таблице 8. Сопоставление полученных оценок эффективного размера популяций *H. pomatia* с аналогичными данными по *Br. fruticum*, *Ch. tridens* и *H. striata* демонстрирует явное увеличение этого показателя в группах виноградной улитки по отношению с другими видами. Хотя рассчитанные доверительные интервалы показывают достоверные отличия только между популяциями *H. pomatia* и *Ch. tridens* по ДНК маркерам, полученный результат может также косвенно свидетельствовать о том, что эффективные размеры адвентивных групп виноградной улитки сопоставимы с таковыми у аборигенных видов, причем как фоновых, так и реликтовых.

Таблица 8

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

Виды	Изоферменты		ДНК	
	N_e	95%, Δ	N_e	95%, Δ
<i>H. pomatia</i>	9,8	3,9-25,1	3,1	2,0-4,9
<i>Br. fruticum</i>	4,1	2,2-7,6	1,7	1,2-2,5
<i>Ch. tridens</i>	3,8	2,6-5,7	1,2	0,8-1,8
<i>H. striata</i>	5,1	2,6-10,0	1,9	1,3-2,7

Примечание: данные по *Br. fruticum*, *Ch. tridens* и *H. striata* взяты из публикации Э. А. Снегина (2015)

Таким образом, на основе полученных данных о популяционной структуре *H. pomatia* можно говорить о стабильном состоянии их генофондов в условиях более континентального климата восточной Европы. Это позволяет предполагать дальнейшую экспансию этого вида на территории различных ландшафтов, чему, вероятно, будут способствовать особенности биологии и экологии этой улитки, включающие генетический полиморфизм, устойчивость к поллютантам городской среды и эффективные компенсаторные реакции генома, а также известные для этого вида неприхотливость к питанию и большой репродуктивный потенциал.

ВЫВОДЫ

1. Популяционная структура адвентивного вида *H. pomatia* в различных ландшафтах юго-восточной части современного ареала в большей степени определяется антропохорией, микроклиматом урбанизированных территорий, а также особенностями биологии и экологии изучаемого вида. Конхиометрические признаки виноградной улитки, в отличие от аборигенных видов, не зависят от зональных характеристик климата и связаны главным образом с происхождением популяций, а также своеобразием биотопических условий городской среды. Большинство изученных популяций не имеют достоверных отличий по фенетическому облику раковин, что говорит о сходных генетических процессах и векторах отбора в изучаемых группах по данному признаку.

2. Анализ ископаемого материала позволил установить, что генетически детерминированные окрасочные признаки раковины у виноградных улиток остаются стабильными на протяжении длительного времени, в то время как изменчивость конхиометрических признаков определяется климатическими флуктуациями.

3. Сравнение популяционной структуры *H. pomatia*, выявленной по биохимическим маркерам с аналогичной структурой, характерной для аборигенных фоновых видов наземных моллюсков позволило выявить сходный уровень генетической изменчивости и генетической дифференциации изученных популяций, что говорит об успешной адаптации адвентивных колоний на вновь освоенных территориях. Об этом свидетельствует также эффект изоляции расстоянием, который характерен для реликтовых видов наземных моллюсков и прослеживается в популяционной структуре *H. pomatia*. Данный факт говорит о снижении роли стабилизирующего отбора в изученных группах виноградной улитки на фоне формирования популяционных генофондов, соответствующих новым условиям.

4. Увеличение объема раковины *H. pomatia* скоррелированное с уровнем инбридинга в популяциях, не характерное для аборигенных видов моллюсков, могло быть следствием условий, возникших при случайном заносе улиток на новые территории, таких как, конкурентный вакуум, генетический дрейф и ассортативное скрещивание.

5. Адвентивные популяции *H. pomatia* в условиях юго-восточной части современного ареала по уровню генетической изменчивости не отличаются от аборигенных популяций данного вида из районов Центральной Европы, что свидетельствует о том, что традиционное правило об уменьшении аллелофонда в периферийных группах, в данном случае не соблюдается. Кроме того, анализ молекулярной дисперсии выявил, что уровень дифференциации между западными группами оказался сопоставимым с аналогичными показателями, вычисленными для восточных колоний. Это говорит о том, ранее высказанное правило, согласно которому внутривидовое разнообразие в центре ареала переходит в межвидовое разнообразие на периферии в случае с адвентивными группами *H. pomatia*, вероятно, также нарушается.

6. Активной адаптации *H. pomatia* в урбанизированной среде способствует эффективная репаративная система этого вида, что позволяет ему существовать в сильно загрязненных биотопах. Этот факт иллюстрирует низкие, не превышающий первой стадии, показатели разрушения ДНК в анализируемых группах. Тем не менее, в ряде популяций отмечено достоверное увеличение доли поврежденного генетического аппарата, вызванного антропогенным воздействием.

7. Большинство исследованных популяций *H. pomatia* в юго-восточной части современного ареала находятся в удовлетворительном состоянии, о чем говорят большие значения эффективной численности, высокий уровень гетерозиготности и пониженный инбридинг. Это позволяет предполагать дальнейшее развитие инвазионного процесса на территории различных ландшафтов Восточной Европы. Тем не менее, снижение уровня жизнеспособности характерное, либо для старых и длительно изолированных групп, либо для молодых и недавно возникших колоний, не имеющих сбалансированного генофонда, вызывает беспокойство и нуждается в корректировке природоохранных мероприятий по отношению к данному виду.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ:

1. Снегин, Э. А. Оценка степени повреждения ДНК в популяциях наземных моллюсков урбанизированных ландшафтов Среднерусской возвышенности / Э.А. Снегин, Е.С. Ненашева, **О.Ю. Артемчук** // Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. – 2011. – №21(116). Вып. 17. – С. 26-30.

2. Снегин, Э. А. Морфогенетический анализ разновременных популяций *Helix albescens* (Rossmassler, 1839) в условиях Северо-Западного Крыма на основе археологических раскопок поселения Кельшейх / Э.А. Снегин, Ф.Н. Лисецкий, **О.Ю. Артемчук** // Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. – 2014. – Т. 10(181), №. 27. – С. 83-87.

3. Снегин, Э. А. Оценка состояния популяционных генофондов виноградной улитки (*Helix pomatia* L.) урбанизированных территорий с помощью ISSR-маркеров ДНК / Э.А. Снегин, **О.Ю. Артемчук** // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2014. – №3(27). – С. 130-141.

4. Снегин, Э. А. Морфогенетический анализ популяций *Helix pomatia* L. (Pulmonata, Helicidae) юго-восточной и восточной части современного ареала / Э.А. Снегин, **О.Ю. Артемчук** // Экологическая генетика. – 2014. – Т. XII, №4. – С. 25-37.

5. Снегин, Э. А. Генетическая структура популяций *Helix pomatia* L. (Mollusca, Pulmonata) юго-восточной и восточной части ареала / Э.А. Снегин, **О.Ю. Артемчук** // Генетика. – 2017. – Том 53, №3. – С. 334-344.

6. **Артемчук, О.Ю.** Анализ популяционной структуры адвентивного вида *Helix pomatia* (Mollusca, Pulmonata) на основе фенетических признаков раковины / О.Ю. Артемчук, Э.А. Снегин // Проблемы региональной экологии. – 2018. – № 3. – С. 44-47.

7. Снегин, Э. А. Оценка степени устойчивости популяций виноградной улитки (*Helix pomatia*) к действию генотоксичных компонентов городской среды / Э.А. Снегин, **О.Ю. Артемчук** // Системы контроля окружающей среды. – Севастополь: ИПТС. – 2018. – Вып. 13(33). – С. 110-114.

Научные статьи в изданиях, индексируемых в базе данных Web of Science и Scopus:

8. Genetic structure and effective animal population size in the conditions of anthropogenic changed landscape / E.A. Snegin, A.V. Prisky, A.A. Sychev, **O.Y. Artemchuk**, A. A. Gorbacheva, E. A. Shapovalova // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – Vol. 6, Issue 4. – P. 72-76.

9. Snegin, E.A. Morphogenetic analysis of *Helix pomatia* L. (Pulmonata, Helicidae) populations from south eastern and eastern parts of the modern area / E.A. Snegin, **O.Y. Artemchuk** // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2016. – Vol. 6, No.2. – P.152-162.

10. Snegin, E.A. Population genetic structure of *Helix pomatia* L. (Mollusca, Pulmonata) from the southeastern and eastern parts of the range / E.A. Snegin, **O.Y. Artemchuk** // Russian Journal of Genetics. – 2017. – Vol. 53, No.3. – P. 348-357.

Публикации в других журналах и сборниках:

11. К вопросу о генетической эрозии и генетической революции в популяциях урбанизированных территорий на примере наземных моллюсков / Э.А. Снегин, **О.Ю. Артемчук**, А.А. Сычев, Е.С. Ненашева // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені В. Гнатюка. Серія Біологія. – 2012. – №2 (51). – С. 245-249.

12. **Артемчук, О.Ю.** Оценка состояния популяций *Helix pomatia* L. в условиях юга среднерусской возвышенности / О.Ю. Артемчук, Э. А. Снегин // Материалы XI международной научно-практической конференции «Видовые популяции и сообщества в антропогенно трансформированных ландшафтах: состояние и методы его диагностики». – Белгород, 20-25 сентября, 2010. – С. 16-17

13. **Артемчук, О.Ю.** Оценка жизнеспособности популяций *Helix pomatia* L. в условиях лесостепи Среднерусской возвышенности / О.Ю. Артемчук, Э. А. Снегин // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования». – Нижний Тагил, 26-29 марта, 2012. – Ч.1. – С. 38.

14. **Артемчук, О.Ю.** Анализ популяционных генофондов *Helix pomatia* L. с применением изоферментных и ISSR маркеров/ О.Ю. Артемчук, Э. А. Снегин // Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Животные: экология, биология и охрана». – Саранск, 29 ноября, 2012. – С. 28-29.

15. **Артемчук, О.Ю.** Морфогенетический анализ популяций *Helix pomatia* L. в условиях лесостепи Среднерусской возвышенности / О.Ю. Артемчук, Э. А. Снегин // Материалы XII научно-практической экологической конференции «Структурные и функциональные изменения в популяциях и сообществах на территориях с разным уровнем антропогенной нагрузки». – Белгород, 9-12 октября, 2012. – С. 12-13.

16. Адвентивные виды наземных моллюсков на юге Среднерусской возвышенности / Э.А. Снегин, **О.Ю. Артемчук**, А.А. Сычев, В.В. Адамова // Материалы XIII Международной научно-практической экологической конференции «Биоразнообразие и устойчивость живых систем». – Белгород, 6-11 октября, 2014. – С. 156-157.

17. Пономарёва, А.С. Изменчивость морфометрических показателей раковины виноградной улитки в условиях юго-восточной части ареала [электронный ресурс] / А.С. Пономарёва, **О.Ю. Артемчук** // «SCI-ARTICLE.RU». – 2016. – №35. – Режим доступа: <http://sci-article.ru/stat.php?i=1468348461>

18. **Артемчук, О.Ю.** Конхиологические особенности популяций виноградной улитки (*Helix pomatia* L.) на юго-востоке её современного ареала / О.Ю. Артемчук // Материалы 1 Всероссийской научной конференции «Эволюционные и экологические аспекты изучения живой материи». – Череповец, 8-9 февраля, 2017. – С 28-38.

Артемчук Олеся Юрьевна (Россия)

Популяционная структура адвентивного вида *Helix pomatia* L. в условиях юго-восточной части ареала

Работа посвящена изучению популяционной структуры адвентивного вида *H. pomatia* в различных ландшафтах юго-восточной части современного ареала. Анализируются результаты межмикросателлитного (ISSR) анализа, а также изоферментного анализа методом электрофореза белков с участием трех ферментов и дана оценка полученным результатам. На основе вычисленных генетических дистанций (по изоферментным и ДНК-локусам) проведена кластеризация популяций. Произведено сравнение морфометрических и показателей адвентивных популяций и выявлена зависимость от их происхождения и микроклимата урбанизированной среды обитания. По итогам сравнительного анализа ископаемых раковин родственного вида *H. albescens* произведена оценка долговременные изменений морфометрических и фенотипических показателей раковины моллюсков рода *Helix*. По результатам анализа методом ДНК-комет изолированных клеток оценена степень устойчивости популяций к генотоксичным поллютантам урбанизированной среды, а также произведен расчет эффективной численности изучаемых популяций и определен благоприятный уровень жизнеспособности для исследуемых групп.

Artemchuk Olesya Yurievna (Russia)

Population structure of the adventitious species *Helix pomatia* L. in the southeastern part of the range

The research is devoted to the study of the population structure of the adventitious species *H. pomatia* in various landscapes of the southeastern part of the present range. We analyses the results of Inter Microsatellite (ISSR) analysis, as well as isoenzyme analysis by protein electrophoresis with the participation of three enzymes, and evaluate the attained results. The clustering of populations was carried out in terms of the calculated genetic distances (by isoenzyme and DNA loci). The comparison of morphometric indexes and indexes of adventitious populations is made and dependence on their origin and microclimate of the urbanized habitat is revealed. The evaluation of the long-term changes in the morphometric and phenotypic parameters of the mollusk shell of the genus *Helix* have been made according to the results of comparative analysis of fossil shells of the related species *H. albescens*. The degree of populations stability to genotoxic pollutants of the built environment was estimated following the results of the analysis of isolated cells by comet assay, as well as the calculation of the effective number of the studied populations was made, and also the favorable level of viability for the studied groups was determined.