

## ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДИСТАНЦИЙ МЕЖДУ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ *CHONDRULA TRIDENS* (GASTROPODA, PULMONATA) НА ОСНОВЕ МАРКЕРОВ ДНК

© 2017 г. Э. А. Снегин\*, А. А. Сычев, Е. А. Снегина

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,  
Белгород 308015, Россия

\*e-mail: snegin@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 12.07.2016 г.

На основе межмикросателлитных фрагментов ДНК (*ISSR*) и консервативных последовательностей ядерных и митохондриальных генов (*COI*, 16S и 18S) был проведен анализ трех форм брюхоногого наземного моллюска *Chondrula tridens* (Müller 1774) (var. *galiciensis*, *albolimbata* и *major*) с целью уточнения их таксономического статуса. *ISSR*-анализ продемонстрировал, что популяции формы *major* значительно дистанцируются от популяций *albolimbata* и *galiciensis* ( $F_{st}$  варьирует от 0.234 до 0.581). Между группами *albolimbata* и *galiciensis* уровень дифференциации  $F_{st}$  находился в диапазоне 0.145–0.340, что не выходит за рамки различий между популяциями внутри форм. Анализ консервативных последовательностей ДНК показал, что генетические различия между указанными формами можно отнести к межвидовым различиям в пределах одного рода. По гену *COI* генетические дистанции между формами составили  $D_{a/g} = 0.295$ ,  $D_{m/g} = 0.422$ ,  $D_{m/a} = 0.478$ , а по гену 16S –  $D_{a/g} = 0.130$ ,  $D_{m/g} = 0.358$ ,  $D_{m/a} = 0.392$ . Последовательности 18S рРНК у сравниваемых трех форм и у вида *Ena montana* (Draparnaud 1801) из этого семейства, оказались полностью идентичными. Полагаем, что формы *galiciensis* и *albolimbata*, обитая в структуре единых ландшафтов, вероятно, являются видами-двойниками. Форма *galiciensis* может иметь название *Chondrula tridens* (Müller 1774), а форма *albolimbata* – *Chondrula albolimbata* (Pfeiffer 1848). Форма *major* представлена изолированными группами и по данным генетического анализа сильно дистанцируется от предыдущих форм, поэтому также заслуживает ранга вида с названием *Chondrula major* (Krynicky 1833).

*Ключевые слова:* *ISSR*, гены *COI*, 16S, 18S, наземные моллюски, филогенетический анализ

DOI: 10.7868/S0044513417070157

Внедрение в систематику новых ДНК-технологий позволило по-иному взглянуть на эволюцию различных таксонов. Как следствие, многие, пусть даже сравнительно недавние таксономические построения на основе морфологических и анатомических данных во многом можно считать устаревшими.

Некоторые таксономические проблемы оказывались неразрешенными на протяжении длительного времени. Одна из таких ситуаций возникла в отношении политипического вида наземного брюхоногого моллюска *Chondrula tridens* (Müller 1774), у которого в 19 веке было выделено несколько форм, различающихся по размеру раковины. По нашим данным в популяциях *Ch. tridens* var. *galiciensis* (Clessin 1879): высота раковины (ВР) варьирует от 7 до 12 мм, а ширина раковины (ШР) – от 3 до 5.5 мм; у *Ch. tridens* var. *albolimbata* (Pfeiffer 1848): ВР 11–15 мм, ШР 5–6 мм и у *Ch. tri-*

*dens* var. *major* (Krynicky 1833): ВР 13–22 мм, ШР 4.5–8 мм (рис. 1)<sup>1</sup>. Кроме того, эти формы различаются по индексу “высота завитка/высота раковины”: *galiciensis*  $0.392 \pm 0.005$ , *albolimbata*  $0.418 \pm 0.004$ , *major*  $0.403 \pm 0.008$  (Снегин, 2011). По признакам половой системы различий между данными формами не выявлено.

Время от времени появляются публикации о таксономическом статусе этих форм и придании им ранга подвида и даже вида (Clessin, 1887; Муратов, 1990; Крамаренко, Сверлова, 2003, 2006; Сычев и др., 2015). Стоит отметить, что указанные формы не имеют обособленных ареалов и широко распространены в пределах Европы от юго-за-

<sup>1</sup> Ряд авторов на основе изменчивости приустьевой арматуры выделяют еще несколько форм *Chondrula tridens*, таких как *diffusa* Mousson 1876 и *martynovi*, Gural-Sverlova et Gural 2010 (Гураль-Сверлова, Гураль, 2010), но в данной работе они не проанализированы.



Рис. 1. Раковины трех взрослых форм *Chondrula tridens*.

падной Франции до Урала, обитают в Крыму и на Кавказе, где населяют степные и полупустынные участки. Исключение составляет форма *major*, аборигенные популяции которой встречаются только на Северном Кавказе.

Проведенный нами ранее анализ на основе конхиометрических признаков, кариологии и электрофореза белков не позволил нам определить таксономический статус этих форм (Снегин, 2011).

Цель работы: уточнение таксономического статуса указанных форм *Ch. tridens* на основе анализа генетических расстояний, установленных с

помощью межмикросателлитного анализа (*ISSR*) и секвенирования консервативных последовательностей ядерной и митохондриальной ДНК (*COI*, *16S*, *18S*).

Данная задача диктовалась еще одним обстоятельством. Дело в том, что *Ch. tridens* в настоящее время используется в качестве модельного объекта для популяционно-генетических исследований как индикатор влияния климатических и антропогенных факторов на различные экосистемы в разных ландшафтах (Матеекин, 1950; Николаев 1981; Гребенников, 1999; Ермаков, Снегин, 2002; Сачкова, 2006; Снегин, 2011а, 2013, Комарова и др., 2015), и решение обозначенной выше таксономической проблемы позволит избежать получения ложных результатов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для экстракции ДНК использовали ногу моллюска, тщательно отжатую от слизи. ДНК выделяли с помощью набора реактивов Silica spin на основе сорбента (Bioком, Россия). В качестве ДНК-маркеров задействованы *ISSR*-ампликоны (Inter simple sequence repeats) (Zietkiewicz et al., 1994) и нуклеотидные последовательности ядерного гена *18S* рРНК, а также митохондриальных генов (гена субъединицы I цитохромоксидазы *c* (*COI*) и рибосомного гена *16S*), которые имеют хороший таксономический сигнал и ранее уже были использованы для филогенетических реконструкций брюхоногих моллюсков (табл. 1).

Таблица 1. Последовательности праймеров и условия амплификации, применяемые для секвенирования последовательностей генов

ДНК-последовательности	Праймеры	Температурный профиль
<i>UBC827 (ISSR)</i>	FAM 5'-ACACACACACACACACG-3'	1 цикл 2 мин/94°C, 40 циклов [30 с/94°C, 30 с/55°C, 2 мин/72°C], 1 цикл 10 мин/72°C
<i>SASI (ISSR)</i>	FAM 5'-GTGGTGGTGGTGGC-3'	
<i>COI</i> (Folmer et al., 1994; Steinke et al., 2004)	5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3' 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	1 цикл 2.5 мин/94°C, 40 циклов [30 с/90°C, 1 мин/48°C, 1 мин/72°C], 1 цикл 10 мин/72°C
<i>16S rRNA</i> (Palumbi et al., 1991; Steinke et al., 2004)	5'-CGGCCGCTGTTTATCAAAAACAT-3' 5'-GGAGCTCCGGTTTGAATCAGATC-3'	1 цикл 2.5 мин/90°C, 10 циклов [50 с/92°C, 30 с/44°C, 40 с/72°C], 36 циклов [30 с/92°C, 40 с/48°C, 40 с/72°C], 1 цикл 3 мин/72°C
<i>18S rRNA</i> (Winnepenninckx et al., 1994; Steinke et al., 2004)	5'-CTGGTTGAT(CT)CTGCCAGT-3' 5'-CTGAGATCCAAGTAGGAGCTT-3'	1 цикл 2 мин/94°C, 40 циклов [30 с/92°C, 30 с/52°C, 40 с/72°C], 1 цикл 3 мин/72°C

Таблица 2. Пункты сбора *Chondrula tridens*

Пункт		N	Форма	Биотоп	Координаты
номер	название				
1	“Губкин”	31	<i>galiciensis</i>	Юг Среднерусской возвышенности. Белгородская обл. Меловой склон в долине р. Осколец на территории г. Губкин	51°17'41.29" с.ш., 37°32'21.99" в.д.
2	“Стенки Изгорья”	37	<i>albolimbata</i>	Юг Среднерусской возвышенности. Заповедный участок “Стенки Изгорья”. Меловой склон с реликтовой степной растительностью, расположенный на территории одноименного заповедного участка	50°40'44.80" с.ш., 37°48'29.48" в.д.
3	“Нагольное”	30	<i>galiciensis</i>	Юг Среднерусской возвышенности. Меловой склон южной экспозиции в долине р. Сарма. Территория природного парка “Айдарский”	49°58'43.61" с.ш., 38°57'33.69" в.д.
4	“Пятигорск”	40	<i>major</i>	Северный Кавказ, г. Пятигорск. Подножие горы Машук. Посадки ивы позади гостиницы “Интурист”	44°02'27.68" с.ш., 43°04'28.62" в.д.
5	“Белгород”	90	<i>major</i>	Адвентивная колония. Юг Среднерусской возвышенности, г. Белгород, насыпь автомагистрали, спускающейся в пойму р. Гостянка, смешанный лес из ивы и клена с примесью ели	50°35'23.32" с.ш., 36°33'58.20" в.д.
6	“Аракаево”	22	<i>albolimbata</i>	Средний Урал. Свердловская обл., Нижнесергинский р-н, село Аракаево. Правый берег Михайловского пруда (р. Серга), подножье склона и крутой склон, заросший травой. На склоне несколько скальных выходов известняка, у подножья которых есть скальных осыпи	56°26'45.00" с.ш., 59°12'56.00" в.д.

В методе *ISSR* использовали два праймера (*SAS 1* и *UBC 827*). Амплификацию проводили в термоциклерах MJ Mini и MyCycler (Bio-Rad, США). Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, ПЦР-буфер (67 мМ трис-НСl (рН 8.8), 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 7 мМ ЭДТА, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>), 0.25 мМ dNTP, 0.5 мкМ праймера, 1 единица Taq ДНК полимеразы (ингибированной для горячего старта). Условия реакции приведены в табл. 1. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с использованием ТАЕ буфера (охлажденного до +4°C), 100 В – 45 мин. Блоки окрашивали бромистым этидием.

У *Ch. tridens* нами обнаружено по 18 локусов с использованием праймеров *SAS 1* и *UBC 827* (всего 36 локусов). По картинам амплифицированных фрагментов, полученных в ходе электрофореза, составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось как “1” (аллель *p*), отсутствие “0” (аллель *q*). ДНК-паттерны и их

расшифровка приведены в нашей предыдущей публикации (Снегин, 2013). Расчет генетических расстояний по методике Ней и Ли (Nei, Li, 1979) и анализ молекулярной дисперсии AMOVA (Excoffier et al., 1992) осуществляли в программе GenAlEx v.6.5 (Peakall, Smouse, 2006). Кластеризацию выборок методом невзвешенной попарной группировки (UPGMA) (Nei, 1978) проводили в программе MEGA6 (Tamura et al., 2013). Всего было проанализировано 250 особей из 6 популяций (табл. 2).

Секвенирование ДНК проводили на автоматическом капиллярном ДНК-секвенаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США), при этом использовали капилляры длиной 50 см и полимерную матрицу POP-7™.

Для секвенирования ДНК от каждой исследуемой формы использовали одну особь. После амплификации фрагменты ДНК очищали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, после чего вырезали участки геля с целевой ДНК и да-

**Таблица 3.** Коды последовательностей секвенированных генов, помещенные в GenBank

Вид	Коды GenBank		
	COI	16S	18S
<i>Chondrula tridens</i> var. <i>galiciensis</i> “Губкин”	KX463466*	KX463469*	KX463472*
<i>Chondrula tridens</i> var. <i>albolimbata</i> “Стенки Изгорья”	KX463467*	KX463470*	KX463473*
<i>Chondrula tridens</i> var. <i>major</i> “Пятигорск”	KX463468*	KX463471*	KX463474*
<i>Ena montana</i>	AY546276	AY546356	AY546396

\* Данные авторов статьи.

**Таблица 4.** Усредненные по совокупности *ISSR*-локусов меры генетической гетерогенности в популяциях *Chondrula tridens*

Популяция	<i>P</i> , %	<i>A</i>	<i>Ae</i>	<i>I</i>	<i>He</i>	<i>uHe</i>
1	83.33	1.667 ± 0.126	1.445 ± 0.061	0.401 ± 0.042	0.264 ± 0.030	0.268 ± 0.031
2	86.11	1.722 ± 0.117	1.419 ± 0.059	0.385 ± 0.042	0.251 ± 0.031	0.255 ± 0.031
3	80.56	1.611 ± 0.134	1.380 ± 0.058	0.356 ± 0.043	0.231 ± 0.031	0.235 ± 0.031
4	47.22	1.056 ± 0.159	1.227 ± 0.057	0.206 ± 0.045	0.135 ± 0.031	0.136 ± 0.031
5	75.00	1.500 ± 0.146	1.373 ± 0.058	0.340 ± 0.046	0.224 ± 0.032	0.225 ± 0.032
6	66.67	1.361 ± 0.155	1.264 ± 0.054	0.261 ± 0.042	0.165 ± 0.030	0.169 ± 0.030
Среднее	73.15 ± 5.90	1.486 ± 0.059	1.351 ± 0.024	0.325 ± 0.018	0.212 ± 0.013	0.215 ± 0.013

Примечания. *P* (%) — доля полиморфных локусов, *A* — среднее число аллелей на локус, *Ae* — эффективное число аллелей, *I* — индекс Шеннона, *He* — ожидаемая гетерозиготность, *uHe* — объективная ожидаемая гетерозиготность.

лее проводили ее элюцию с помощью набора реактивов Diatom® DNA Elution на основе сорбента (Isogene, Россия). Пробоподготовку для секвенирования осуществляли с помощью набора реагентов BigDye® Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems) согласно протоколу. Далее проводили прямое и обратное секвенирование образцов. Полученные данные первоначально обрабатывали в программе Sequencing Analysis® Software 6 (Applied Biosystems). Выравнивание прямых и обратных последовательностей проводили в программе BioEdit V.7.0.0 (Hall, 2011). Для выбора оптимальной модели нуклеотидных замен и расчета генетических дистанций использовали программу jModelTest (Darriba et al., 2012), при этом для всех используемых генетических маркеров была выбрана обобщенная модель с полным временным преобразованием *GTR* с гамма-коррекцией. Реконструкцию филогенетических деревьев и оценку достоверности их топологии проводили с помощью программы MrBayes 3.2 (<http://mrbayes.sourceforge.net>). В ходе байесовского подхода (Cummins et al., 2003; Redelings, Suchard, 2005) использовали пять запусков программы, для генерации деревьев использовали 2 000 000 марковских цепей; для построения консенсусного дерева сохранялось каждое 1000 сгенерированное дерево. Визуализацию филогенетических деревьев осуществляли в программе FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Все секвенированные последовательности ДНК были помещены в GenBank (NCBI). Для сопоставления на уровне рода из этой базы данных были взяты последовательности анализируемых генов родственного вида из того же семейства *Ena montana* (Draparnaud 1801) (табл. 3).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Дендрограмма, построенная по результатам фрагментного анализа, представлена на рис. 2. Согласно полученным данным выборки из популяций *Ch. tridens* var. *albolimbata* и var. *galiciensis* образовали единый кластер, дистанцирующийся от выборок var. *major*. При этом эффект изоляции расстоянием явно отсутствует. Например, популяция *albolimbata* с уральского региона (“Аркаево”) оказалась генетически близкой к аналогичной группе с юга Среднерусской возвышенности (“Стенки Изгорья”). Популяции *major* из городов Белгород и Пятигорск также образовали отдельный кластер.

Показатели уровня генетической гетерогенности изучаемых популяций (табл. 4) позволили установить, что наиболее мономорфными являются популяция формы *major* из г. Пятигорска (пункт 4) и популяция формы *albolimbata* из Уральского региона (пункт 6). Если мономорфность последней группы можно объяснить крайней точкой ареала, то низкую изменчивость

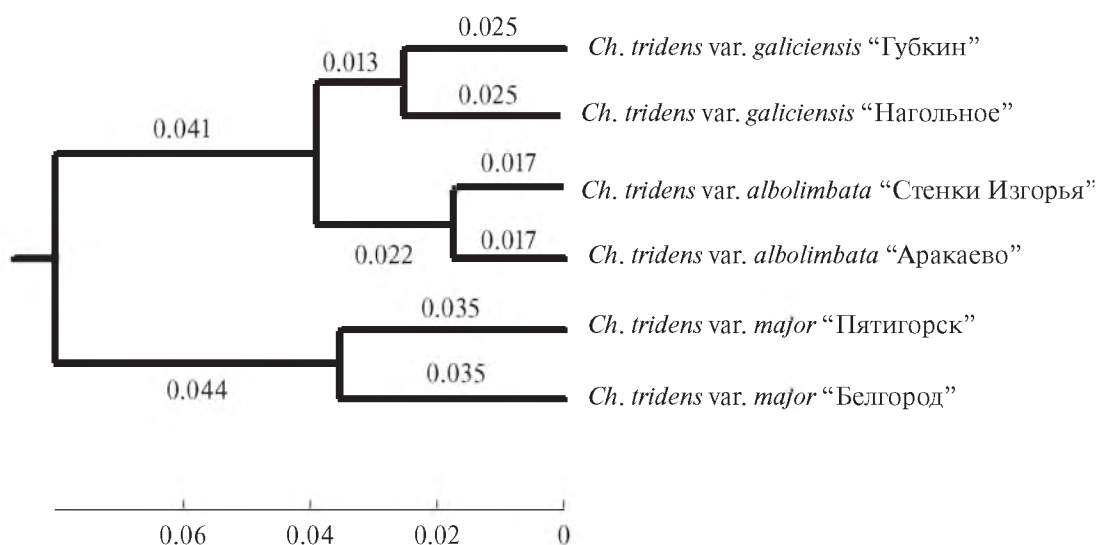


Рис. 2. Дендрограмма генетических расстояний, построенная методом невзвешенной попарной группировки (UPGMA) между популяциями *Chondrula tridens* по *ISSR*-локусам.

аборигенной группы *major* с Северного Кавказа которая оказалась ниже, чем изменчивость адвентивной колонии этой формы из г. Белгород, объяснить сложнее. Повышенное генетическое разнообразие в адвентивной группе, вероятно, вызвано особыми микроклиматическими условиями городской среды, а также конкурентным вакуумом и отсутствием хищников. Подобное явление мы отмечали в адвентивной колонии другого наземного моллюска *Cerpea vindobonensis* (Снегин, Снегина, 2016). Наиболее полиморфной оказалась популяция формы *albolimbata* из заповедного участка “Стенки Изгорья” (пункт 2).

Попарные значения генетической дифференциации  $\Phi_{st}$  (табл. 5), вычисленные с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) на основе 36 межмикросателлитных локусов, подтверждают результаты кластерного анализа. Так, аборигенная популяция формы *major* из города Пятигорск значительно дистанцируется от популяций *albolimbata* и *galiciensis* ( $\Phi_{st} > 0.450$ ). При этом уровень дифференциации с адвентивной колонией формы *major* из г. Белгород (вероятно кавказского происхождения) оказался равным  $\Phi_{st} = 0.182$ . Популяции форм *albolimbata* и *galiciensis* дистанцируются одна от другой в меньшей степени, при этом уровень дифференциации между популяцией формы *albolimbata* (пункт 2) и *galiciensis* (пункт 3)  $\Phi_{st} = 0.145$  оказался меньше, чем между двумя популяциями формы *galiciensis* ( $\Phi_{st} = 0.189$ ).

В целом анализ молекулярной дисперсии показал довольно сильную генетическую разобщенность между исследуемыми популяциями ( $\Phi_{st} = 0.326$ , табл. 6). При этом на межпопуляционную вариацию пришлось 33% изменчивости, а

уровень потока генов ( $Nm$ ) оказался равным 0.518 особей за поколение, что свидетельствует о нарушении панмиксии между исследуемыми группами. Известно, что согласно “теории эволюции со смещающимся равновесием” (Wright, 1970) для поддержания панмиксии в метапопуляции требуется поток генов 1–2 особей за поколение.

Филогенетические деревья, построенные на основе нуклеотидных последовательностей секвенированных генов, представлены на рис. 3.

Согласно полученным данным последовательности митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы *c* (COI) содержащей 639 пар оснований показала довольно сильное генетическое различие между формами *galiciensis* и *albolimbata* ( $D_{a/g} = 0.295$ ). При этом форма *major* дистанцируется от них еще значительно ( $D_{m/g} = 0.422$ ,  $D_{m/a} = 0.478$ ), хотя и в меньшей степени, чем вид *E. montana* этого же семейства.

Таблица 5. Попарные оценки генетической дифференциации ( $\Phi_{st}$ ) между исследованными популяциями *Chondrula tridens* по *ISSR*-локусам

Популяции	1	2	3	4	5	6
1		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
2	0.204		0.001	0.001	0.001	0.001
3	0.189	0.145		0.001	0.001	0.001
4	0.581	0.457	0.560		0.001	0.001
5	0.372	0.234	0.343	0.182		0.001
6	0.340	0.132	0.304	0.554	0.305	

Примечание. Под диагональю приведены оценки  $\Phi_{st}$ , а над диагональю – уровень их значимости.

**Таблица 6.** Результат анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) в популяциях *Chondrula tridens*

Изменчивость	df	SS	MS	V	%	$\Phi_{st}$	P	Nm
Между популяциями	5	439.720	87.944	2.090	33%	0.326	0.001	0.517
Внутри популяций	244	1074.359	4.315	4.315	67%			
Итого	249	1514.078	92.259	6.405	100%			

Филогенетическую дистанцию форм *galiciensis* и *albolimbata* продемонстрировала также нуклеотидная последовательность (408–412 пар оснований) рибосомного гена 16S митохондриальной ДНК ( $D_{a/g} = 0.130$ ). Эти две формы образовали единый кластер, который дистанцировался от формы *major* ( $D_{m/g} = 0.358$ ,  $D_{m/a} = 0.392$ ). Примечательно, что у формы *major* в позиции 256–258 п.о. присутствует оригинальная вставка GGG. Все остальные различия между формами обусловлены вставками и заменами меньшего размера.

По совокупности конкатенированных последовательностей генов COI и 16S у исследуемых нами трех особей генетические расстояния между формами *galiciensis* и *albolimbata* составили 0.226, между формами *galiciensis* и *major* – 0.392, а между *albolimbata* и *major* – 0.440.

Последовательности ядерной 18S рРНК, включающие 640 п.о., у сравниваемых трех форм *Ch. tridens* и видом *E. montana* оказались полностью идентичными.

Стоит отметить, что полученные результаты по генетическим расстояниям оказались сопоставимыми с аналогичными данными по другим брюхоногим моллюскам. Так, по указанной совокупности генов (COI, 16S) между видами одного рода генетические расстояния составили, например, в роде *Nerita* от 0.100 до 0.300, в роде *Neritina* 0.100–0.500, в роде *Theodoxus* 0.130, в роде *Clithon* 0.100 (Quintero-Galvis, Castro, 2013). При этом по отдельно взятой последовательности гена COI, например в роде *Bradybaena*, расстояние между видами находилось в диапазоне от 0.150 до 0.370 (Hirano et al., 2014), в роде *Satsuma* от 0.103 до 0.285, а генетическое расстояние между разными формами вида *Satsuma mellea* составило 0.082 (Wang et al., 2014).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Данные межмикросателлитного анализа и результаты секвенирования показали, что форма *major* сильно дистанцируется от двух других форм *Ch. tridens* и, в отличие от них, представляет собой обособленную группу, обитающую на Северном Кавказе. Кроме того, длительные наблюдения за адвентивной колонией этой формы в г. Белгород (ВР от 13.0 до 20.1 мм), где она сосуществует с аборигенной популяцией формы *galiciensis* (ВР от 9.2 до 11.7 мм), позволяют говорить о репродуктив-

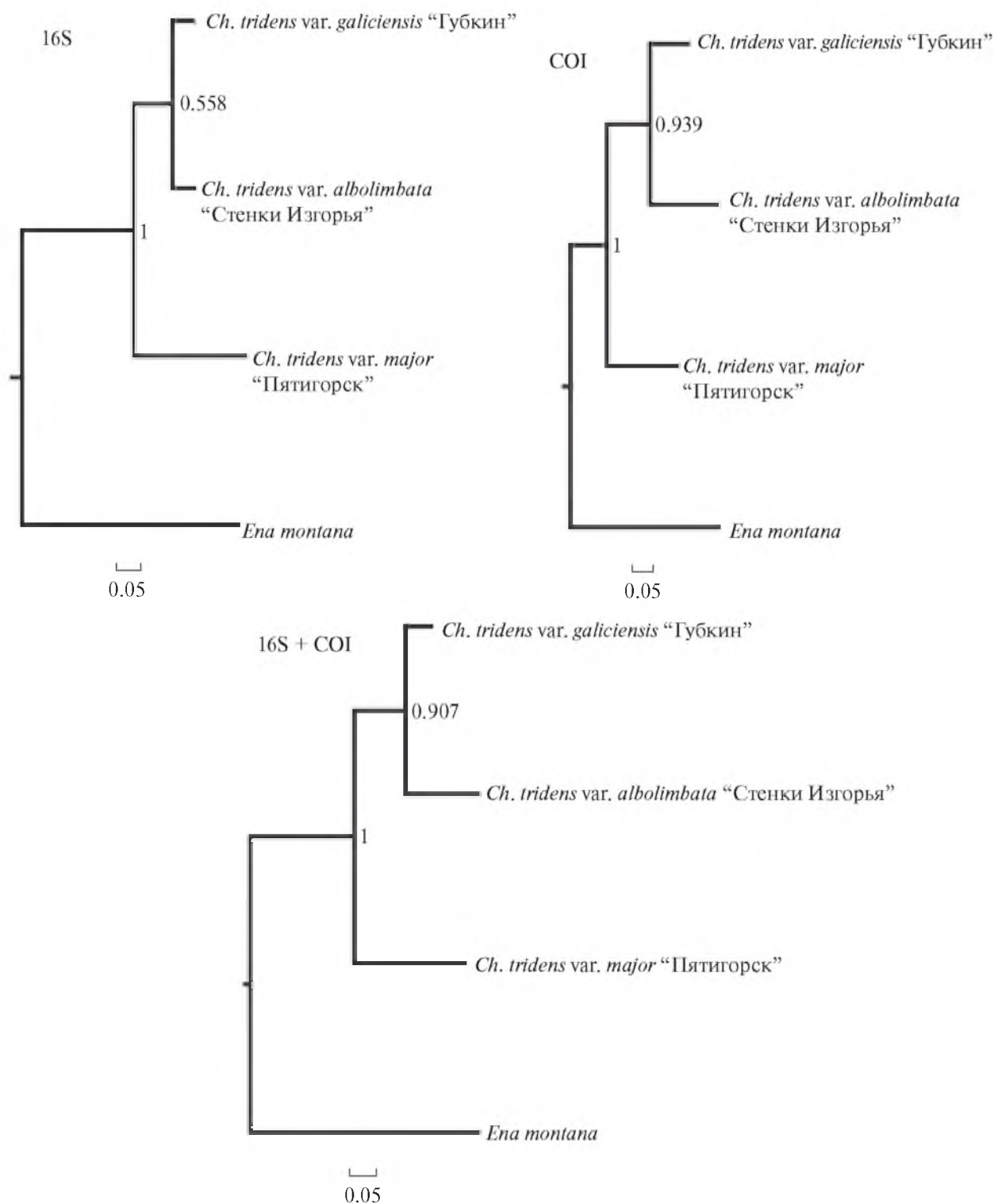
ной изоляции между ними (Снегин, 2011). Об этом свидетельствует тот факт, что несмотря на незначительные различия в размерах крайних уклонений, благодаря чему особи этих форм могут скрещиваться, между ними, по нашим данным, отсутствует поток генетической информации.

Популяции *galiciensis* и *albolimbata* и по ISSR-маркерам дистанцируются одна от другой. Однако генетические различия между ними укладываются в межпопуляционные расстояния внутри форм, поэтому результаты фрагментного анализа, по всей видимости, не позволяют установить таксономический статус этих групп моллюсков. Причиной этого может быть большая изменчивость ISSR локусов как внутри популяций, так и на межпопуляционном уровне. Учитывая, что изучаемые формы *galiciensis* и *albolimbata* очень близки, мы можем наблюдать сходные ряды наследственной изменчивости, которые нивелируют различия между ними. Однако на основании анализа секвенированных последовательностей ДНК можно говорить о том, что выявленные большие генетические дистанции между формами *galiciensis* и *albolimbata* нельзя отнести к межпопуляционным различиям, сформировавшимся под влиянием биотопических условий. Придание ранга подвида эти двум формам считаем нецелесообразным, т.к. популяции этих форм обитают на одних и тех же территориях, находящихся в структуре единых ландшафтов<sup>2</sup>. Известно, что выделение таксономической единицы, такой как подвид, обусловлено присутствием отличных одна от другой внутривидовых группировок, приуроченных к обособленным территориям (Майр, 1971).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные подтверждают политичность вида *Ch. tridens* и свидетельствуют о том, что варианты *galiciensis* и *albolimbata*, вероятно, являются видами-двойниками, которые, обитая в смежных биоценозах, возникли исходно как экологические формы. В дальнейшем ограничение обмена генетической информацией, возможно

<sup>2</sup> По нашим данным, судя по ископаемым раковинам, формы *galiciensis* и *albolimbata* сосуществовали в одной из балок заповедного участка “Ямская степь” на протяжении позднего голоцена, при этом промежуточных форм между ними найдено не было, что косвенно указывает на их репродуктивную изоляцию (Сычев и др., 2015).



**Рис. 3.** Филогенетические деревья *Chondrula tridens*, построенные Байесовским методом на основе последовательности генов 16S и COI, а также конкатенированных последовательностей указанных генов (16S + COI). В узлах приведены апостериорные вероятности выше 0.5.

из-за различия в размерах, привело к их обособленности. Ввиду того, что форма *galiciensis* по размерным характеристикам соответствует голотипу, полагаем, что она может иметь видовое назва-

ние *Ch. tridens*, а форма *albolimbata* – *Chondrula albolimbata*.

Вариант *major* вероятно также возник исходно как модификация, а в дальнейшем, в результате

изоляции в горных условиях, сильно дивергировал от материнского вида, образовав независимую генетическую систему. Репродуктивная изоляция и генетическая обособленность этой формы по используемым ДНК-маркерам свидетельствуют о том, что она может претендовать на ранг вида с названием *Chondrula major*.

Безусловно, данный вывод может быть сделан с осторожностью. Полагаем, что дальнейшие молекулярно-таксономические исследования с привлечением большего количества популяций всех выделенных видов и форм рода *Chondrula*, особенно из районов, где были составлены их первоописания, позволят построить более реальную историческую картину формирования этой группы наземных моллюсков. Кроме того, считаем немаловажным, что для таксономической ревизии необходимо использовать большее количество молекулярных маркеров и выяснить вопрос, связанный с индивидуальной изменчивостью особей в изучаемых группах особенно по белокодирующей последовательности гена COI.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гребенников М.Е., 1999. Реликтовые популяции *Chondrula tridens* (Müll., 1774) на Среднем Урале // Актуальные проблемы биологии и экологии. Сыктывкар. С. 49.
- Гураль-Сверлова Н.В., Гураль Р.И., 2010. Новые таксоны наземных моллюсков из родов *Chondrula* и *Brephulopsis* (Enidae) с территории Украины // *Ruthenica*. V. 20. № 1. С. 1–12.
- Ермаков А.М., Снегин Э.А., 2002. Особенности фенотипической изменчивости *Chondrula tridens* в условиях лесостепного ландшафта // Биология – наука XXI века: 6-я Пушкинская школа конференция молодых ученых. Тула: Изд-во Тульского государственного педагогического университета им. Толстого. Т. 2. С. 56–57.
- Комарова Е.В., Сачкова Ю.В., Курмаева Н.М., Стойко Т.Г., 2015. Исследование параметров раковины *Chondrula tridens* (Pulmonata, Enidae) из горных и равнинных биотопов лесостепного Поволжья // Зоологический журнал. Т. 94. № 7. С. 747–755.
- Крамаренко С.С., Сверлова Н.В., 2003. До вивчення внутрішньовидової мінливості *Chondrula tridens* (Gastropoda, Pulmonata, Buliminidae) на заході України та з'ясування таксономічного статусу окремих форм // Наук. зап. Держ. природозн. музею. Львів. Т. 18. С. 93–110.
- Крамаренко С.С., Сверлова Н.В., 2006. Міжпопуляційна мінливість конхологічних ознак наземного моллюска *Chondrula tridens* (Buliminidae) Північно-західного Причорномор'я // Наук. зап. Держ. природознавч. музею. Львів: Т. 22. С. 105–118.
- Майр Э., 1971. Принципы зоологической систематики. Пер. с англ. М.: Мир. 456 с.
- Матекин П.В., 1950. Фауна наземных моллюсков нижнего Поволжья и ее значение для представления об истории современных лесов района // Зоологический журнал. Т. 29. Вып. 3. С. 193–205.
- Муратов И.В., 1990. Возможности компараторного метода и анализ изменчивости раковин *Chondrula tridens* (Gastropoda, Pulmonata) // Зоологический журнал. Т. 69. № 6. С. 117–123.
- Николаев В.А., 1981. Изменчивость и экология энид Среднерусской возвышенности // Фауна и экология беспозвоночных лесостепной зоны. Научные труды Курского государственного педагогического института. Курск. Т. 210. С. 54–57.
- Сачкова Ю.В., 2006. Фауна и экология наземных моллюсков (Gastropoda, Pulmonata) лесостепного Поволжья (на примере Самарской области). Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Тольятти. 26 с.
- Снегин Э.А., 2011. К вопросу о роли принципа основателя в формировании генофондов адвентивных колоний на примере *Chondrula tridens* (Gastropoda, Pulmonata) // Зоологический журнал. Т. 90. № 6. С. 643–648.
- Снегин Э.А., 2011а. Генетическая структура популяций модельных видов наземных моллюсков в условиях урбанизированного ландшафта на примере *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) // Экологическая генетика. Т. IX. № 2. С. 54–64. [Snegin E.A., 2012. The genetic structure of model species populations of terrestrial mollusks in conditions of urbanized landscape using the example of *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. V. 2. № 2. P. 160–170. doi 10.1134/S2079059712020128].
- Снегин Э.А., 2013. Анализ генетической изменчивости популяций наземного моллюска *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) с использованием *RAPD* и *ISSR* маркеров // Экологическая генетика. Т. XI. № 3. С. 37–47. [Snegin E.A., 2014. Analysis of genetic variability in populations of a terrestrial snail *Chondrula tridens* Müll. (Gastropoda, Pulmonata), based on the *RAPD* and *ISSR* markers // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. V. 4. № 5. P. 444–454. doi 10.1134/S207905971405013X].
- Снегин Э.А., Снегина Е.А., 2016. Генетическая структура популяций особо охраняемого моллюска *Serpea vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях северо-восточной части современного ареала // Экологическая генетика. Т. XIV. № 3. С. 13–27. doi 10.17816/ecogen14313–27
- Сычев А.А., Снегин Э.А., Шаповалов А.С., Пономаренко Е.В., Чендев Ю.Г., 2015. К вопросу о структуре фауны наземных моллюсков заповедного участка “Ямская степь” в позднем голоцене // Вестник Томского государственного университета. Биология. № 2 (30). С. 146–164.
- Clessin S., 1887. Die Molluskenfauna Oesterreich-Ungarns und der Schweiz. Nürnberg. 358 s.
- Cummings M.P., Handley S.A., Myers D.S. et al., 2003. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case // *Systematic Biology*. V. 52. P. 477–487. doi 10.1080/10635150390218213
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // *Nature Methods*. V. 9. P. 772.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mito-



- chondrial DNA restriction data // *Genetics*. № 131. P. 479–491.
- Folmer O., Black M., Heah W et al., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. V. 3. P. 294–299.
- Hall T., 2011. BioEdit: An important software for molecular biology // *GERF Bulletin of Biosciences*. V. 2(1). P. 60–61.
- Hirano T., Kameda Y., Chiba S., 2014. Phylogeny of the land snails *Bradybaena* and *Phacohelix* (Pulmonata: Bradybaenidae) in Japan // *Journal of Molluscan Studies*. P. 1–7. doi 10.1093/mollus/eyu004
- Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*. V. 89. P. 583–590.
- Nei M., Li W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms restriction endonucleases // *Proceedings the National Academy Sciences. USA*. № 76. P. 5269–5273.
- Palumbi S., Martin A., Romano S. et al., 1991. The simple fool's guide to PCR version 2.0. Honolulu: University of Hawaii. 47 p.
- Peakall R., Smouse P.E., 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. V. 6. P. 288–295.
- Quintero-Galvis J., Castro L.R., 2013. Filogenia molecular de la familia Neritidae (Gastropoda: Neritimorpha) con base en los genes mitocondriales citocromo oxidasa I (COI) y 16S rRNA // *Acta Biológica Colombiana*. V. 18. № 2. P. 307–318.
- Redelings B.D., Suchard M.A., 2005. Joint Bayesian estimation of alignment and phylogeny // *Systematic Biology*. V. 54. P. 401–418.
- Steinke D., Albrecht C., Pfenninger M., 2004. Molecular phylogeny and character evolution in the Western Palaearctic Helicidae s. l. (Gastropoda: Stylommatophora) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. V. 32. P. 724–734.
- Tamura K., Nei M., Kumar S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. V. 101. № 30. P. 11030–11035.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. V. 30. P. 2725–2729.
- Wang P., Xiao Q., Zhou W.C. Hwang C.C., 2014. Revision of three camaenid and one bradybaenid species (Gastropoda, Stylommatophora) from China based on morphological and molecular data, with description of a new bradybaenid subspecies from Inner Mongolia, China // *ZooKeys*. V. 372. P. 1–16. doi 10.3897/zookeys.372.6581
- Winnepenninckx B., Backeljau T., de Wachter R., 1994. Small ribosomal subunit RNA and the phylogeny of Mollusca. *Nautilus 2* (Suppl.). P. 98–110.
- Wright S., 1970. Random drift and shifting balance theory of evolution. *Mathematical Topics in Population Genetics*. Berlin: Springer Verlag. P. 1–31. doi 10.1007/978-3-642-46244-3\_1
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. V. 20. № 2. P. 176–181.

## ASSESSMENT OF GENETIC DISTANCES BETWEEN DIFFERENT FORMS OF *CHONDRULA TRIDENS* (GASTROPODA, PULMONATA), BASED ON DNA MARKERS

E. A. Snegin<sup>#</sup>, A. A. Sychev, E. A. Snegina

Belgorod State National Research University, Belgorod 308015, Russia

<sup>#</sup>e-mail: snegin@bsu.edu.ru

Based on intermicrosatellite fragments of DNA (ISSR) and conserved sequences of nuclear and mitochondrial genes (COI, 16S and 18S), three forms of *Chondrula tridens* (Müller 1774) (var. *galiciensis*, *albolimbata* and *major*) were analyzed for the purpose of clarifying their taxonomic statuses. ISSR analysis demonstrates that the *major* populations are significantly distant from the those of *albolimbata* and *galiciensis* ( $\Phi_{st}$  varying from 0.234 to 0.581). Between the *albolimbata* and *galiciensis* groups, the level of  $\Phi_{st}$  differentiation ranged 0.145–0.340, which fails to lie beyond the differences between the populations within the forms. An analysis of conserved DNA sequences shows that genetic distances between these forms can be regarded as interspecies differences within the same genus. According to the COI gene, the genetic distances between the forms are  $D_{a/g} = 0.295$ ,  $D_{m/g} = 0.422$ ,  $D_{m/a} = 0.478$ , while for the 16S gene,  $D_{a/g} = 0.130$ ,  $D_{m/g} = 0.358$ ,  $D_{m/a} = 0.392$ . The 18S rRNA sequences in the three species compared and in the species *Ena montana* (Draparnaud 1801) from the same family appear to be absolutely identical. We believe that the forms *galiciensis* and *albolimbata* which both inhabit structurally the same landscapes seem to represent sibling species. The form *galiciensis* can be named *Chondrula tridens* (Müller 1774), while the form *albolimbata* is *Chondrula albolimbata* (Pfeiffer 1848). The form *major* is represented by isolated groups and, according to the genetic analysis data, is very distant from the previous forms, therefore also deserving the rank of a species with the name *Chondrula major* (Krynicky 1833).

**Keywords:** ISSR, COI, 16S, 18S genes, land snail, phylogenetic analysis