

Морфо-генетическая изменчивость нативных и адвентивных популяций моллюска *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae)

Э.А. СНЕГИН, В.В. АДАМОВА, А.А. СЫЧЕВ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, 308015; snegin@bsu.edu.ru

Morpho-genetic variability of native and adventitious populations of the *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae)

E.A. SNEGIN, V.V. ADAMOVA, A.A. SICHEV

Belgorod State National Research University, Belgorod, 308015, RUSSIAN FEDERATION;
E-mail: snegin@bsu.edu.ru

ABSTRACT. The population structure of the terrestrial mollusc *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae) in the native area (Crimea Peninsula) and out of its borders (two adventive groups in the city of Belgorod) was studied on the basis of conchometric characteristics and analysis of polymorphic allozyme loci. For all the morphometric parameters statistically significant differences were found between the studied groups. In all studied populations a high level of intrapopulation genetic variability was revealed ($Fit = 0,401$). At the same time, the considerable variability of the conchological parameters and the high level of allelic polymorphism at a number of loci identified in adventitious colonies create the prerequisites for successful adaptation to new conditions and further expansion of the species range in urbanized areas.

Относительно недавняя находка *B. cylindrica* в 2012 г. на территории юга Среднерусской возвышенности в г. Белгород [Снегин и др., 2014], находящегося в шестистах километрах к северо-востоку от исконного ареала, позволила проверить это предположение. Стоит отметить, что, несмотря на сравнительно недавнюю интродукцию, этот моллюск образовал на новом месте обитания довольно многочисленные колонии (в среднем 229 особей/м²). Этот факт позволил изучить морфогенетическую структуру адвентивных популяций на ранних стадиях инвазионного процесса. Актуальность работы определяется тем обстоятельством, что распространение адвентивного вида в урбанизированных биотопах в сочетании с антропогенной нагрузкой может необратимо повлиять на функционирование естественных экосистем [McKinney, Lockwood, 1999; Parker et al., 1999; Strayer, 2012; Kumschick et al., 2015].

Целью исследования являлся сравнительный анализ конхиометрической и генетической структуры адвентивных популяций *B. cylindrica*, обитающих на территории юга Среднерусской возвышенности и популяций, локализованных в пределах естественного ареала.

Введение

Ксерофильный моллюск *Brephulopsis cylindrica* (Menke, 1828) является эндемиком Крыма, где образует плотные скопления на открытых степных участках и типичен для естественных и урбанизированных биотопов [Шилейко, 1984]. Однако в последнее время наблюдается расширение северной границы ареала этого вида за счет его завоза на различные территории [Вычалковская, 2008; Balashov et al., 2013; Балашов, 2016]. Согласно имеющимся сведениям, немаловажным фактором, способствующим успешной колонизации новых местообитаний, может являться характерная для данного вида конхиологическая и аллозимная изменчивость [Kramarenko, Dovgal, 2014; Крамаренко, Снегин, 2014].

Материалы и методы

Сбор материала осуществлялся в течение летнего полевого сезона 2015 г. В работе использовались выборки особей *B. cylindrica* из двух инвазивных популяций, обнаруженных в черте г. Белгород. Для сравнения были взяты семь выборок, собранных на территории Крыма, пять из которых в дальнейшем использовались для аллозимного анализа (Табл. 1). Измерения раковин проводили по стандартной методике (Рис. 1) [Шилейко, 1978]: большой диаметр раковины ($БД$), высота раковины ($ВР$), высота устья ($ВУ$), ширина устья ($ШУ$); рассчитывали объем раковины ($V = БД^2 \times ВР / 2$) и площадь устья ($S = 3,145 \times ВУ \times ШУ / 4$); определяли индексы $ВР/БД$, $ВУ/ШУ$, V/S . Для морфометрического анализа использо-

Табл. 1. Пункты сбора материала.

Table 1. Sampling sites.

№	Пункт	Количество промеренных раковин	Описание пункта	Географические координаты
1	Аузун-Узень*	27	Большой Каньон, долина реки Аузун-Узень. Бахчисарайский р-н.	44°31'32'' с.ш. 34°00'30'' в.д.
2	Бахчисарай	20	Злаковая степь, южный склон Бахчисарайского каньона. г. Бахчисарай	44°44'50.30'' с.ш. 33°53'24.43'' в.д.
3	Белгород-1	100	Открытый степной участок, окрестности мелового карьера, частный сектор. г. Белгород	50°62'30.82'' с.ш. 36°53'06.63'' в.д.
4	Белгород-2	100	Участок с рудеральной растительностью, частный сектор. г. Белгород	50°60'41.02'' с.ш. 36°55'16.81'' в.д.
5	Фиолент	26	Злаковая каменистая степь на обрывистом берегу Черного моря. Севастопольский горсовет	44°32'16.40'' с.ш. 33°26'36.97'' в.д.
6	Херсонес	13	Злаковая каменистая степь при развалинах Херсонеса.г. Севастополь	44°36'28.63'' с.ш. 33°29'12.53'' в.д.
7	Кизил-Чигир*	30	Южный склон г. Кизил-Чигир, травянистый склон. Бахчисарайский р-н, окр. с. Трудолюбовка	44°47'45.00'' с.ш. 34°00'35.00'' в.д.
8	Красный Мак	17	Злаковая степь, подножье хребта Арман-Кая восточной экспозиции. Бахчисарайский район. с. Красный Мак	44°38'35.56'' с.ш. 33°46'48.57'' в.д.
9	Высота	24	Злаковая степь, северо-восточный склон холма. Севастопольский горсовет.	44°31'26.96'' с.ш. 33°33'14.09'' в.д.

* - выборки, использованные только для морфометрического анализа



РИС. 1. Схема промеров раковин и пункты расположения адвентивных колоний *B. cylindrica* (1 – пункт «Белгород-1», 2 – пункт «Белгород-2»).

FIG. 1. The scheme of shell measurements and sampling sites of invasion populations of *B. cylindrica* (1 – point “Belgorod-1”, 2 – point “Belgorod-2”).

вались раковины половозрелых особей, закончивших рост и образовавших отворот на устье.

Для генетического анализа из каждой выборки были отобраны по 20 особей¹. Изоферменты экстрагировали из ретрактора ноги моллюска

путем замораживания при 80°C с последующим оттаиванием и механическим измельчением тефлоновым гомогенизатором в 0,05 МТрис-НСI-буфере (рН 6,7). Электрофорез проводили в полиакриламидном геле в камере VE-20 (Helicon, Россия). Фракционирование неспецифических эстераз осуществляли в 10% геле, а супероксид-дисмутазы и малатдегидрогеназы – в 7,5% геле. Для электрофореза использовали гелевый Трис-

¹ В популяциях «Херсонес» и «Красный Мак» выборки были дополнены неполовозрелыми особями, которые не использовались для морфометрического анализа

Табл. 2. Генетические маркеры.

Table 2. Genetic markers.

Маркер	Обозначение	Тип наследования (кодминантный)
Неспецифические эстеразы	<i>EST3</i>	с четырьмя аллелями
	<i>EST4</i>	с двумя аллелями
Супероксиддисмугазы	<i>SOD2</i>	с тремя аллелями
	<i>SOD4</i>	с двумя аллелями
Малатдегидрогеназы	<i>MDH1</i>	с двумя аллелями
	<i>MDH2</i>	с тремя аллелями

НСI буфер (концентрирующий гель pH 6,7, разделяющий гель pH 8,9); электродный буфер трис-глициновый (pH 8,3). В работе использовались генетические маркеры, известные для *B. cylindrica* (Табл. 2) [Крамаренко, Снегин, 2014]. Окрашивание блоков на выявление неспецифических эстераз проводилось в субстратной смеси: Трис-НСI (pH 7,4), б-нафтилацетат, прочный красный TR. Для выявления супероксиддисмугаз калий-фосфатный буфер (pH 7,8), НТС, ФМС. Для выявления малатдегидрогеназ 0,1 МТрис-НСI (pH 8,4), малат натрия, НТС, ФМС, НАД.

Границы локусов определяли путем сравнения эмпирического распределения генотипов с теоретически ожидаемым распределением по Харди-Вайнбергу с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона.

Изменчивость морфометрических признаков оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, а также его аналога - теста Краскала-Уоллиса [Kruskal, Allen, 1952] и критерия достоверно значимой разности HSD [Tukey, 1949]. Для статистической обработки использовали программу R [R CoreTeam, 2016]. Обработку данных генетического анализа осуществляли в программе GenALEX 6.501 [Peakall, Smouse 2012].

Ввиду того, что для оценки уровня гетерогенности популяций *B. cylindrica* были использованы выборки ограниченной численности, содержащие лишь небольшую часть популяционного аллелофонда, нами был проведен анализ мультилокусной изменчивости. Для этого были рассчитаны мультилокусные комбинации для каждой из 140 особей. Затем в каждой группе было оценено общее количество мультилокусных генотипов

(NMLG) и число уникальных мультилокусных генотипов (NMLG-1), т.е. тех комбинаций, которые были отмечены в одной единственной выборке. В дальнейшем, основываясь на распределении частот мультилокусных генотипов, для каждой популяции было вычислено потенциальное генетическое разнообразие, ожидаемое при увеличении объема выборки до бесконечности (N_{max}). Анализ проводили с помощью двух непараметрических методов: метод Chao1-bc (bias-corrected form for the Chao1) [Chao, 2005] и метод «складного ножа» первого порядка (1 storderjack-knife) [Burnham, Overton, 1978]. Все расчеты были проведены с помощью программы SPADE [Chao, Shen, 2009].

Результаты и обсуждение

Результаты промеров раковин *B. cylindrica* представлены в Табл. 3.

Полученные данные демонстрируют дифференциацию популяций по конхиологическим признакам. Однофакторный дисперсионный анализ подтверждает этот вывод: по всем используемым параметрам межгрупповая дисперсия превышает внутригрупповую ($p < 0,05$) (Таблица 4). К пороговому значению приблизился только показатель ширины устья ($p = 0,038$).

Диаграмма изменчивости морфометрических показателей и индексов представлена на рисунках 2 и 3. Согласно представленным результатам среди исследуемых групп по ряду показателей сильно выделяются группа из Аузун-Узень (пункт 1) и Бахчисарая (пункт 2). Первая группа отличается большей дисперсией абсолютных показателей, а также объемом раковины, площадью устья, отношением объема раковины к площади устья и отношением высоты раковины к ее ширине. Во второй группе, наоборот, указанные признаки более консолидированы, особенно признаки *V* и *S*, по которым эти колонии достоверно отличаются друг от друга (HSD тест, $p < 0,05$). Группа из Фиолента (пункт 5) выделяется по изменчивости индекса *BV/ШУ*, а популяция «Херсонес» (пункт 6) – по индексу *BP/БД*, которые у других групп оказался более консервативным. Примечательно, что между адвентивными колониями из города Белгорода (пункты 3, 4) и большинством нативных крымских популяций по данным показателям достоверные отличия отсутствуют.

Стоит отметить, что по имеющимся сведениям об особенностях биологии изучаемого вида, наиболее вариabельным признаком у него является объем раковины, позволяющим успешно адаптироваться к аридным условиям [Крамаренко, 1997; Вычалковская, Крамаренко, 2003]. Большая консервативность параметров устья, которая

Табл. 3. Значения конхиологических параметров *B. cylindrica* (M±m).Table 3. The values of conchological parameters of *B. cylindrica* (M ± m).

Пункт	<i>BP</i>	<i>ШP</i>	<i>BV</i>	<i>ШV</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>BP/БД</i>	<i>BV/ШV</i>	<i>V/S</i>
Аузун-Узень	28,36± 0,43	7,90± 0,13	7,73± 0,14	5,40± 0,08	827,01± 36,28	32,97± 1,04	3,76± 0,06	1,43± 0,01	25,12± 0,75
Бахчисарай	17,65± 0,16	6,06± 0,07	5,19± 0,06	4,00± 0,04	324,79± 8,83	16,31± 0,29	2,92± 0,03	1,29± 0,01	19,93± 0,46
Белгород-1	17,93± 0,11	6,75± 0,04	5,63± 0,04	4,31± 0,03	410,44± 5,7915	19,14± 0,25	2,66± 0,02	1,31± 0,01	21,58± 0,26
Белгород-2	18,61± 0,12	6,98± 0,05	6,33± 0,04	5,06± 0,42	456,63± 7,31	25,48± 2,43	2,68± 0,02	1,35± 0,01	19,63± 0,29
Фиолент	20,62± 0,30	7,20± 0,08	5,07± 0,13	5,66± 0,16	537,58± 16,06	22,33± 0,66	2,87± 0,04	0,93± 0,04	24,26± 0,56
Херсонес	19,43± 0,37	6,68± 0,12	5,58± 0,12	4,41± 0,08	434,33± 14,69	19,34± 0,68	2,92± 0,09	1,27± 0,03	22,66± 0,82
Кизил-Чигир	18,68± 0,25	6,46± 0,09	5,70± 0,08	4,27± 0,05	392,79± 13,77	19,17± 0,45	2,91± 0,04	1,34± 0,01	20,48± 0,53
Красный Мак	19,55± 0,39	7,05± 0,13	5,77± 0,11	4,55± 0,12	492,61± 26,17	20,75± 0,86	2,78± 0,03	1,27± 0,02	23,69± 0,71
Высота	17,18± 0,27	6,62± 0,09	5,42± 0,12	4,23± 0,09	378,92± 13,67	18,16± 0,85	2,60± 0,04	1,28± 0,01	21,19± 0,59

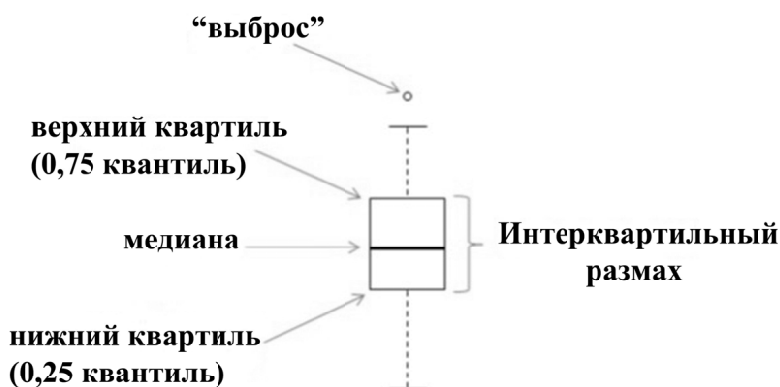
характерна для многих ксерофильных моллюсков, предположительно может быть обусловлено важной ролью устья в поддержании водного баланса у этих видов улиток [Матекин, 1959; Cameron, 1981; Goodfriend, 1986].

Кластерный анализ исследованных популяций по конхиологическим признакам (Рис. 4) подтвердил значительную удаленность группы «Аузун-Узень», отличающуюся более крупными раковинами. При этом адвентивные белгородские колонии вошли в один кластер с остальными крымскими популяциями.

Выявленные нами межпопуляционные различия параметров раковины служат подтверждением отмеченной ранее высокой морфометрической дифференциации исследуемого вида, обусловленной пространственной изоляцией и генетическими процессами в популяциях [Попов, Крамаренко, 1994; Крамаренко, 2010].

Кроме того, полученные нами результаты согласуются с известными для *B. cylindrica* конхиологическими особенностями, выявленными в ходе исследований С.С. Крамаренко [1997, 2009]. Например, ранее было установлено, что параметры раковины изучаемого моллюска варьируют в широких пределах. Так, для крымских популяций указывались пределы изменчивости высоты раковины 14,08-30,81 мм и ширины раковины: 5,51-9,31 мм. Большинство изученных нами групп, как крымских, так и белгородских, попали в этот диапазон.

Исключение составляет популяция «Аузун-Узень», отличающаяся высокими раковинами (максимальное значение 33,8 мм). Также стоит отметить, что для исследованных нами популяций из Крыма характерно расширение нижних границ изменчивости высоты устья. Так, наименьшее значение указанного параметра обнару-



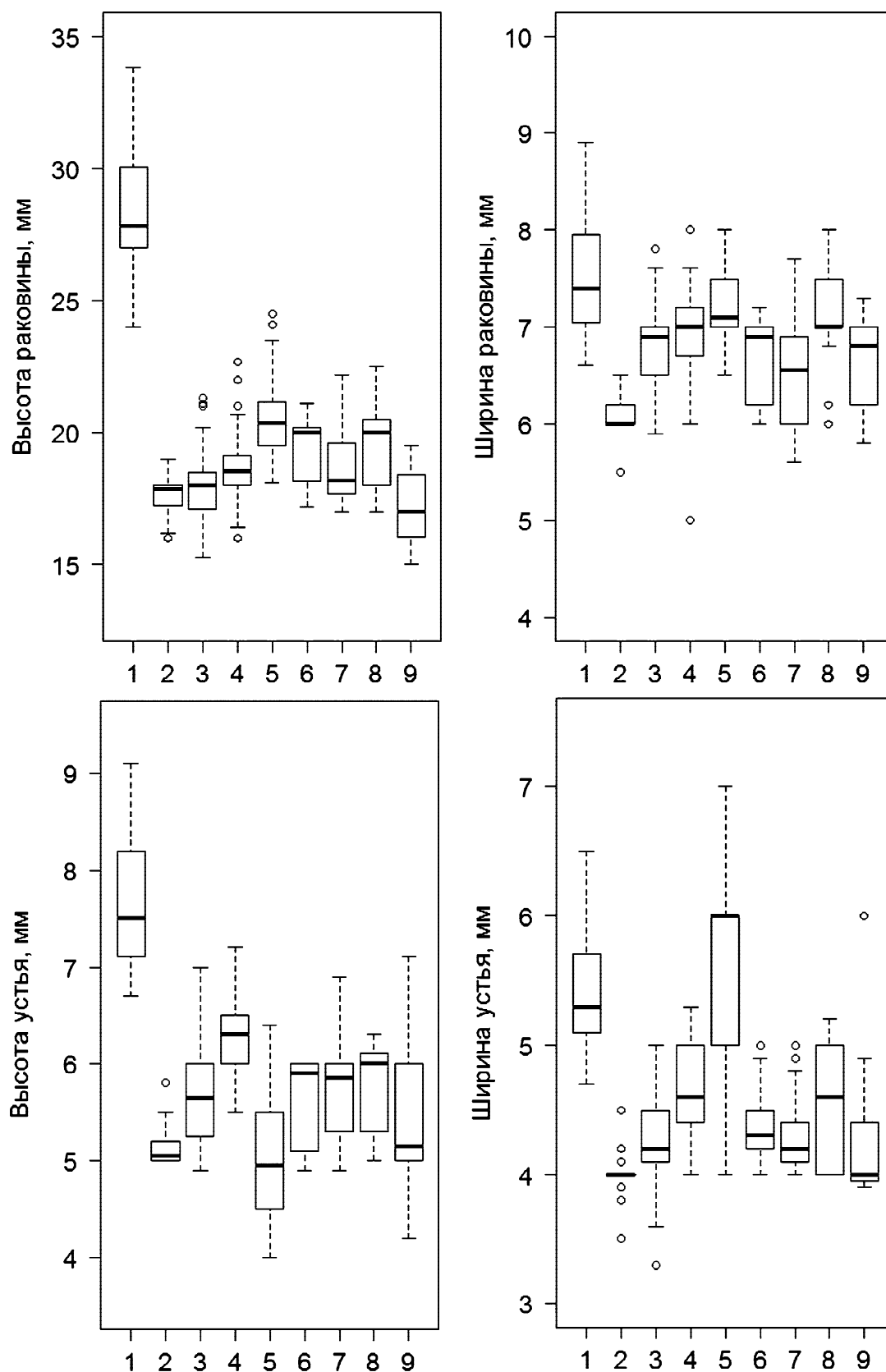


РИС. 2. Абсолютные показатели раковин *B. cylindrica* в исследуемых популяциях (мм). Популяции: 1- Аузун-Узень, 2 – Бахчисарай, 3- Белгород-1, 4 – Белгород-2, 5 – Фиолент, 6 – Херсонес, 7 – Кизил-Чигир, 8 – Красный Мак, 9 – Высота. На предыдущей странице приведены обозначения на графиках [Мастицкий, Шитиков, 2014].

FIG. 2. Absolute parameters of *B. cylindrica* shells in the studied populations (mm). 1 - Auzun-Uzen, 2 – Bakhchisaray, 3 – Belgorod-1, 4 – Belgorod-2, 5 – Fiolent, 6 – Hersones, 7 - Kizil-Chigir, 8 – KrasnyMak, 9 – Vysota. Notations on the plots are given on the opposite page [Мастицкий, Шитиков, 2014].

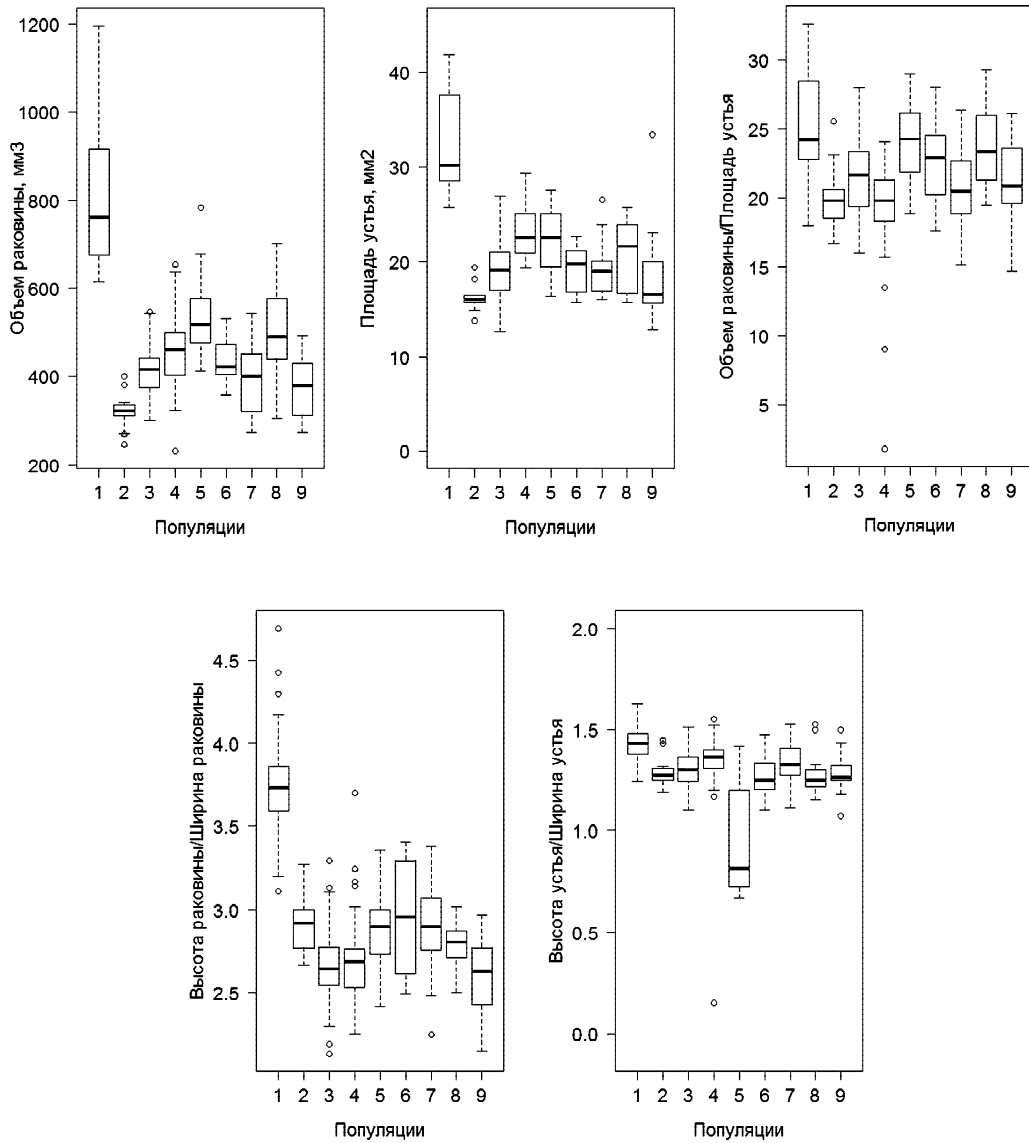


РИС. 3. Интегральные показатели и индексы раковин *B. cylindrica* в исследуемых популяциях. Обозначения как на рисунке 2.

FIG. 3. Integral parameters and indices of shells *B. cylindrica* in the studied populations. Designation as in figure 2.

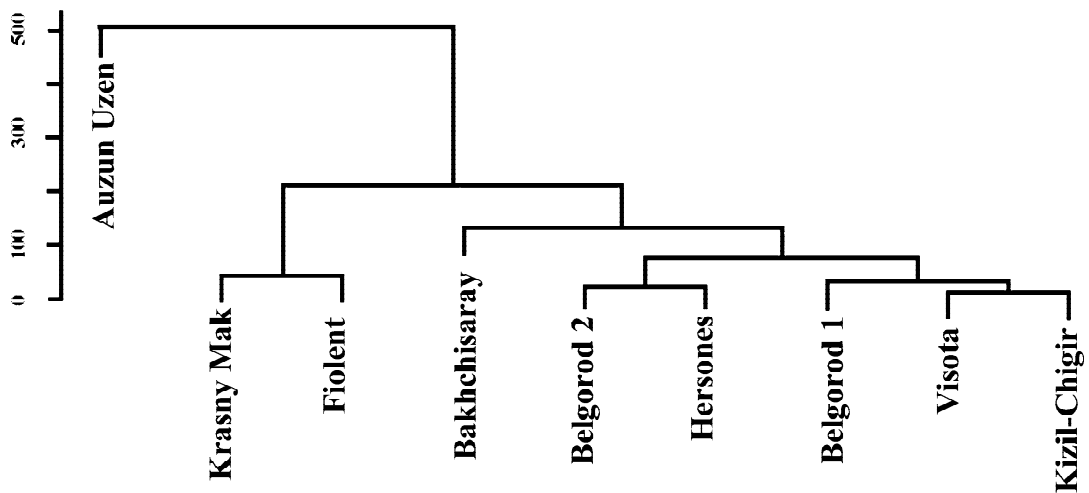


РИС. 4. Дендрограмма евклидова расстояния, вычисленного на основе сопоставления признаков раковины *B. cylindrica*.

FIG. 4. Dendrogram of the Euclidean distance based on the comparing conchological parameters of *B. cylindrical* shells

жено у моллюсков из группы «Фиолент» составило 4,0 мм, в то время как у ранее исследованных популяций минимальное значение этого признака составляло 5,1 мм. Значительная внутрипопуляционная морфометрическая изменчивость отмечена как в исследованных нами группах *B. cylindrica*, так и в адвентивных причерноморских популяциях *B. cylindrica*, обитающих на территории г. Николаев [Крамаренко, 2009].

Данные аллозимного анализа представлены в Таблицах 5 и 6. Во всех исследуемых популяциях наблюдается высокий уровень генетической изменчивости по отдельным локусам (*EST3*, *EST4* и *MDH2*). Вместе с тем, локусы *SOD2*, *SOD4* и *MDH1* оказались мономорфны в большинстве исследованных популяций.

При этом, белгородские и крымские популяции оказались сопоставимы по показателям генетического разнообразия. Инвазивные группы имеют промежуточные значения по показателям ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности. Коэффициент инбридинга во всех популяциях имеет низкие показатели и в ряде популяций принимает отрицательные значения ввиду избытка гетерозигот. В адвентивной популяции Белгород-2 такой эффект обусловлен значительным избытком гетерозигот по локусу *EST4*. Примечательно, что значения наблюдаемой гетерозиготности в инвазивных белгородских группах (пункт 3 и 4) оказались сходными с аналогичными показателями, отмеченных в большинстве адвентивных колоний моллюсков из г. Николаев [Крамаренко, Снегин, 2014].

Также стоит отметить, что в белгородских и николаевских колониях преобладают частоты аллелей *EST3-2* и *MDH1-1*. Точно такая же картина наблюдается и в крымских группах. Однако по другим аллелям такого «единства» не наблюдается. Например, по локусу *Est4* в белгородских группах отмечен паритет между 1 и 2 аллелями. При этом, в николаевских колониях доминирует аллель 1, в крымских – аллель 2. В локусе *MDH2* в Белгороде доминирует аллель 1, а в Николаеве и Крыму – аллель 2. По локусу *SOD 2*: в Белгороде и Крыму – аллель 3, в Николаеве – аллель 2 (также как и в группе «Красный мак»). По локусу *SOD4* колония «Белгород 1» гомозиготна по аллелю 1, а «Белгород 2» – по аллелю 2, при этом в Николаеве преобладает первый аллель, в Крыму в разных группах преобладают оба аллеля. Таким образом, отсутствие четкой закономерности в соотношении частот аллелей свидетельствует о том, что при формировании генофондов инвазионных колоний действуют как генетико-автоматические процессы, вызванные генетическим дрейфом, так и факторы генетической революции [Майр, 1968], ведущие к формированию новых сбалансированных генетических

систем, адаптированных к урбанизированной среде.

Стоит отметить, что особенностью генетической структуры популяций моллюсков является значительное разнообразие отдельных локусов, обусловленное генетическим дрейфом, гибридизацией, отбором, а также гетерогенностью среды обитания и другими факторами [Davison, 2002]. Известно также, что сторонники «балансовой теории» [Ayala, 1977; Кирпичников, 1981] считают, что полиморфизм белков является основой биохимической пластичности, обеспечивающей широкую адаптацию вида к определенному спектру условий среды и поддерживается различными формами отбора. Например, в исследованных популяциях ряда ксерофильных моллюсков выявлена корреляция полиморфизма аллозимов с температурой и влажностью [Nevo *et al.*, 1981]. Убедительные доказательства селективного влияния среды на аллозимную изменчивость были продемонстрированы на улитке *Cochlicopa lubrica* [Armbruster, 2001]. Кроме того, на генетическую структуру популяций могут оказывать влияние не только естественные факторы среды, но и антропогенные изменения, что особенно важно для популяций инвазивных видов. Так, исследование полиморфизма дегидрогеназ в популяциях рода *Sepaea* продемонстрировало влияние на аллельный состав загрязнения пестицидами [Manwell, Baker, 1968]. Частотная характеристика локусов аллозимов популяций *Bradybaena fruticum* из некоторых пунктов Подмосковья и окрестностей г. Екатеринбург позволила предположить сильное антропогенное влияние на генетическую структуру популяций [Баталь *и др.*, 1996]. Таким образом, генетическое разнообразие аллозимов, вероятнее всего, адаптивно нежели нейтрально, что объясняется их физиологическими функциями и ролью в регуляции метаболизма [Johnson, 1974]. В наших исследованиях также нельзя исключить того, что своеобразие генофондов адвентивных колоний *B. cylindrica*, обитающих на техногенных территориях г. Белгород, есть результат влияния комплекса факторов климатической и антропогенной природы. Кроме того, довольно высокая аллозимная изменчивость по ряду локусов, выявленная в этих группах, может быть результатом конкурентного вакуума и отсутствия хищников. Подобное явление было нами отмечено ранее в инвазивной колонии *Sepaea vindobonensis*, обитающей в г. Пенза [Снегин 2011, Снегин, Снегина, 2016].

Результаты анализа мультилокусных генотипов представлено в таблице 7.

Согласно полученным данным, у изученных 140 особей отмечено 95 мультилокусных комбинаций, что незначительно превосходит адвентивные колонии из г. Николаев (92 комбинации у 225

Табл. 4. Результаты однофакторного дисперсионного анализа конхиологических параметров *B. cylindrica*.Table 4. ANOVA results for conchological parameters *B. cylindrica*.

Признак	Источник изменчивости	SS	df	MS	F	P
БД	Между группами	40,3	8	5,04	23,9	2,966×10-29
	Внутри групп	73,2	348	0,21		
ВР	Между группами	2669,3	8	333,7	184,9	2,288×10-120
	Внутри групп	627,9	348	1,8		
ВУ	Между группами	152,6	8	19,1	85,1	3,184×10-77
	Внутри групп	78,0	348	0,22		
ШУ	Между группами	87,2	8	10,9	2,1	0,038
	Внутри групп	1831,3	348	5,3		
ВР/БД	Между группами	30,0	8	3,8	69,6	1,424×10-67
	Внутри групп	18,8	348	0,05		
ВУ/ШУ	Между группами	4,5	8	0,56	37,9	3,677×10-43
	Внутри групп	5,1	348	0,015		
V	Между группами	4725431,7	8	590678,7	83,2	4,119×10-76
	Внутри групп	2469952,8	348	7097,6		
S	Между группами	6640,1	8	830,0	4,7	1,749×10-5
	Внутри групп	61455,0	348	176,6		
V/S	Между группами	1082,3	8	135,3	15,9	6,058×10-20
	Внутри групп	2970,6	348	8,5		

Табл. 5. Частоты аллелей локусов аллозимов в популяциях *B. cylindrica*.Table 5. Frequencies of alleles of allozyme loci in *B. cylindrica* populations.

Локус	Алель	Бахчисарай	Белгород-1	Белгород-2	Фиолент	Херсонес	Красный Мак	Высога
EST3	1	0,150	0,325	0,150	0,675	0,875	0,375	0,175
	2	0,500	0,475	0,575	0,325	0,125	0,525	0,575
	3	0,150	0,175	0,275	0,000	0,000	0,100	0,250
	4	0,200	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EST4	1	0,075	0,600	0,450	0,275	0,000	0,125	0,050
	2	0,925	0,400	0,550	0,725	1,000	0,875	0,950
SOD2	1	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,225	0,000	0,600	0,000
	3	1,000	1,000	1,000	0,675	1,000	0,400	1,000
SOD4	1	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000
	2	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000
MDH1	1	0,800	1,000	1,000	1,000	1,000	0,900	1,000
	2	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000
MDH2	1	0,350	0,600	0,825	0,100	0,150	0,150	0,200
	2	0,475	0,200	0,125	0,650	0,575	0,675	0,575
	3	0,175	0,200	0,050	0,250	0,275	0,175	0,225
N		20	20	20	20	20	20	20

Табл. 6. Показатели генетического разнообразия в популяциях *B. cylindrica*.Table 6. Assessments of genetic diversity in *B. cylindrica* populations.

Популяция	Локус	Среднее число аллелей, N_a	Эффективное число аллелей, N_e	Индекс Шеннона, I	Наблюдаемая гетерозиготность, H_o	Ожидаемая гетерозиготность, H_e	Коэффициент инбридинга, F
Бахчисарай	Est3	4,000	2,985	1,238	0,700	0,665	-0,053
	Est4	2,000	1,161	0,266	0,150	0,139	-0,081
	SOD2	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	SOD4	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh1	2,000	1,471	0,500	0,400	0,320	-0,250
	Mdh2	3,000	2,640	1,026	0,850	0,621	-0,368
	Среднее	2,167±0,477	1,710±0,359	0,505±0,214	0,350±0,148	0,291±0,121	-0,188±0,061
Белгород-1	Est3	4,000	2,759	1,116	0,600	0,638	0,059
	Est4	2,000	1,923	0,673	0,600	0,480	-0,250
	SOD2	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	SOD4	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh2	3,000	2,273	0,950	0,300	0,560	0,464
	Среднее	2,000±0,16	1,659±0,314	0,457±0,212	0,250±0,120	0,280±0,127	0,091±0,146
Белгород-2	Est3	3,000	2,332	0,958	0,550	0,571	0,037
	Est4	2,000	1,980	0,688	0,900	0,495	-0,818
	SOD2	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	SOD4	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh2	3,000	1,431	0,568	0,250	0,301	0,170
	Среднее	1,833±0,401	1,457±0,236	0,369±0,173	0,283±0,152	0,228±0,108	-0,204±0,219
Фиолент	Est3	2,000	1,782	0,631	0,450	0,439	-0,026
	Est4	2,000	1,663	0,588	0,350	0,399	0,122
	SOD2	3,000	1,937	0,831	0,400	0,484	0,173
	SOD4	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh2	3,000	2,020	0,857	0,300	0,505	0,406
	Среднее	2,000±0,365	1,567±0,186	0,484±0,159	0,250±0,082	0,304±0,097	0,169±0,073
Херсонес	Est3	2,000	1,280	0,377	0,250	0,219	-0,143
	Est4	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	SOD2	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	SOD4	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh2	3,000	2,332	0,958	0,600	0,571	-0,050
	Среднее	1,500±0,342	1,269±0,218	0,222±0,159	0,142±0,100	0,132±0,095	-0,097±0,027
Красный Мак	Est3	3,000	2,346	0,936	0,650	0,574	-0,133
	Est4	2,000	1,280	0,377	0,050	0,219	0,771
	SOD2	2,000	1,923	0,673	0,500	0,480	-0,042
	SOD4	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh1	2,000	1,220	0,325	0,200	0,180	-0,111
	Mdh2	3,000	1,966	0,855	0,400	0,491	0,186
	Среднее	2,167±0,307	1,622±0,216	0,528±0,146	0,300±0,106	0,324±0,092	0,134±0,154
Высота	Est3	3,000	2,360	0,970	0,650	0,576	-0,128
	Est4	2,000	1,105	0,199	0,100	0,095	-0,053
	SOD2	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	SOD4	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	–
	Mdh2	3,000	2,374	0,976	0,550	0,579	0,050
	Среднее	1,833±0,401	1,473±0,283	0,357±0,197	0,217±0,123	0,208±0,118	0,044±0,036

Табл. 7. Количество отмеченных мультилокусных генотипов и оценки потенциального генетического разнообразия, полученные разными методами для исследованных популяций *B. cylindrica*.

Table 7. The number of multilocus genotypes and the estimates of the and potential genetic diversity for the studied *B. cylindrica* populations obtained by different methods.

Популяция	N_{MLG}	N_{MLG-1}	Метод			
			Chao1-bc		1st orderjackknife	
			$N_{max} \pm SE$	95% CI	$N_{max} \pm SE$	95% CI
Бахчисарай	16	13	28,5±9,7	19,3 – 64,2	27,4±4,7	21,2 – 40,8
Белгород-1	16	16	28,5±9,7	19,3 – 64,2	27,4±4,7	21,2 – 40,8
Белгород-2	11	8	17,6±6,8	12,3 – 45,9	17,6±3,6	13,5 – 29,0
Фиолент	7	5	8,4±2,5	7,1 – 21,4	9,8±2,4	7,7 – 18,7
Херсонес	15	11	22,1±6,1	16,7 – 45,3	24,5±4,3	19,1 – 37,2
Красный Мак	19	17	91,7±51,4	39,9 – 272,0	36,1±5,8	28,0 – 51,6
Высота	20	18	200,5±82,8	96,6 – 445,3	39,0±6,1	30,3 – 55,1

генотипированных особей) [Крамаренко, Снегин, 2014]. Максимальным генетическим разнообразием, как реальным, так и потенциальным обладает популяция «Высота», где каждая из двадцати отобранных особей обладала только ей присущей генетической комбинацией, восемнадцать из которых не встречались в других группах. Немного ей уступила группа «Красный Мак». Самой мономорфной оказалась популяция «Фиолент». Примечательно, что адвентивные группы по данным показателям заняли промежуточное положение. При этом в колонии «Белгород-1» из шестнадцати обнаруженных мультилокусных комбинаций все оказались уникальными.

Результаты анализа молекулярной дисперсии

(Табл. 8) показывают высокий уровень индивидуальной изменчивости. Об этом свидетельствует коэффициент инбридинга особи относительно популяции ($F_{it}=0,401$; $p=0,001$). Изменчивость на уровне субпопуляций ($F_{is}=0,011$; $p=0,001$) и популяций ($F_{st}=0,394$; $p=0,001$) в сумме оказалась сопоставимы с индивидуальной. Полученные данные согласуются с результатами иерархического анализа молекулярной дисперсии в адвентивных группах г. Николаев, где также была отмечена высокая аллозимная изменчивость внутри популяций [Крамаренко, Снегин, 2014].

Значения попарных оценок генетической дифференциации (F_{st}) между исследованными популяциями *B. cylindrica* (Табл. 9) показали высо-

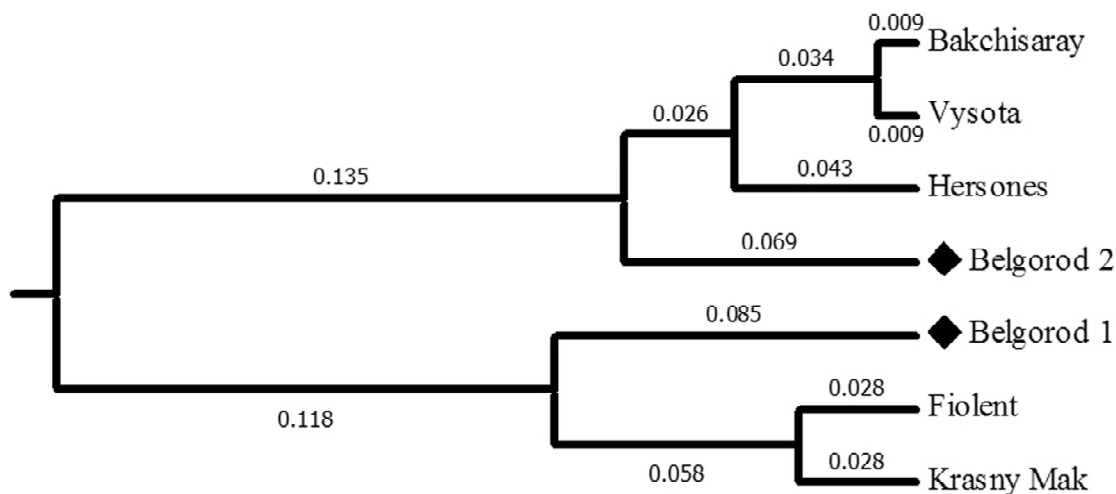


РИС. 5. Дендрограмма генетических расстояний по Неи между группами *B. cylindrica*.

FIG. 5. Dendrogram of the genetic distances between groups of *B. cylindrica*.

Табл. 8. Результаты анализа молекулярной изменчивости для инвазивных популяций *B. cylindrica*.Table 8. Results of the hierarchical analysis of the molecular variance for invasion population of the *B. cylindrica*.

Источник изменчивости	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>Est. Var.</i>	%	<i>Fst</i>	<i>Fis</i>	<i>Fit</i>
Между популяциями	6	126,1	21,02	0,506	39,0	0,394	0,011	0,401
Внутри популяций	133	104,5	0,786	0,009	1,0			
Между особями	140	107,5	0,768	0,768	60,0			
Общая	279	338,1		1,283	100,0			

кий уровень их оригинальности по соотношению частот аллозимов. При этом, рядом расположенные адвентивные колонии дистанцировались друг от друга значительно, чем от удаленных крымских популяций.

На Рис. 5 представлены результаты кластерного анализа, проведенного с помощью невзвешенного парно-группового метода (UPGMA) на основе матрицы генетических расстояний по Ней [Nei, 1975]. Полученные результаты во многом подтверждают данные AMOVA и расположение колоний в определенном кластере, по всей видимости, не зависит от географической локализации.

Так, крымские популяции оказались разделены на два крупных кластера, каждый из которых содержит как «севастопольские» группы (пункты Фиолент, Херсонес, Высота), так и «бахчисарайские» группы (пункты Бахчисарай, Красный Мак). Значительные генетические дистанции между двумя белгородскими популяциями предположительно можно объяснить независимыми случаями инвазии и, соответственно, разным происхождением. В то же время, особенности обитания инвазивных групп *B. cylindrica* в условиях урбанизированного ландшафта способствуют формированию популяционной структуры в виде частично изолированных колоний [Крамаренко, 2010], что может способствовать дальнейшей дифференциации групп моллюсков [Крамаренко, Снегин, 2014].

В заключение нами была рассчитана эффективная численность исследуемых групп улиток по формуле, учитывающей уровень инбридинга в популяции [Ли, 1978]:

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

Для получения сопоставимых данных мы вычислили отношение эффективного размера выборки к ее общему объему (Рис. 6). При этом отрицательные значения инбридинга в данной формуле мы расценивали как его отсутствие ($F=0$) и эффективный размер оказывался равным численности выборки. В случае стопроцент-

Табл. 9. Парные оценки генетической дифференциации (*Fst*) между исследованными популяциями *B. cylindrica* по изоферментным локусам.Table 9. Pairwise estimates of genetic differentiation (*Fst*) between populations of *B. cylindrica*.

Популяции	1	2	3	4	5	6	7
	1	0,000					
2	0,272	0,000					
3	0,369	0,159	0,000				
4	0,180	0,329	0,256	0,000			
5	0,126	0,339	0,281	0,052	0,000		
6	0,443	0,305	0,117	0,294	0,273	0,000	
7	0,300	0,120	0,038	0,254	0,252	0,117	0,000

ной гомозиготности, выявленной по ряду локусов, коэффициент инбридинга мы условно приравнивали к единице ($F=1$), а эффективная численность составляла половину от общей численности группы. Согласно полученным значениям, в среднем соотношение Ne/N оказалось равным $0,745 \pm 0,101$, что укладывается в общий диапазон доли Ne , предложенный Кроу, Мортон и Кимура, которые определили, что для большинства организмов доля Ne составляет в среднем 0.75 [Crow, Morton, 1955; Crow, Kimura, 1970]. Однако в отдельных группах этот показатель оказался ниже оптимальной величины (особенно в пунктах «Белгород-1» и «Херсонес»). Это объясняется полной гомозиготностью и довольно значительными показателями инбридинга по отдельным локусам.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что популяции *B. cylindrica*, включая и инвазив-

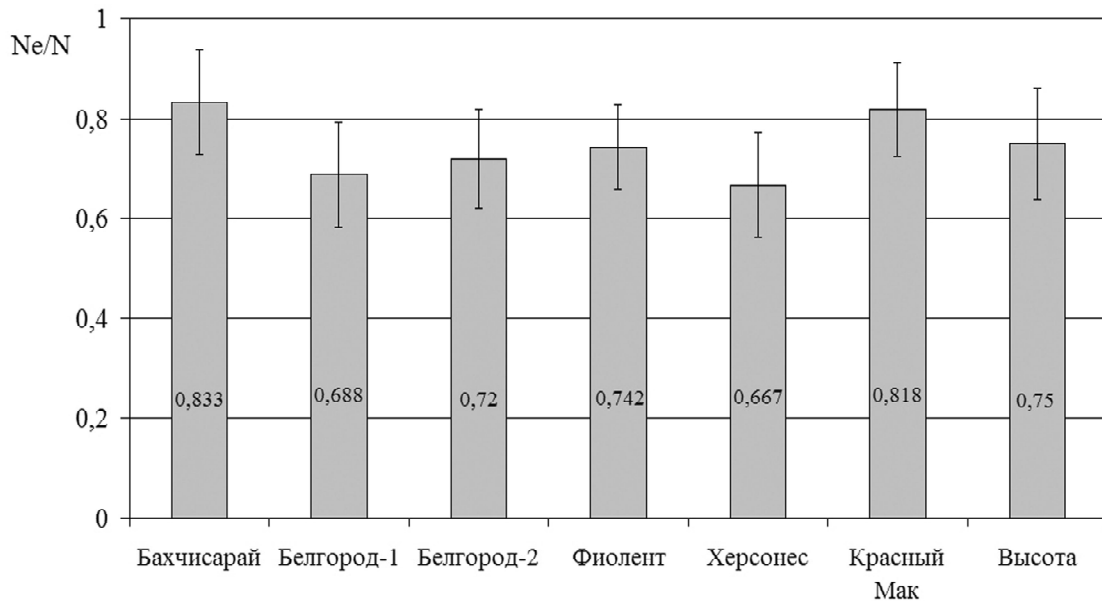


РИС. 6. Значения доли эффективной численности в исследуемых группах *B. cylindrica*

FIG. 6. The values of the proportion of effective population size in the studied groups of *B. cylindrica*.

ные группы, обладают большим генетическим и фенетическим разнообразием. Этот факт подтверждает сделанные ранее наблюдения, согласно которым, несмотря на то, что биологические особенности моллюсков (малая подвижность и возможность самооплодотворения) могут способствовать потере генетического разнообразия, у адвентивных популяций часто обнаруживается высокий полиморфизм [Arnaud, Laval, 2004; Naase, Misof, 2008]. Известно также, что даже утрата генетического разнообразия в инвазивных популяциях моллюсков не означает последующего угасания их популяции и прекращения распространения вида-вселенца на новой территории. Примером служат некоторые европейские виды слизней *Arion subfuscus*, успешно расселившиеся в Северной Америке [Pinceel et al., 2005]. В случае с *B. cylindrica*, выявленная нами значительная изменчивость конхиометрических параметров и сравнительно высокий уровень аллельного полиморфизма в адвентивных колониях, создают предпосылки для успешной адаптации их к новым условиям и дальнейшему расширению ареала вида на урбанизированных территориях.

Литература

- Балашов И. 2016. *Охрана наземных моллюсков Украины*. Киев, 272 с.
 Багаль Ш., Матекин П.В., Пахорукова Л.В., Макеева В.М. 1996. Пространственная структура расселения *Bradybaena fruticum* в северо-восточной ча-

сти ареала вида и формирование фенотипического облика популяций вида. *Ruthenica, Russian Malacological Journal*, 6 (1): 67.

- Вычалковская Н.В. 2008. Распространение и внутривидовая изменчивость Крымского эндемичного моллюска *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda, Pulmonata, Buliminidae) за пределами нативного ареала. *Вестник зоологии*, 42 (3): 229–235.
 Вычалковская Н.В., Крамаренко С.С. 2003. Особенности устойчивости к потере влаги у наземных моллюсков *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda, Pulmonata, Buliminidae). *Биоразнообразие и роль зооценоза в естественных и антропогенных экосистемах*. Материалы II международной научной конференции. Днепропетровск, ДНУ: 104–106.
 Кирпичников В. С. 1981. Возникновение и поддержание биохимического полиморфизма в популяциях животных и растений. *Вопросы общей генетики. Труды 14-го Международного генетического конгресса*. Москва: 18–27.
 Крамаренко С.С. 1997. Некоторые аспекты экологии наземных моллюсков *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda, Buliminidae). *Вестник зоологии*, 31 (4): 51–54.
 Крамаренко С.С. 2009. Особенности внутри- и межпопуляционной структуры конхиометрической изменчивости наземного моллюска *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda, Buliminidae). *Вестник зоологии*, 43 (1): 51–58.
 Крамаренко С.С. 2010. Особенности аллозимной изменчивости наземных моллюсков рода *Brephulopsis* (Enidae) в области интрогрессивной гибридизации. *Ruthenica, Russian Malacological Journal*, 20 (1): 27–34.
 Крамаренко С.С., Снегин Э.А. 2014. Генетическая структура континуальных и эфемерных популя-

- ций наземного моллюска *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda; Pulmonata; Enidae). *Экологическая генетика*, 12(2): 23-34.
- Ли Ч. 1978. *Введение в популяционную генетику*. Москва, Мир, 560 с.
- Майр Э. 1968. *Зоологический вид и эволюция*. Москва, Мир, 398 с.
- Мастицкий С.Э., Шитиков В.К. 2014. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. Электронная книга, адрес доступа: <http://r-analytics.blogspot.com>. [Accessed on 12 February 2017]
- Матёкин П.В. 1959. Приспособительная изменчивость и процесс видообразования у среднеазиатских наземных моллюсков семейства Enidae. *Зоологический журнал*, 38 (10): 1518-1536.
- Снегин Э.А. 2011. Оценка жизнеспособности популяций особо охраняемого вида *Cepaea vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях юга лесостепи Среднерусской возвышенности. *Вестник КрасГАУ*, 11: 142-148.
- Снегин Э. А., Артемчук О. Ю., Сычев А. А., Адамова В. В. 2014. Адвентивные виды наземных моллюсков на юге Среднерусской возвышенности. *Биоразнообразие и устойчивость живых систем. Материалы XIII Международной экологической конференции*. Белгород: ИД «Белгород» НИУ БелГУ: 156-157.
- Снегин Э. А., Снегина Е. А. 2016. Генетическая структура популяций особо охраняемого моллюска *Cepaea vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях северо-восточной части современного ареала. *Экологическая генетика*, 14(3): 13-27. DOI: 10.17816/ecogen14313-27
- Попов В.Н., Крамаренко С.С. 1994. О межвидовых различиях характера роста раковин наземных моллюсков рода *Brephulopsis* (Gastropoda; Buliminidae) Крыма. *Вестник зоологии*, 28 (4-5): 3-7.
- Шилейко А.А. 1978. Наземные моллюски надсемейства Helicoidea. *Фауна СССР, Моллюски*. 3(6). Ленинград, Наука: 1-384
- Шилейко А.А. 1984. Наземные моллюски подотряда Pupillina фауны СССР (Gastropoda, Pulmonata, Geophila). *Фауна СССР, Моллюски*. 3(3). Ленинград, Наука: 1-339.
- Arnaud J.-F., Laval G. 2004. Stability of genetic structure and effective population size inferred from temporal changes of microsatellite DNA polymorphisms in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 89-102.
- Armbruster G. F. J. 2001. Selection and habitat-specific allozyme variation in the self-fertilizing land snail *Cochlicopa lubrica* (O.F. Müller). *Journal of Natural History*, 35: 185-199.
- Ayala F.J. 1977. Adaptation evolution of proteins. *Acta Biologica Jugoslavica*, 9(1): 1-15.
- Balashov I.A., Kramarenko S.S., Zhukov A.V., Shklyaruk A.N., Baidashnikov A.A., Vasyliuk A.V. 2013. Contribution to the knowledge of terrestrial mollusks in southeastern Ukraine. *Malacologica Bohemoslovaca*, 12: 62-69.
- Burnham K.P., Overton W.S. 1978. Estimation of the size of a closed population when capture probabilities vary among animals. *Biometrika*, 65(3): 625-633.
- Cameron R.A.D. 1981. Functional aspects of shell geometry in some British land snails. *Biological Journal of the Linnean Society*, 16 (2): 157-167.
- Chao A. 2005. Species richness estimation. In: Balakrishnan N., Read C. B., Vidakovic B. (Eds). *Encyclopedia of Statistical Science*. NY, Wiley: 7907-7916.
- Chao A., Shen T-J. SPADE Anne Chao's Website. 2009. Available online at <http://chao.stat.nthu.edu.tw>. [Accessed on 16 November 2015].
- Crow J.F., Morton N.E. 1955. Measurement of gene frequency drift in small population. *Evolution*, 9: 202-214.
- Crow J. F., Kimura M. 1970. *An introduction to population genetics theory*. New York: Harpers and Row, 591 p.
- Davison A. 2002. Land snails as a model to understand the role of history and selection in the origins of biodiversity. *Population ecology*, 44: 129-136.
- Goodfriend G.A. 1986. Variation in land-snail shell form and size and its causes: a review. *Systematic Zoology*, 35 (2): 204-223.
- Haase M., Misof B. 2009. Dynamic gastropods: stable shell polymorphism despite gene flow in the land snail *Arianta arbustorum*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47 (2): 105-114.
- Johnson G. E. 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. *Science*, 184: 28-37.
- Kramarenko S.S., Dovgal I.V. 2014. Spatial variation of the land snail *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae): a fractal approach. *Vestnik zoologii*, 48(5): 435-440.
- Kruskal W.H., Allen W.W. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260): 583-621
- Kumshick S., Gaertner M., Vila M., Essl F., Jeschke J.M., Pysek P., Ricciardi A., Bacher S., Blackburn T.M., Dick J.T.A., Evans T., Hulme P., Kuhn I., Mrugala A., Pergl J., Rabitsch W., Richardson D.M., Sendek A., Winter M. 2015. Ecological impacts of alien species: quantification, scope, caveats, and recommendations. *BioScience*, 65(1): 55-63.
- Manwell C.A., Baker C.M. 1968. Genetic variation of isocitrate, malate and 6-phosphogluconate dehydrogenases in snails of the genus *Cepaea* - Introgressive hybridization, polymorphism and pollution? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26(1): 195-209.
- Mckinney M.L., Lockwood J.L. 1999. Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(11): 450-453.
- Nei M. 1975. *Molecular population genetics and evolution*. North-Holland Research Monographs, Frontiers of Biology, 288 p.
- Nevo E., Bar-El C., Bar Z., Belles A. 1981. Genetic structure and climatic correlates of desert land snails. *Oecologia*, 48: 199-208.
- Parker I.M.D., Simberloff W.M., Lonsdale K., Goodell M., Wonham P.M., Kareiva M.H., Williamson B., Von Holle P.B., Moyle J.E., Byers L. Goldwasser. 1999. Impact: Toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. *Biological Invasions*, 1: 3-19
- Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic ana-

- lysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Pinceel J., Jordaens K., Van Houtte N., Bernon G., Backel T. 2005. Population genetics and identity of an introduced terrestrial slug: *Arion subfuscus* L. in the north-east USA (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae). *Genetica*, 125 (2): 155–171.
- R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>. [Accessed on 6 June 2016].
- Strayer D.L. 2012. Eight questions about invasions and ecosystem functioning. *Ecology Letters*, 15: 1199–1210.
- Tukey J. 1949. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 5 (2): 99–114.

РЕЗЮМЕ. На основе конхиологических признаков и анализа полиморфных аллозимных локусов изучена популяционная структура наземного моллюска *Brephulopsis cylindrica*, (Gastropoda, Pulmonata, Enidae) в условиях нативного ареала (п-о Крым) и за его пределами (две адвентивные группы в г. Белгород). По всем использованным морфометрическим параметрам между исследованными группами обнаружены статистически значимые различия. Во всех исследованных популяциях выявлен высокий уровень внутрипопуляционной генетической изменчивости ($F_{it}=0,401$). При этом, значительная вариабельность конхиологических параметров и высокий уровень аллельного полиморфизма по ряду локусов, выявленные в адвентивных колониях, создают предпосылки для успешной адаптации их к новым условиям и дальнейшего расширения ареала вида на урбанизированных территориях.

