

К проблеме систематики рода *Helicopsis* (Gastropoda: Pulmonata: Hygromiidae) на территории Восточной Европы

А.А. СЫЧЁВ, Э.А. СНЕГИН

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, ул. Победы 85, Белгород, 308015, РОССИЯ; e-mail: svvuch20@yandex.ru

To the problem of systematics of the genus *Helicopsis* (Gastropoda: Pulmonata: Hygromiidae) from Eastern Europe

A.V. SYCHEV, E.A. SNEGIN

Belgorod state national research university, 308015 Belgorod, Pobeda St. 85, RUSSIA; e-mail: svvuch20@yandex.ru

ABSTRACT. The study reveals high intra- and inter-specific variability of conchological characters, features of the reproductive system, as well as ISSR- DNA markers in steppe snails *Helicopsis* spp., that imposes certain restrictions on the use of these indicators for species identification. Therefore, these characters were supplemented by the sequences of the conservative fragments of nuclear and mitochondrial genes (18S rDNA, 16S rDNA and COI) with good taxonomic signal, which increased the accuracy of our phylogenetic reconstructions. It is demonstrated that along with Western European species *Helicopsis striata*, a previously unknown *Helicopsis* sp. inhabits territory of the Southern Mid-Russian Upland. This species is phylogenetically close to the Crimean group of species of this genus. It has been shown that the rate of mitochondrial genes evolution in different species of *Helicopsis* differ, with the highest value found in taxa with broad distribution range.

Введение

Вследствие антропогенного прессинга природные степи являются одними из наиболее трансформированных экосистем Восточной Европы, сохранившиеся либо на небольших заповедных территориях, либо в виде узких лент по склонам речных долин и балок [Мордкович, 1982]. Изучение биоты этих уникальных островков жизни в настоящее время вызывает немалый интерес. В этой связи особого внимания заслуживают степные виды наземных моллюсков. Такие особенности их биологии, как малоподвижность, узколокальность обитания, часто низкая экологическая валентность, привели к тому, что многие степные виды улиток находятся в уязвимом состоянии и занесены в региональные Красные Кни-

ги и охраняемые списки стран ЕС, Украины и России [Балашёв, 2012].

Характерными представителями целинных степей Восточной Европы являются моллюски из рода *Helicopsis*. Стоит отметить, что система этого рода построена исключительно на особенностях экологии, строении половой системы, а также высокоизменяемых признаках раковины [Шилейко, 1978]. Однако, учитывая характер внутри- и межпопуляционной изменчивости перечисленных параметров в других группах улиток [Murray, Clarke, 1968, 1980; Osselaer, Tursch, 2000; Stankowski, 2011], каждый из этих критериев может только отчасти указывать на видовую принадлежность моллюсков. По этой причине определение видовой принадлежности улиток рода *Helicopsis* во многих случаях затруднено или практически невозможно [Гураль-Сверлова, 2012; Балашёв, 2012]. При этом Н.В. Гураль-Сверловой на территории Донецкого края и его окрестностей на основании ограниченного набора морфологических признаков описано сразу три новых вида: *Helicopsis martynovi* Gural-Sverlova, 2010, *Helicopsis luganica* Gural-Sverlova, 2010 и *Helicopsis subfilimargo* Gural-Sverlova, 2010 [Гураль-Сверлова, 2010], что внесло ещё больше противоречий в систему рода. В то же время на территории юга Среднерусской возвышенности исследование экологии и морфо-генетической изменчивости *Helicopsis striata* (Müller, 1774) выявило высокую степень обособленности его популяций, что может свидетельствовать в пользу их принадлежности к разным видам [Снегин, Сычёв, 2011; Сычёв, Снегин, 2014, 2015, 2016]. Немаловажным считаем тот факт, что отсутствие разработанной системы видов препятствует паспортизации биоресурсов природных экосистем, делает невозможным или бесполезным включение в Красные Книги с последующей охраной форм с неопределённым статусом. В связи с этим, *Helicopsis* spp. Восточной Европы нуждаются в полноценной таксономической ревизии с привлечением молекулярно-генетических маркеров.

Целью нашего исследования является оцен-

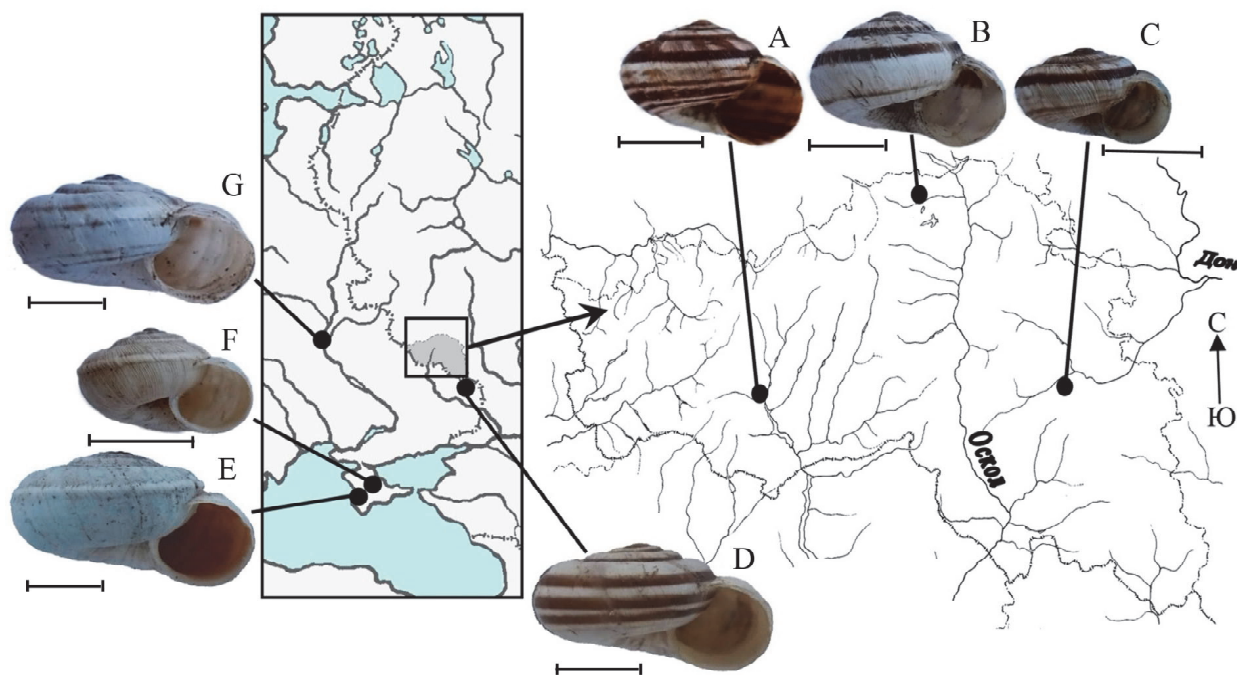


РИС. 1. Пункты сбора материалов на территории Восточной Европы. Длина масштабной линии составляет 5 мм. А. *H. striata* «Белая гора». В. *H. striata* «Губкин». С. *H. striata* «Засосна». D. *H. luganica*. E. *H. filimargo*. F. *H. retowskii*. G. *X. obvia*.

FIG. 1. Collection sites of material on the territory of Eastern Europe. Scalr bar 5 mm. A. *H. striata* "White mountain". B. *H. striata* "Gubkin". C. *H. striata* "Zasosna". D. *H. luganica*. E. *H. filimargo*. F. *H. retowskii*. G. *X. obvia*.

ка внутри- и межвидовой изменчивости таксономически значимых морфо-генетических параметров у *Helicopsis* spp. Восточной Европы.

Материалы и методы

Полевые сборы. Для анализа внутри- и межвидовой изменчивости моллюсков рода *Helicopsis* весной 2013 г. из популяций *Helicopsis retowskii* (Clessin, 1883), *Helicopsis filimargo* (Krynicky, 1836), *H. luganica* (живые особи любезно предоставлены к.б.н. И.А. Балашёвым) и *H. striata* были собраны живые половозрелые особи. В качестве внешней группы родового уровня при оценке степени родства использован вид *Xerolenta obvia* (Menke, 1828) (Табл. 1, Рис. 1). Всего проанализировано 7 популяций моллюсков. Видовую принадлежность собранных особей устанавливали по строению половой системы и конхиологическим признакам [Лихарев, Раммельмейер, 1952; Шилейко, 1978].

Анализ морфологических признаков. У исследованных видов измеряли основные метрические параметры раковины и вычисляли её объём:

$$(V_p = \text{ШП}^2 * \text{ВР} / 2)$$

и площадь устья:

$$(S_y = 3,14 * \text{ВУ} * \text{ШУ} / 4).$$

Схема промеров раковин представлена на Рис. 2. Всего промерено 564 раковины. Для статистической обработки данных использовались пакеты программ Excel (Microsoft Office), Statistica 6.0 (TL 835). При анализе признаков половой системы из каждой выборки вскрыто по 5 половозрелых особей согласно методике А.А. Шилейко [1978].

Выделение и анализ изменчивости ДНК.

Для экстракции ДНК использовались образцы мантии моллюсков, тщательно отжатых от слизи. ДНК выделяли согласно протоколу хлороформ-изопентаноловым методом [Mathew, 1984; Снегин, 2012]. Полученные таким образом образцы ДНК дополнительно очищали с помощью набора реактивов *Silica uni* («Biokom», Россия) и использовали для проведения ПЦР. В качестве ДНК-маркеров задействованы *ISSR*-ампликоны и сиквенсы ядерных (18S рДНК) и митохондриальных генов (первой единицы цитохромоксидазы *c* (COI) и 16S рДНК). Последовательности используемых праймеров и условия амплификации ДНК представлены в Табл. 2. Амплификацию проводили на амплификаторе *Verity* («Applied Biosystems», США).

После ПЦР ампликоны для фрагментного анализа очищали с помощью набора *Diatom*[®] DNA Clean-Up («Isogene laboratory», Россия). Фраг-

Табл. 1. Пункты сбора материалов

Table 1. The collecting sites of materials

№	Вид	Описание пункта	Координаты
A	<i>Helicopsis striata</i> («Белая гора»)	Территория г. Белгород, ксерофитный луг на меловом склоне правого берега р. Северский Донец (Россия)	50°37'28,66"с.ш., 36°37'15,97" в.д.
B	<i>Helicopsis striata</i> («Губкин»)	Территория г. Губкин, ковыльные и кальцефитные степи на склоне балки левого берега р. Осколец (Россия)	51°17'50,56"с.ш., 37°32'11,98"в.д.
C	<i>Helicopsis striata</i> («Засосна»)	Окрестности с. Засосна Белгородской области, ковыльные степи на меловом склоне правого берега р. Тихая Сосна (Россия)	50°37'44,44"с.ш., 38°25'01,21"в.д.
D	<i>Helicopsis luganica</i>	Окрестности с. Донцовка, Луганская область, меловая степь на склоне берега р. Каменка (Украина)	49°34'10,52"с.ш., 39°14'20,34"в.д.
E	<i>Helicopsis filimargo</i>	г. Севастополь, злаковая каменистая степь в прибрежной зоне Черного моря при развалинах Херсонеса (Россия)	44°36'29,65"с.ш., 33°29'17,17"в.д.
F	<i>Helicopsis retowskii</i>	Окрестности с. Мраморное Республики Крым, злаковый луг на каменистом склоне горного хребта Чатыр-Даг (Россия)	44°49'22,88"с.ш., 34°15'59,21"в.д.
G	<i>Xerolenta obvia</i>	г. Киев, мезофитный луг на Владимирской горке (Украина)	50°27'22,87"с.ш., 30°31'34,45"в.д.

менты ДНК для секвенирования очищали в 2%-ой агарозе методом электрофореза с последующей элюцией целевой ДНК набором реактивов Diatom® DNA Elution («Isogene laboratory»).

Фрагментный анализ и секвенирование ПЦР-продуктов проводили на автоматическом капиллярном ДНК-секвенаторе ABI PRISM 3500 («Applied Biosystems»). В результате фрагментного анализа были получены данные по 546 *ISSR*-локусам. Первичные данные обрабатывали в программе GeneMapper® Software v 4.1 («Applied Biosystems»). После чего составляли бинарные матрицы, в которых наличие пика обозначалось за «1» (аллель *p*), а отсутствие – «0» (аллель *q*). Анализ полученных данных проводили в программе GenAlEx v.6.5 [Peakall, Smouse, 2006]. Всего, таким образом, проанализировано 99 особей из 7 популяций.

Для секвенирования ДНК от каждой анализируемой таксономической группы отбирали по одной особи. Выравнивание прямых и обратных сиквенсов проводили в программе MEGA6 [Tamura *et al.*, 2013]. У *Helicopsis* spp. была расшифрована последовательность гена 18S рДНК, имеющая 627 пар оснований (п.о.), последовательность гена COI – 577 п.о. и гена 16S рДНК – 443 п.о. Полученные данные по секвенированию нуклеотидных последовательностей помещены в GenBank (Табл. 3). Все исследованные в работе экземпляры моллюсков хранятся в малакологическом фонде НИЛ популяционной генетики и генотоксикологии НИУ «БелГУ» в г.

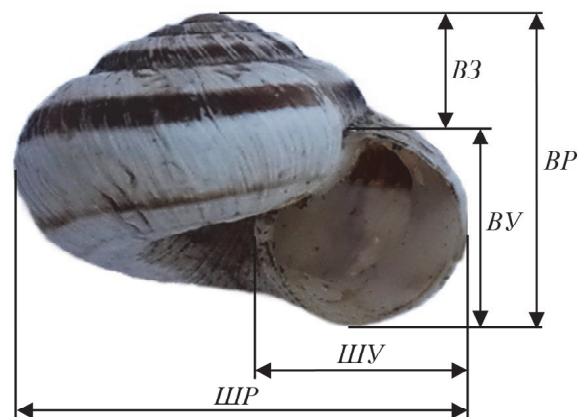


РИС. 2. Схема промеров признаков раковины *Helicopsis* spp. (*BP* – высота раковины, *ШП* – ширина раковины, *B3* – высота завитка, *BV* – высота устья, *ШУ* – ширина устья) [по Снегин, Сычев, 2011].

FIG. 2. The scheme of shell measurements in *Helicopsis* spp. (*BP* – shell height; *ШП* – shell width; *B3* – spire height; *BV* – aperture height; *ШУ* – aperture width) [after Снегин, Сычев, 2011].

Белгород (Россия). Данные по сиквенсам генов *Xerolenta obvia* взяты из базы данных GenBank (числится как *Helicella obvia*): 16S рДНК – № GU331953.1, COI – № GU331962.1, 18S рДНК – № AY546399.1 [Steinke *et al.*, 2004; Dinapoli *et al.*, 2011]. Кроме того, для сопоставления из GenBank были взяты данные по *H. striata* из Чешской Республики (г. Прага, Прокопская долина, Гемровы скалы): 16S рДНК – № KP877490.1, COI – № KP877497.1 [Korabek *et al.*, 2015]. Та-

Табл. 2. Праймеры и условия амплификации ДНК

Table 2. Primers and conditions of DNA amplification

ДНК-последовательности	Праймеры	Температурный профиль
ISSR (SAS1)	FAM 5'-GTGGTGGTGGTGGC-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
COI (Folmer <i>et al.</i> , 1994; Steinke <i>et al.</i> , 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
16S рДНК (Palumbi <i>et al.</i> , 1991; Steinke <i>et al.</i> , 2004)	5'-CGGCCGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' 5'-GGAGCTCCGGTTTGAAGTCAGATC-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
18S рДНК (Winnepeninckx <i>et al.</i> , 1994; Steinke <i>et al.</i> , 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

Табл. 3. Использованные для секвенирования экземпляры моллюсков

Table 3. Used for sequencing specimens of molluscs

Вид	Каталожный номер особи	Номер в базе GenBank		
		COI	16S рДНК	18S рДНК
<i>H. striata</i> («Белая гора»)	HS 2-35SA	KX557235	KX557241	KX557247
<i>H. striata</i> («Губкин»)	HS 11-24SA	KX557236	KX557242	KX557248
<i>H. striata</i> («Засосна»)	HS 18-4SA	KX557237	KX557243	KX557249
<i>H. luganica</i>	HL 1-7SA	KX557238	KX557244	KX557250
<i>H. retowskii</i>	HR 1-19SA	KX557239	KX557245	KX557251
<i>H. filimargo</i>	HF 1-3SA	KX557240	KX557246	KX557252

Примечание: каталожные номера особей указаны в соответствии с коллекцией НИЛ популяционной генетики и геноксикологии НИУ «БелГУ»

ким образом, была проанализирована последовательность нуклеотидов трёх генов у 8 особей.

Филогенетический анализ. По сиквенсам фрагментов генов в программе MEGA 6 проводили оценку попарных генетических расстояний и филогенетический анализ *Helicopsis* spp. методом максимального правдоподобия на основе модели Тамуры-Нея [Tamura, Nei, 1993]. В процессе анализа последовательностей были использованы все три позиции кодонов, которые, как предполагалось, эволюционировали с одинаковой скоростью. Все позиции, содержащие делеции, были исключены из исследования (опция «Complete deletion»).

Первоначальное дерево для эвристического поиска было получено путем применения метода присоединения соседей к матрице попарных расстояний [Saitou, Nei, 1987]. С помощью бутст-

реп-теста (1000 итераций) рассчитывалось оптимальное дерево, которое и использовалось в анализе [Felsenstein, 1985]. Филогенетическое дерево отображалось в таком виде, что длина ветвей таксонов соответствовала их эволюционным расстояниям. Анализ проводился как по отдельным генным фрагментам, так и по объединённым последовательностям.

Результаты

Изменчивость конхиологических признаков.

Данные по метрическим параметрам раковин *Helicopsis* spp. и *X. obvia* представлены в Табл. 4. Наибольшими размерами раковин отличаются виды *H. luganica*, *H. filimargo* и *X. obvia*. При этом между собой эти виды достоверно не различаются и в результате кластерного анализа фор-

Табл. 4. Средние значения морфометрических параметров раковин исследованных видов моллюсков ($M \pm \Delta$, при $P=0,95$)Table 4. The mean values of shells morphometric parameters in studied species of molluscs ($M \pm \Delta$, при $P=0,95$)

Вид	N	ЧО	ШР	ВР	ВЗ	ШУ	ВУ	V_p	S_y
<i>H. striata</i> («Белая гора»)	176	4,8±0,0	10,1±0,2	7,0±0,1	2,8±0,1	4,7±0,1	4,7±0,1	377,3±23,2	17,8±0,7
<i>H. striata</i> («Губкин»)	160	4,9±0,0	11,0±0,1	7,7±0,1	3,0±0,1	5,2±0,1	5,4±0,1	481,2±19,1	22,2±0,5
<i>H. striata</i> («Засосна»)	150	4,3±0,0	7,2±0,1	4,8±0,1	1,6±0,1	3,5±0,1	3,5±0,1	130,0±7,4	9,8±0,3
<i>H. luganica</i>	37	5,2±0,1	13,6±0,4	7,2±0,3	2,2±0,2	5,9±0,2	5,7±0,2	687,6±72,2	26,6±1,7
<i>H. filimargo</i>	14	5,4±0,1	13,6±0,5	7,8±0,4	3,4±0,4	5,5±0,2	5,6±0,2	729,9±77,1	24,4±1,8
<i>H. retowskii</i>	16	4,8±0,1	9,4±0,3	6,2±0,3	2,4±0,2	4,3±0,2	4,3±0,2	230,9±36,3	14,8±1,3
<i>X. obvia</i>	11	5,0±0,1	13,8±0,4	7,6±0,3	2,5±0,2	6,0±0,1	6,1±0,2	735,8±69,3	28,9±1,5

Примечание: N – объём выборки, ЧО – число оборотов

Табл. 5. Значения коэффициента различия (CD) по морфометрическим показателямTable 5. The values of coefficient of difference (CD) on morphometric indicators

Вид		Признак							$M \pm SE$
		БД	ВР	ВЗ	ШУ	ВУ	V_p	S_y	
<i>H. striata</i>	«Белая гора»/«Засосна»	1,25	<u>1,36</u>	<u>1,31</u>	1,19	1,06	1,14	<u>1,29</u>	1,23±0,04
	«Белая гора»/«Губкин»	0,23	0,2	0,06	0,26	0,49	0,16	0,04	0,21±0,06
	«Губкин»/«Засосна»	<u>2,04</u>	<u>1,95</u>	<u>1,38</u>	<u>2,07</u>	<u>2,19</u>	<u>1,82</u>	<u>1,63</u>	<u>1,87±0,11</u>
<i>X. obvia</i> / <i>H. striata</i> «Белая гора»		<u>1,75</u>	0,32	0,39	<u>1,45</u>	1,22	1,17	<u>2,85</u>	<u>1,31±0,33</u>
<i>H. luganica</i> / <i>H. striata</i> «Белая гора»		1,24	0,03	0,58	0,87	0,74	0,74	<u>1,70</u>	0,84±0,27

Примечание: подчёркнуты значения, превышающие порог подвидового различия – 1,28. Указаны средние значения CD и их ошибки ($M \pm SE$, $P=0,95$)

мируют единую группу №1 (Рис. 3). Напротив, изученные популяции *H. striata* отличаются высокой степенью изменчивости раковины. Так, популяция «Засосна» характеризуется относительно мелкими раковинами и низкой изменчивостью морфометрических параметров. Популяция «Губкин» также имеет относительно низкую изменчивость морфометрических параметров, однако отличаются от предыдущей популяции значительно более крупными размерами раковин (например, по среднему значению V_p превышает более чем в 3 раза). Популяция «Белая гора» характеризуется высокой изменчивостью конхиологических признаков. При этом эта группа имеет большее сходство с *H. retowskii* и формируют с ним единый кластер №2 (Рис. 3).

Коэффициент различия CD [Майр и др., 1956] между парами популяций «Белая гора»/«Засосна» и «Белая гора»/«Губкин» по большинству исследованных признаков не превышает подви-

дового порогового значения 1,28, что свидетельствует о том, что эти группы являются популяциями одного вида (Табл. 5). Исключение составляет лишь пара «Губкин»/«Засосна» со средним значением CD равным 1,87±0,11 и указывающим на межвидовой уровень различий между ними.

Тем не менее, между изученными популяциями *H. striata* существуют отличия и по другим конхиологическим признакам. Так, скульптура поверхности раковин моллюсков из популяции «Белая гора» (Рис. 4А) часто отличается отсутствием выраженных ребрышек, характерных для особей этого вида из других районов и напоминает скорее глубокие и частые морщины. В результате поверхность раковины у этих особей более гладкая и блестящая. Также половозрелые особи *H. striata* из популяции «Белая гора» отличаются отсутствием или слабым развитием губы, при этом край устья остается тонким, как у юве-

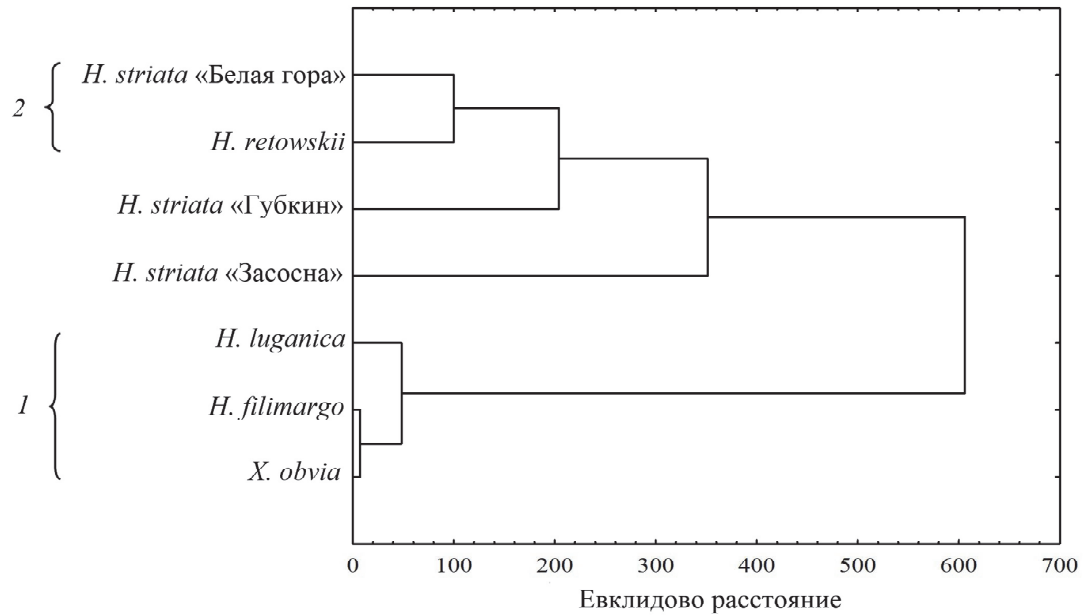


РИС. 3. Кластерный анализ видов моллюсков по морфометрическим параметрам раковины.

FIG. 3. Cluster analysis of species based on the shell morphometric parameters.

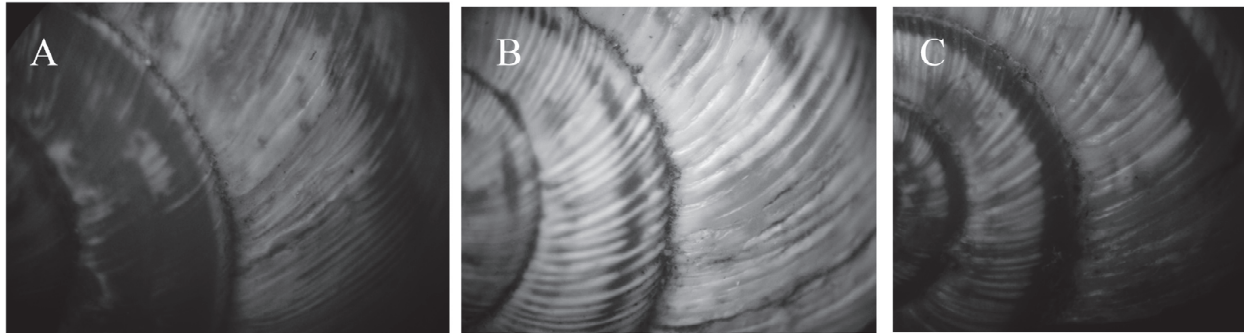


РИС. 4. Скульптура дефинитивных оборотов раковины у *H. striata* из популяций «Белая гора» (А), «Губкин» (В) и «Засосна» (С).

FIG. 4. Sculpture of definitive whorls of the shell in *H. striata* populations from “White mountain” (A) “Gubkin” (B) and “Zasosna” (C).

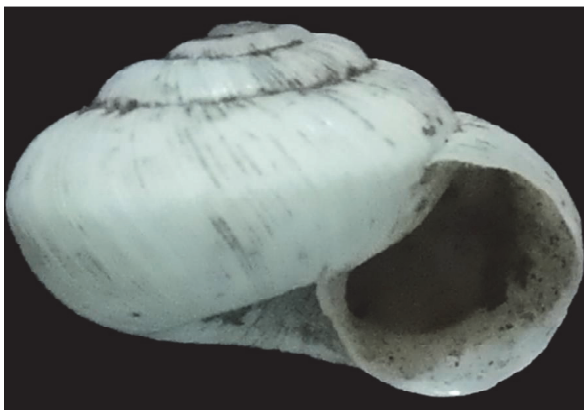


РИС. 5. Угловатость раковины молодой особи *H. striata* из популяции «Губкин». ШПР – 8,9, ВР – 5,8 мм.

FIG. 5. The angularity of the shells of young individual of *H. striata* in populations “Gubkin”. Shell width 8.9, shell height 5.8 mm.

нильных особей. В то же время у половозрелых особей из других популяций, как правило, формируется утолщенная губа. Стоит отметить так-

же, что у ювенильных особей *H. striata* из популяции «Губкин» на периферии оборотов иногда наблюдается угловатость (Рис. 5), исчезающая по мере роста раковины и наступления половозрелости.

Морфология половой системы. Особенности строения различных отделов половой системы у всех исследованных видов моллюсков подробно рассмотрены в работах А.А. Шилейко [1978] и Н.В. Гураль-Сверловой [2010, 2012]. *X. obvia* (Рис. 6Г), как представитель другого рода, хорошо отличается от *Helicopsis* spp. наличием одной пары сумок любовных стрел вместо двух. *Helicopsis* spp. в разной степени отличаются друг от друга по строению отделов половой системы. По нашим данным, гениталии *H. striata* характеризуются следующими основными параметрами. Наружная пара стилофоров имеет варьирующую форму от удлиненной (популяция «Белая гора», Рис. 6А) до шаровидной (популяция «Губкин», Рис. 6В). Внутренняя пара стилофоров хорошо развита и по размерам может лишь не-

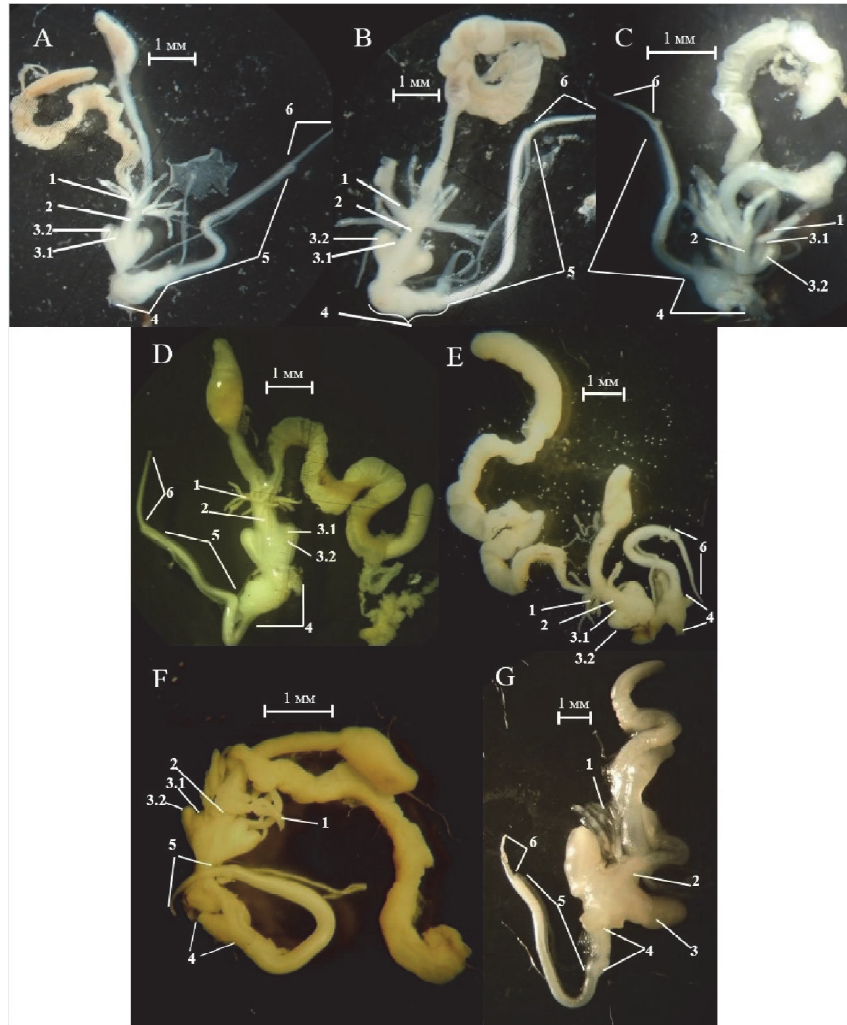


РИС. 6. Половая система особей из популяций исследуемых видов моллюсков. Обозначения: 1. Слизистые железы; 2. Верхний отдел вагины; 3. Стилофоры: внутренние (3.1) и наружные (3.2); 4. Пенис (вскрыт на Е и F); 5. Эпифаллус; 6. Бич. А. *H. striata* «Белая гора». В. *H. striata* «Губкин». С. *H. striata* «Засосна». D. *H. luganica*. Е. *H. filimargo*. F. *H. retowskii*. G. *X. obvia*.

FIG. 6. Reproductive system of individuals from studied molluscs species populations. Definitions: 1. Mucous glands; 2. The upper section of the vagina; 3. Stylophora: internal (3.1) and external (3.2); 4. Penis (revealed in e and f); 5. Epiphallus; 6. Beach. A. *H. striata* "White mountain". B. *H. striata* "Gubkin". C. *H. striata* "Zasosna". D. *H. luganica*. E. *H. filimargo*. F. *H. retowskii*. G. *X. obvia*.

значительно уступать наружной (популяция «Засосна», Рис. 6С). Слизистых желез чаще всего 8, редко до 10, собранных в мутовки несколькими группами. Они хорошо развитые, удлиненные, без ветвления. Пенис имеет форму от удлиненно-грушевидной до шаровидно-грушевидной, длина в 2-2,5 раза меньше длины эпифаллуса. Длина бича также в 2-2,5 раза меньше длины эпифаллуса. Сам эпифаллус может быть как прямым, так и изогнутым. В целом же, различия между популяциями *H. striata* преимущественно выражаются в размере отделов половой системы, что, вероятно, связано с разными размерами самих особей [Крамаренко, 1996]

Не рассматривая подробного строения гениталий *H. luganica* (как и *H. filimargo*, *H. retowskii*), описанного в соответствующих работах, отме-

тим, что вид характеризуется относительно длинным верхним отделом матки, короткими и тонкими слизистыми железами, менее развитыми внутренними стилофорами, грушевидной формой пениса, а также относительно длинными эпифаллусом и бичём (Рис. 6D). Таким образом, диапазон внутривидовой изменчивости многих признаков половой системы *H. luganica* не выходит за рамки внутривидовой изменчивости аналогичных признаков *H. striata*. И это не учитывая того факта, что к настоящему времени *H. luganica* зарегистрирован лишь в одном местообитании и весь спектр внутривидовой изменчивости этого вида пока не известен. Также нами зафиксировано сходство анатомических и конхиометрических параметров у *H. striata* и *H. retowskii*. В частности, у исследованных особей *H. retowskii* (Рис.

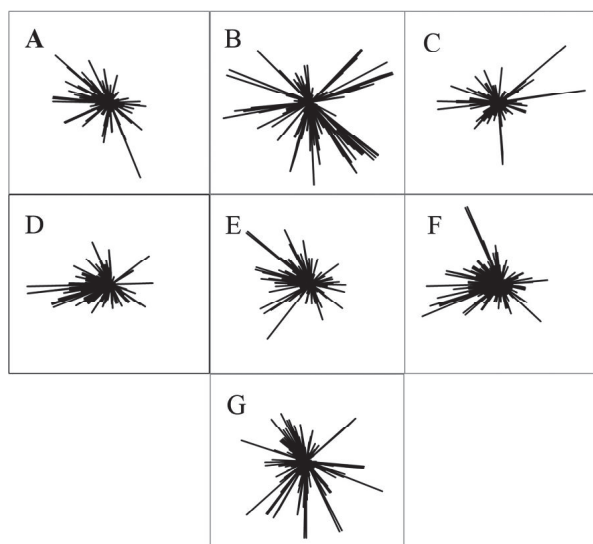


РИС. 7. Полигоны Дебеца, построенные на основе частот p -аллеля 546 локусов ДНК по праймеру *SAS1*. А – *H. striata* «Белая гора»; В – *H. striata* «Губкин»; С – *H. striata* «Засосна»; D – *H. luganica*; E – *H. filimargo*; F – *H. retowskii*; G – *X. obvia*.

FIG. 7. The Debets polygons constructed on the basis of the frequency p -allele 546 DNA loci by primer *SAS1*. A – *H. striata* «White mountain»; B – *H. striata* «Gubkin»; C – *H. striata* «Zasosna»; D – *H. luganica*; E – *H. filimargo*; F – *H. retowskii*; G – *X. obvia*.

6F), внутренняя пара стилофоров так же хорошо развита, как и у *H. striata* из популяции «Засосна». При этом слизистые железы по степени развития опять же мало отличаются от *H. striata*. А вот *H. filimargo*, по нашим данным, достаточно хорошо отличается от остальных исследованных видов рода *Helicopsis* (Рис. 6Е). У этого моллюска зафиксированы хорошо развитые внешние стилофоры сферической формы, относительно менее крупные, но также сферической формы, внутренние стилофоры и вздутый участок ваги-

ны между ними, короткие и тонкие пигментированные слизистые железы, относительно длинный бич.

Изменчивость ISSR-фрагментов. Следующим этапом нашей работы стал анализ изменчивости межмикросателлитных последовательностей ДНК (*ISSR*) в популяциях исследованных видов моллюсков.

Диаграммы частот p -аллеля по 546 локусам ДНК представлены на Рис. 7. Исходя из полученных данных, популяции исследуемых видов значительно отличаются друг от друга по частотам аллелей. При этом наиболее оригинальными частотами обладает популяция *H. striata* «Губкин» (Рис. 7В). Анализ показателей генетической изменчивости популяций рассматриваемых видов (Табл. 6) показал, что популяция *H. striata* «Губкин» и *H. luganica* отличаются меньшей долей полиморфных локусов (P) и более низким числом аллелей (A_e). В то же время по остальным показателям [эффективное число аллелей (A_e), индекс Шеннона (I), ожидаемая гетерозиготность (H_e)] меньшими значениями обладают популяции *H. striata* «Белая гора» и *H. filimargo*. При этом анализ молекулярной дисперсии AMOVA [Excoffier *et al.*, 1992] показал, что уровень подразделенности популяционных генофондов у *H. striata* юга Среднерусской возвышенности ($\Phi_{ST}=0,314$) оказался выше, чем у разных видов ($\Phi_{ST}=0,183$).

На основании частот p -аллеля *ISSR*-локусов по Нею [Nei, 1978] были рассчитаны генетические расстояния между популяциями анализируемых видов и невзвешенным парногрупповым методом (UPGMA) проведен их кластерный анализ (Рис. 8). Наиболее генетически близкими оказались популяции *H. striata* «Белая гора» и *H. retowskii* (кластер 1), а также популяции *H. filimargo* и *H. luganica* (кластер 2). При этом популяции *H. striata* «Засосна» и «Губкин» дис-

Табл. 6. Показатели генетической изменчивости у *Helicopsis* spp.

Table 6. Indicators of genetic variability in *Helicopsis* spp.

Вид	N	P , %	N_a	N_e	I	H_e	$\Phi_{ST} (p=0,001)$
<i>H. striata</i> («Белая гора»)	15	59,34	1,19±0,04	1,12±0,01	0,16±0,01	0,089±0,005	0,314
<i>H. striata</i> («Губкин»)	16	40,48	0,81±0,04	1,17±0,01	0,16±0,01	0,104±0,007	
<i>H. striata</i> («Засосна»)	11	54,21	1,09±0,04	1,14±0,01	0,17±0,01	0,102±0,006	
<i>H. luganica</i>	15	47,25	0,95±0,04	1,14±0,01	0,16±0,01	0,095±0,006	0,183
<i>H. filimargo</i>	15	53,66	1,07±0,04	1,12±0,01	0,15±0,01	0,085±0,005	
<i>H. retowskii</i>	15	65,20	1,30±0,04	1,13±0,01	0,18±0,01	0,097±0,005	
<i>X. obvia</i>	12	50,55	1,01±0,04	1,16±0,01	0,18±0,01	0,108±0,006	

Примечание: N – число особей, P – доля полиморфных локусов, N_a – число аллелей, A_e – эффективное число аллелей, I – индекс Шеннона, H_e – ожидаемая гетерозиготность

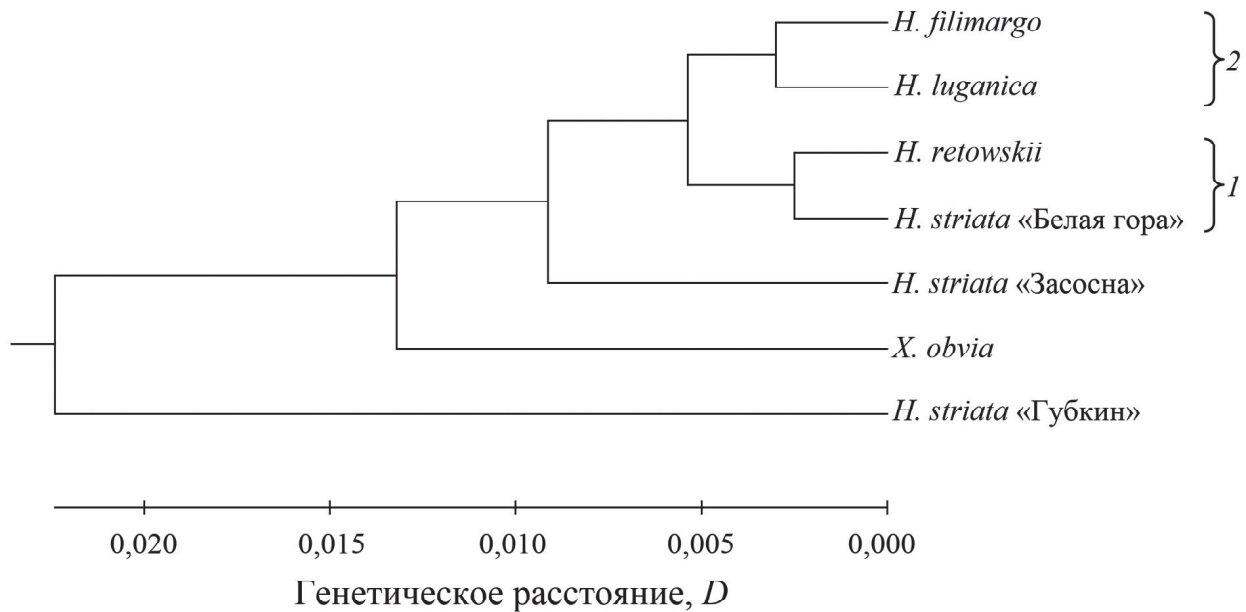


РИС. 8. Дендрограмма популяций *Helicopsis* spp. по 546 локусам ДНК по праймеру *SASI* (метод UPGMA).
 FIG. 8. The dendrogram of *Helicopsis* spp. populations based on 546 DNA-loci by primer *SASI* (UPGMA method).

танцируются от кластеров 1 и 2, а популяция «Губкин» оказалась более удаленной от остальных *Helicopsis* spp., чем представитель другого рода *X. obvia*.

Молекулярно-филогенетический анализ.

Далее нами была проведена проверка статуса изученных популяций с помощью маркеров, имеющих более консервативные генетические последовательности с хорошим таксономическим сигналом и уже использованных ранее для молекулярной таксономии наземных моллюсков [Steinke *et al.*, 2004]. В качестве таких маркеров были задействованы первичные последовательности генов 16S рДНК (Табл. 7), COI (Табл. 8) и 18S рДНК.

В ходе работы выяснилось, что ядерный ген 18S рДНК характеризуется высокой консерва-

тивностью и у *Helicopsis* spp. имеет одинаковую последовательность. При этом представители этого рода отличаются от *X. obvia* лишь одной заменой нуклеотида «Т» на «С» в 211 позиции (Рис. 9). Поэтому филогенетическая реконструкция этого рода была проведена только по митохондриальным генам.

Согласно полученным данным, как по отдельным участкам генов 16S рДНК (Рис. 10) и COI (Рис. 11), так и по их объединенным последовательностям (Рис. 12) исследованные виды рода *Helicopsis* кластеризуются в две группы. Первая группа объединяет *H. striata* из пункта «Белая гора» и *H. luganica* с характерными представителями фауны Крыма (*H. retowskii* и *H. filimargo*). Вторая группа объединяет *H. striata* «Губкин» и *H. striata* «Засосна» с популяцией *H. striata* из

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv	Group Name	*****	
1. <i>H. striata</i> _White mountain		A T T A G T T C A A A A C C A A T C G T C G T T C C C C T T C C C G G G C C C G C G	
2. <i>H. striata</i> _Gubkin		A T T A G T T C A A A A C C A A T C G T C G T T C C C C T T C C C G G G C C C G C G	
3. <i>H. striata</i> _Zasosna		A T T A G T T C A A A A C C A A T C G T C G T T C C C C T T C C C G G G C C C G C G	
4. <i>H. luganica</i>		A T T A G T T C A A A A C C A A T C G T C G T T C C C C T T C C C G G G C C C G C G	
5. <i>H. retowskii</i>		A T T A G T T C A A A A C C A A T C G T C G T T C C C C T T C C C G G G C C C G C G	
6. <i>H. filimargo</i>		A T T A G T T C A A A A C C A A T C G T C G T T C C C C T T C C C G G G C C C G C G	
7. <i>X. obvia</i>		A T T A G T T C A A A A C C A A T C G T C G C T C C C C T T C C C G G G C C C G C G	

РИС. 9. Сравнение участков генов 18S рДНК у *X. obvia* и *Helicopsis* spp. Стрелкой показана замена нуклеотида «Т» на «С» в 211 позиции.

FIG. 9. Comparison of part of 18S rDNA gene in *X. obvia* and *Helicopsis* spp. The arrow shows substitution of nucleotide “T” at “C” in 211 position.

Табл. 7. Гаплотипы фрагмента гена 16S рДНК у *Helicopsis* spp. (A – *H. striata* «Белая гора»; B – *H. striata* «Губкин»; C – *H. striata* «Засосна»; D – *H. luganica*; E – *H. filimargo*; F – *H. retowskii*; P – популяция *H. striata* из г. Прага, Чешская Республика)

Table 7. Haplotypes of the fragment of 16S rDNA gene in *Helicopsis* spp. (A – *H. striata* "White mountain"; B – *H. striata* "Gubkin"; C – *H. striata* "Zasosna"; D – *H. luganica*; E – *H. filimargo*; F – *H. retowskii*; P – population of *H. striata* from Prague, Czech Republic)

Вид	Вариабельные пары оснований																													
	6	10	11	12	13	18	23	27	42	44	45	106	112	114	122	124	125	126	132	134	135	137	144	145	146	147	148	152		
A	A	G	-	-	C	T	A	A	T	-	T	A	A	T	A	T	T	T	A	A	C	T	A	C	T	G	T	T		
B	G	A	-	G	T	.	.	G	.	T	A	.	G	C	G	.	.	A	G	G	.	C	.	.	A	A	.	.		
C	.	A	-	-	T	C	G	G	.	.	C	C	C	.	.	T	.	.	C	.	.	.	C	.		
D	G	
E	C	
F	.	.	A	G	T	
P	G	A	-	T	G	.	.	T	A	-	A	.	G	C	.	.	.	A	G	.	.	.	T	A	A	.	.	C		
	153	154	155	156	158	161	165	172	183	188	189	190	222	225	227	228	229	232	234	236	237	238	240	241	242	245	266	269		
A	A	T	A	T	A	C	A	A	T	G	A	C	G	T	G	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	C	G	T		
B	T	A	.	.	G	T	C	.	.	.	G	T	A	.	T	C	G	G	.	.	G	.	C	-	-	T	.	.		
C	.	A	G	.	.	T	C	G	C	.	T	T	A	.	C	.	.	.	G	.	T	C	.	-	-	T	A	C		
D	T	A	
E	T	
F	T	.	.	C	T	A	A	
P	T	A	C	.	G	T	.	.	.	A	.	T	A	.	T	.	C	G	.	A	.	.	C	-	-	T	.	.		
	274	275	282	289	290	291	294	295	300	303	306	311	347	352	379	381	384	385	388	389	397	402	406	407	416	428	429	443		
A	A	G	G	T	T	G	G	T	T	G	T	A	G	A	G	C	A	A	A	C	G	T	-	T	T	T	T	A		
B	C	A	A	.	A	A	T	A	.	A	.	.	A	.	.	T	T	.	.	T	.	A	A	.	C	C	C	T		
C	.	T	.	A	.	A	T	.	A	A	A	.	A	C	A	T	T	G	G	T	A	A	A	C	-	C	C	T		
D	.	T	A	.	.	.	A	
E	
F	.	A	A	.	.	.	A	T	.	.	-	C	.	
P	G	A	A	.	.	A	T	A	.	A	.	T	A	.	A	A	T	.	.	T	.	A	-	.	.	.	C	.	.	

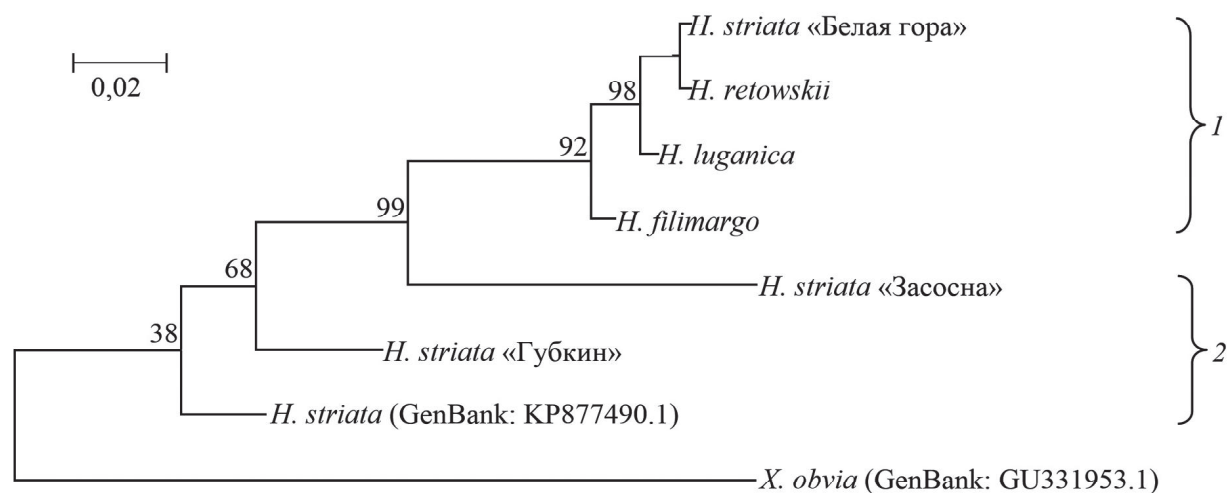


РИС. 10. Филограмма *Helicopsis* spp., построенная по сиквенсам участка гена 16S рДНК (Метод максимального правдоподобия (ML). Проанализировано 435 позиций. Здесь и далее в узлах ветвей указан процент сгруппированных таксонов в результате бутстреп-теста).

FIG. 10. Filogramm of *Helicopsis* spp. built on sequences of partial 16S rDNA gene (Maximum likelihood method. There were a total of 435 positions in the final dataset. Here and latter the values in the nodes indicate the percentage of taxa grouped in the result of the bootstrap test).

Табл. 8. Гаплотипы фрагмента гена COI у *Helicopsis* spp. (A – *H. striata* «Белая гора»; B – *H. striata* «Губкин»; C – *H. striata* «Засосна»; D – *H. luganica*; E – *H. filimargo*; F – *H. retowskii*; P – популяция *H. striata* из г. Прага, Чешская Республика)

Table 8. Haplotypes of the fragment of COI gene in *Helicopsis* spp. (A – *H. striata* "White mountain"; B – *H. striata* "Gubkin"; C – *H. striata* "Zasosna"; D – *H. luganica*; E – *H. filimargo*; F – *H. retowskii*; P – population of *H. striata* from Prague, Czech Republic)

Вариабельные пары оснований

Вид	3	6	9	11	15	16	18	21	24	27	33	36	39	45	48	54	57	69	78	84	86	90	93	96	99	102	117	123	126	129	138	144	147	156	162	165	168	169	172	177	180	183			
A	A	G	G	C	A	T	A	T	A	C	C	T	A	C	T	G	T	C	T	T	T	G	T	G	T	T	T	G	T	A	A	A	T	T	A	T	A	T	C	C	G	A			
B	.	.	A	.	.	T	G	.	.	T	T	.	.	T	T	T	.	T	.	.	.	A	G	T	C	G	C	A	A	.	.	T	.	C	.	A	T	.	.	T	.	.	.		
C	G	A	.	G	C	.	.	G	T	G	.	G	A	.	C	.	T	C	C	.	T	.	T	.	A	.	A	A	G	.	T	A	C	.	A	T	C	.	T	T	.	.	.		
D	T	.	C	.	T	C	C	C	.	.	.	G	G	C	.	T	T	.	.	.	
E
F	A	A	.	T	.	.	.	T	.	.	A	.	C	C	.	.	G	.	G	C	.	G	.	G	.	G	.	T	T	.	G	.	
P	.	T	.	.	.	C	.	.	T	T	.	.	T	G	.	C	T	.	.	.	A	.	T	.	A	.	A	.	A	.	G	.	.	G	.	.	C	C	.	T	.	T	.	T	
	186	192	195	198	201	204	216	219	222	225	228	234	237	240	247	250	258	261	264	267	273	276	279	285	288	291	294	303	306	309	315	327	330	333	336	339	349	351	354	357	360	363			
A	T	A	A	T	A	A	A	G	T	A	T	T	A	T	T	T	T	T	C	A	G	C	C	G	A	A	G	C	T	T	A	A	T	T	C	T	C	G	A	T	T	T			
B	C	.	G	.	C	G	.	T	C	C	.	G	A	.	.	T	T	T	G	T	A	T	.	A	T	T	.	.	T	.	T	A	.	.	G	.			
C	.	G	C	.	.	G	A	.	G	C	C	.	A	.	A	T	G	A	G	.	A	.	C	A	T	.	.	G	A	T	A	T	.	C	G	.			
D	C	G	.	G	C	C	.	G	.	T	.	.	G	.	T	
E	G	A	
F	C	C	C	.	C	C	.	G	.	T	T	A	.	G	.	T	.	.	.	C	.	T	C	
P	C	.	.	.	G	.	T	C	.	C	A	A	A	.	A	T	T	A	.	A	T	.	A	T	.	C	T	G	.	A	T	.	T	A	.	C	.	A		
	364	366	369	370	372	375	378	381	384	402	417	429	432	438	441	444	447	450	453	456	459	462	468	489	496	498	502	504	507	516	519	520	525	528	531	541	546	555	558	561	564	567	570		
A	C	C	T	C	G	A	A	A	T	C	A	A	A	T	T	A	T	A	A	C	T	G	C	T	T	G	C	G	G	A	G	T	T	C	T	C	A	A	C	T	T	C	T		
B	.	.	T	A	.	T	.	T	G	C	.	A	T	.	A	T	A	C	A	T	A	.	T	.	.	T	C	T	G	T	T	C	C	
C	T	A	C	T	A	T	.	C	T	T	.	A	.	G	A	.	T	.	.	T	G	.	T	G	.	A	T	A	A	T	A	C	A	A	.	T	.	T	.	T	C	.	T	C	
D	G	.	T	.	.	C	.	.	G	.	T	A	.	.	.	A	.	.	A	T
E	.	.	.	A	.	G
F	G	.	T	.	.	.	C	T	A	T	.	T	C	
P	.	T	C	.	.	T	.	T	.	G	T	.	.	.	G	G	T	A	C	T	A	.	A	.	.	A	T	A	.	T	A	.	T	.	T	.	T	T	

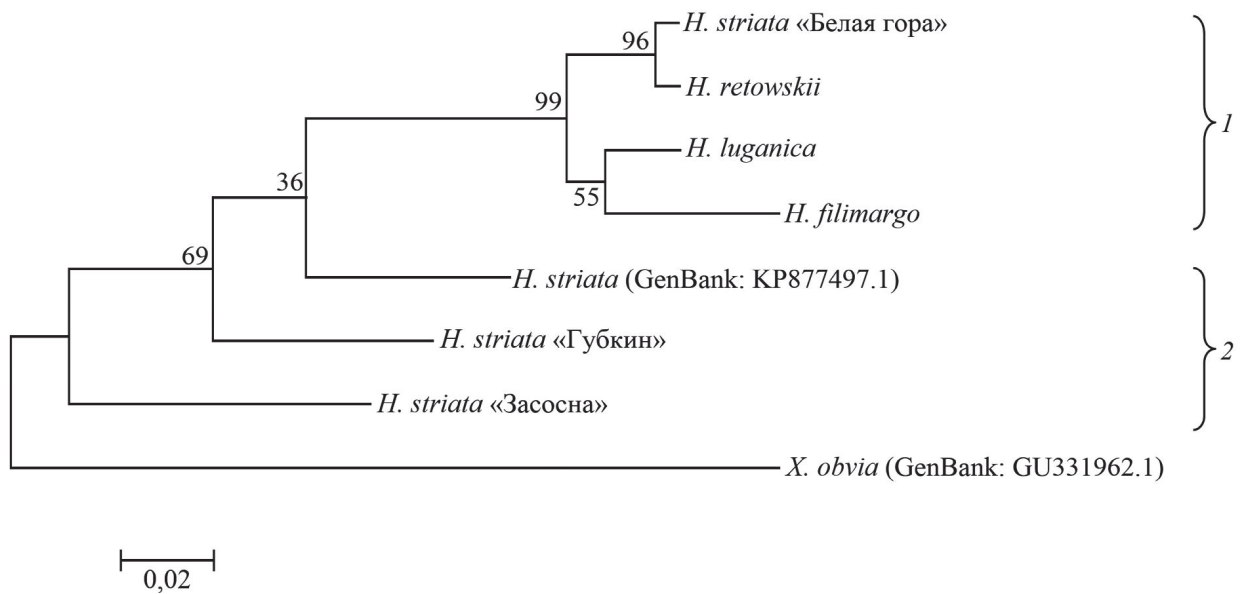


РИС. 11. Филограмма *Helicopsis* spp., построенная по сиквенсам участка гена COI (Метод ML. Проанализировано 576 позиций).

FIG. 11. Filogramm of *Helicopsis* spp. built on sequences of partial COI gene (Maximum likelihood method. There were a total of 576 positions in the final dataset).

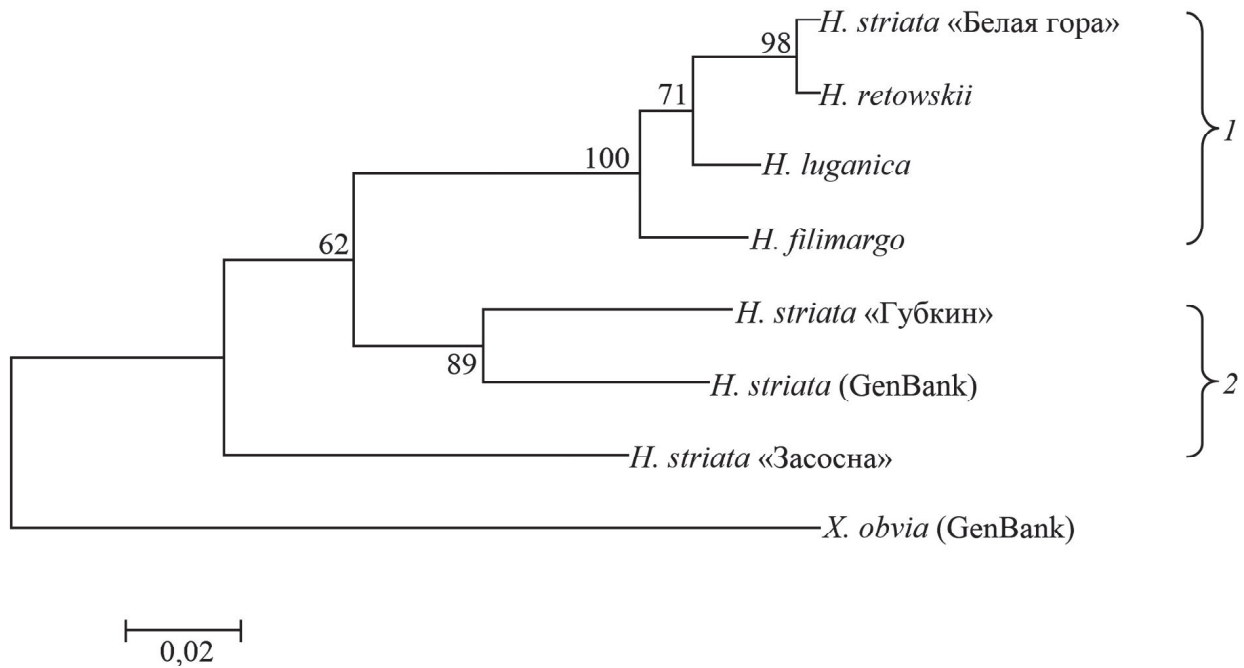


РИС. 12. Филограмма *Helicopsis* spp., построенная по объединенным последовательностям участков генов COI и 16S рДНК (Метод ML. Проанализировано 1011 позиций).

FIG. 12. Filogramm of *Helicopsis* spp. built on the combined of partial sequences of COI and 16S rDNA genes (Maximum likelihood method. There were a total of 1011 positions in the final dataset).

Чешской Республики. Оценка попарных генетических расстояний между популяциями *Helicopsis* spp. по объединенным последовательностям участков митохондриальных генов 16S рДНК и COI представлена в Табл. 9.

Обсуждение

На основании полученных данных можно констатировать, что по некоторым конхиологическим параметрам уровень различия между отдельными популяциями *H. striata* может соответствовать различиям между разными видами *Helicopsis*. Данный факт свидетельствует о том, что на территории юга Среднерусской возвышенности, вероятно, присутствует комплекс видов этого рода. Ранее было установлено, что у видов рода *Helicopsis* конхиологические признаки подвержены сильной изменчивости [Гураль-Сверлова, 2012]. Так, у *H. retowskii* размер раковины, степень развития кила и ребрышек сильно варьируют в зависимости от условий среды [Шилейко, 1978; Гураль-Сверлова, 2012]. Кроме того, рассчитанное нами среднее значение *CD* для пары *H. striata* «Белая гора» и *X. obvia* (вид из другого рода) не превышает порогового значения для подвидов и составляет $1,31 \pm 0,33$. Поэтому отмеченные выше различия по конхиологическим признакам у *H. striata*, вероятно, не могут указывать на таксономический статус его популяций.

Анализ морфологических признаков половой системы подтверждает сделанные ранее выводы [Гураль-Сверлова, 2010, 2012] о значительной внутривидовой изменчивости различных отделов половой системы у *Helicopsis* spp., которая может перекрывать различия между видами. В этой связи полагаем, что особенности строения половой системы, как и признаки раковины, не могут быть использованы в качестве надежного критерия при разделении близкородственных видов данного рода. При этом стоит отметить, что аналогичные выводы получены и при анализе видового разнообразия других изменчивых групп наземных моллюсков [Murray, Clarke, 1968, 1980; Teshima *et al.*, 2003; Fiorentino *et al.*, 2008a, 2008b; Stankowski, 2011; Hirano *et al.*, 2014]. Это, в свою очередь, указывает на недостаточность морфологического подхода в систематике спорных таксонов моллюсков, и на необходимость использования в таких работах генетических маркеров.

Однако использование молекулярно-генетических технологий требует определенной доли осторожности и выбора наиболее адекватных для таксономии методов. Так, например, уровень генетических отличий по исследованным ISSR-фрагментам между разными популяциями *H. striata* оказался выше, чем между другими представителями рода *Helicopsis* и *X. obvia*. Этот факт говорит о слабой применимости использо-

Табл. 9. Генетические расстояния между видами и их стандартные ошибки на основании анализа объединенных последовательностей митохондриальных генов (соответственно под и над диагональю) (*A* – *H. striata* «Белая гора»; *B* – *H. striata* «Губкин»; *C* – *H. striata* «Засосна»; *D* – *H. luganica*; *E* – *H. filimargo*; *F* – *H. retowskii*; *G* – *X. obvia*; *P* – популяция *H. striata* из г. Прага, Чешская Республика)

Table 9. Genetic distances between species and their standard error on the basis of the analysis the combined mitochondrial genes sequences (respectively under and above the diagonal) (*A* – *H. striata* "White mountain"; *B* – *H. striata* "Gubkin"; *C* – *H. striata* "Zasosna"; *D* – *H. luganica*; *E* – *H. filimargo*; *F* – *H. retowskii*; *G* – *X. obvia*; *P* – population of *H. striata* from Prague, Czech Republic)

ВИД	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>P</i>
<i>A</i>		0,037	0,043	0,01	0,014	0,003	0,084	0,033
<i>B</i>	0,062		0,040	0,037	0,037	0,036	0,089	0,024
<i>C</i>	0,071	0,065		0,045	0,044	0,043	0,092	0,044
<i>D</i>	0,016	0,062	0,073		0,012	0,010	0,083	0,032
<i>E</i>	0,024	0,062	0,071	0,019		0,014	0,084	0,033
<i>F</i>	0,004	0,061	0,070	0,016	0,024		0,084	0,033
<i>G</i>	0,120	0,120	0,125	0,119	0,119	0,118		0,081
<i>P</i>	0,056	0,040	0,072	0,054	0,056	0,056	0,113	

ванных *ISSR*-локусов для таксономического анализа видов рода *Helicopsis* (вероятно из-за большой внутривидовой изменчивости). Полагаем, что данный метод более приемлем для изучения популяционной структуры видов, таксономическое положение которых не вызывает сомнений. В то же время чрезмерно консервативные генетические маркеры, такие как 18S рДНК, также неинформативны на видовом уровне и могут быть задействованы при разделении таксонов начиная с рода.

Результаты филогенетического анализа, как по отдельным митохондриальным генам (Рис. 10 и 11), так и по объединенным последовательностям (Рис. 12), а также сравнения попарных генетических расстояний между популяциями исследованных видов (Табл. 9), показывают, что популяция «Белая гора» значительно дистанцируется от других популяций *H. striata* из различных пунктов его ареала и имеет большое генетическое сходство с крымским видом *H. retowskii*. В силу полученных данных можно констатировать, что популяция «Белая гора» не принадлежит *H. striata*, а относится к *H. retowskii* или близкому к нему виду. Стоит отметить, что ранее было выдвинуто предположение, согласно которому *H. retowskii* может обитать и в бассейне реки Северский Донец [Гураль-Сверлова, 2010]. Поэтому вполне возможно, что популяция «Белая гора», обитающая в верховьях указанной реки, является изолированной группой *H. retowskii*.

С другой стороны, видовое разнообразие моллюсков рода *Helicopsis* на территории бассейна Северского Донца и северного Приазовья изучено не полностью и вызывает определенные воп-

росы. Так, Н.В. Гураль-Сверловой [2010] в этом районе обнаружен *H. dejecta*, а также вместе с *H. luganica* описаны новые виды *H. subfilimargo* и *H. martynovi*. Однако, как указывает И.А. Балашёв [2016], есть основания полагать, что вида *H. dejecta* в действительности не существует, а *H. subfilimargo*, *H. luganica* и *H. martynovi* могут быть формами какого-то одного вида. Сложности в систематике *Helicopsis* spp., а также отсутствие генетических данных по указанным моллюскам не позволяет нам в настоящей работе более точно определить видовую принадлежность популяции «Белая гора», а также подтвердить таксономический статус *H. luganica*.

Нельзя исключать и того, что четыре близкородственных вида, попавшие в один кластер (*H. retowskii*, *H. filimargo*, *H. luganica*, популяция *Helicopsis* sp. «Белая гора») и дистанцировавшиеся от *H. striata*, могут принадлежать либо к одному виду, либо к группе близкородственных видов, заслуживающих статуса подрода. Однако, обоснованный ответ на этот вопрос возможен лишь при исследовании большего числа популяций этих моллюсков.

Стоит отметить еще одно обстоятельство, согласно которому степень генетических отличий между популяциями, которые по особенностям морфологии и экологии можно отнести к *H. striata* («Засосна», «Губкин», а также популяции из Чешской Республики), оказалась выше, чем между видами *H. retowskii* и *H. filimargo*. Это также, с одной стороны, подтверждает взаимную близость последних видов, а, с другой стороны, указывает на значительную генетическую дифференциацию популяций *H. striata* не толь-

ко на протяжении всего его ареала, но и, более локально, в пределах юга Среднерусской возвышенности. Это, вероятно, связано с биотопической разнородностью и фрагментарностью ареала этого моллюска в условиях лесостепного ландшафта.

Заключение

Таким образом, полученный материал показывает, что таксономическая ревизия *Helicopsis* spp. должна проводиться по комплексу экологических и морфо-генетических параметров. Установлено, что на территории юга Среднерусской возвышенности присутствует не только западноевропейский вид *H. striata*, но и другой вид этого рода, близкий представителям крымской фауны. Однако для установления его видовой принадлежности необходимо провести таксономическую ревизию *Helicopsis* spp. всего бассейна Северского Донца и северного Приазовья с привлечением большего количества популяций. Тем не менее, выявленная политипичность рода *Helicopsis* указывает на присутствие в данном районе одного из центров его морфогенетического разнообразия.

Благодарности

Авторы работы выражают искреннюю признательность к.б.н. И.А. Балашёву (Институт Зоологии им. И.И. Шмальгаузена НАН Украины) за предоставленные материалы и консультацию.

Литература

- Балашёв И.А. 2012. Охрана наземных моллюсков Украины: состояние, проблемы, перспективы. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія*, 2(51): 24–32.
- Балашёв И.А. 2016. *Охрана наземных моллюсков Украины*. Киев, 272 с.
- Гураль-Сверлова Н.В. 2010. Обзор наземных моллюсков рода *Helicopsis* (Hygromiidae) Донецкой возвышенности и прилегающих территорий с описанием новых видов. *Ruthenica, Russian Malacological Journal*, 20(1): 13–26.
- Гураль-Сверлова Н.В. 2012. Предварительные результаты анатомического исследования моллюсков рода *Helicopsis* (Hygromiidae) Крыма и Причерноморской низменности. *Ruthenica, Russian Malacological Journal*, 22(1): 15–34.
- Крамаренко С.С. 1996. Новые данные о межпопуляционной изменчивости половой системы наземных моллюсков *Brephulopsis cylindrica* (Gastropoda; Buliminidae) Крыма. *Зоологический журнал*, 75(9): 1430–1433.
- Лихарев И.М., Раммельмейер Е.С. 1952. *Наземные моллюски фауны СССР*. Москва-Ленинград, АН СССР, 512 с.
- Майр Э., Линсли Э., Юзингер Р. 1956. *Методы и принципы зоологической систематики*. Москва, Государственное издательство иностранной литературы, 352 с.
- Мордкович В.Г. 1982. *Степные экосистемы*. Новосибирск, Наука, 205 с.
- Снегин Э.А. 2012. *Пространственные и временные аспекты эколого-генетической структуры популяций беспозвоночных животных (на примере наземных моллюсков и насекомых юга Среднерусской возвышенности)*. Автореф. дисс. доктора биол. наук. Белгород, 41 с.
- Снегин Э.А., Сычёв А.А. 2011. Оценка жизнеспособности популяций особо охраняемого вида *Helicopsis striata* Müller (Mollusca, Gastropoda: Pulmonata) в условиях юга Среднерусской возвышенности. *Теоретическая и прикладная экология*, 2: 83–92.
- Сычёв А.А., Снегин Э.А. 2014. Плодовитость и эффективная численность популяций *Helicopsis striata* Müller (Gastropoda, Pulmonata, Helicoidea) на территории юга Среднерусской возвышенности. *Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки*, 194(29): 76–83.
- Сычёв А.А., Снегин Э.А. 2015. Новые сведения об охраняемых видах ксерофильных моллюсков Белгородской области. *Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки*, 206(31): 59–65.
- Сычёв А.А., Снегин Э.А. 2016. Микропространственная структура популяционных генофондов наземного моллюска *Helicopsis striata* (Pulmonata, Hygromiidae) в условиях юга Среднерусской возвышенности. *Экологическая генетика*, 14(2): 28–38.
- Шилейко А.А. 1978. Наземные моллюски надсемейства Helicoidea. *Фауна СССР, Моллюски*. 3(6). Ленинград, Наука: 1-384.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, 131: 479–491.
- Dinapoli A., Zinssmeister C., Klussmann-Kolb A. 2011. New insights into the phylogeny of the Pyramidellidae (Gastropoda). *Journal of Molluscan Studies*, 77: 1–7.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Fiorentino V., Manganelli G., Giusti F. 2008a. Multiple scale patterns of shell and anatomy variability in land snails: the case of the Sicilian *Marmorana* (Gastropoda: Pulmonata, Helicidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 93: 359–370.
- Fiorentino V., Salomone N., Manganelli G., Giusti F. 2008b. Phylogeography and morphological variability in land snails: the Sicilian *Marmorana* (Pulmonata, Helicidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 94: 809–823.
- Folmer O., Black M., Heah W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3: 294–299.
- Hirano T., Kameda Y., Chiba S. 2014. Phylogeny of the land snails *Bradybaena* and *Phaeohelix* (Pulmonata)

- ta: Bradybaenidae) in Japan. *Journal of Molluscan studies*, 80: 177–183.
- Korabek O., Jurickova L., Lozek V. 2015. History of two critically endangered grassland snails (Pulmonata, Helicellinae) in the Czech Republic with molecular data on extinct populations. *Biologia*, 70(8): 1102–1107.
- Mathew C.G. 1984. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. *Nucleic Acids*, 2: 31–34.
- Murray J, Clarke B. 1968. Partial reproductive isolation in the genus *Partula* (Gastropoda) on Moorea. *Evolution*, 22: 684–698.
- Murray J, Clarke B. 1980. The genus *Partula* on Moorea: speciation in progress. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 211: 83–117.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.
- Osselaer V.C., Tursch B. 2000. Variability of the genital system of *Helix pomatia* L., 1758 and *H. lucorum* L., 1758 (Gastropoda: Stylommatophora). *Journal of Molluscan Studies*, 66: 499–515.
- Palumbi, S. 1996. Nucleic Acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis D., Moritz C., Mable B.K. (Eds): *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland (MA): 205–247.
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406–425.
- Steinke D., Albrecht C., Pfenninger M. 2004. Molecular phylogeny and character evolution in the Western Palearctic Helicidae. I. (Gastropoda: Stylommatophora). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 724–734.
- Stankowski S. 2011. Extreme, continuous variation in an island snail: local diversification and association of shell form with the current environment. *Biological Journal of the Linnean Society*, 104(4): 756–769.
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512–526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.
- Teshima H., Davison A., Kuwahara Y., Yokoyama J., Chiba S., Fukuda T., Ogimura H., Kawata M. 2003. The evolution of extreme shell shape variation in the land snail *Ainohelix editha*: a phylogeny and hybrid zone analysis. *Molecular Ecology*, 12: 1869–1878.
- Winnepeninckx B., Backeljau T., de Wachter R. 1994. Small ribosomal subunit RNA and the phylogeny of Mollusca. *Nautilus*, 108 (Suppl. 2): 98–110.

РЕЗЮМЕ. В работе показана высокая внутри- и межвидовая изменчивость конхиологических признаков, особенностей строения полового аппарата, а также *ISSR*-маркеров ДНК у степных улиток *Helicopsis* spp. (Pulmonata; Hygromiidae), что накладывает определенные ограничения на использование этих показателей для установления видовой принадлежности особей. Поэтому данные параметры были дополнены результатами секвенирования консервативных последовательностей ядерных и митохондриальных генов (18S рДНК, 16S рДНК и COI), имеющих хороший таксономический сигнал, что позволило увеличить достоверность филогенетических построений. Установлено, что на территории юга Среднерусской возвышенности наряду с западноевропейским видом *Helicopsis striata* обитает ранее неизвестный *Helicopsis* sp., близкий к крымской группе видов этого рода. При этом показано, что темпы эволюции митохондриальных генов у различных видов рода *Helicopsis* отличаются, принимая наибольшее значение для таксонов с протяженными видовыми ареалами.

