

Изменчивость микросателлитных маркеров у степных моллюсков рода *Helicopsis* (Gastropoda; Pulmonata) в условиях юга Среднерусской возвышенности

Антон А. СЫЧЕВ¹, Эдуард А. СНЕГИН

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
г. Белгород, 308015, РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

¹ Автор-корреспондент, E-mail: sychev@bsuedu.ru

РЕЗЮМЕ. Улитки рода *Helicopsis* относятся к степным видам, многие из которых занесены в охранные списки стран Европы. В настоящей работе по результатам секвенирования митохондриального гена COX1 установлена видовая принадлежность особей из восьми местообитаний улиток из рода *Helicopsis*, обитающих на территории юга Среднерусской возвышенности. Нами идентифицированы виды *H. lunulata*, *H. filimargo* и *H. hungarica*, а среднее генетическое расстояние между ними оказалось равным $0,11 \pm 0,01$. Далее проведен анализ изменчивости семи микросателлитных (STR) локусов, разработанных нами для *H. lunulata*, в одной популяции *H. filimargo*, одной популяции *H. hungarica* и пяти популяциях *H. lunulata* юга Среднерусской возвышенности. Выявлены как универсальные для всех исследованных видов локусы, так специфичные только для *H. lunulata*. У *H. lunulata* шесть STR-локусов оказались полиморфными и имели от 2 до 11 аллелей на локус. Всего по всем локусам у *H. lunulata* удалось выявить 28 аллелей, 14 из которых оказались приватными и не встречались более чем в одной популяции. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) подтвердил высокую генетическую дифференциацию популяций *H. lunulata* ($F_{st} = 0,425$). При этом генетическое разнообразие *H. lunulata* района исследования на основе STR-локусов оказалась более высоким, чем в случае использования изоферментных локусов. А структура генетической изменчивости, рассчитанная на основе STR-локусов, оказалась менее выраженной по сравнению с использованием в качестве генетических маркеров изоферментных локусов ($F_{st} = 0,700$). Все это подтверждает большую селективную нейтральность и большее разнообразие микросателлитных локусов, по сравнению с изоферментами. Полученные данные можно использовать для оценки генетического разнообразия популяций *H. lunulata*.

[https://doi.org/10.35885/ruthenica.2025.35\(3\).4](https://doi.org/10.35885/ruthenica.2025.35(3).4)

Variability of microsatellite markers in *Helicopsis* (Gastropoda; Pulmonata) steppe mollusks in the southern Central Russian upland

Anton A. SYCHEV¹, Eduard A. SNEGIN

Belgorod State National Research University, Belgorod,
308015, RUSSIAN FEDERATION

¹ Corresponding author, E-mail sychev@bsuedu.ru

ABSTRACT. The snails of the genus *Helicopsis* belong to steppe species, many of which are listed in the protected lists of European countries. In this work, based on the sequencing of the COX1 mitochondrial gene, the species belonging to eight populations of snails from the genus *Helicopsis* living in the south of the Central Russian Upland have been identified. These populations were assigned to *H. lunulata*, *H. filimargo*, and *H. hungarica*, and the average genetic distance between them was 0.11 ± 0.01 . Next, we analyzed the variability of seven microsatellite (STR) loci developed by us for *H. lunulata* in one population of

H. filimargo, one population of *H. hungarica* and five populations of *H. lunulata* in the south of the Central Russian Upland. Both loci specific to *H. lunulata* and universal for all studied species have been identified. In *H. lunulata*, six STR loci turned out to be polymorphic and had from 2 to 11 alleles per locus. A total of 28 alleles were identified at all loci in *H. lunulata*, 14 of which were private and did not occur in more than one population. Molecular Dispersion Analysis (AMOVA) confirmed the high genetic differentiation of *H. lunulata* populations ($F_{st} = 0,425$). At the same time, the genetic diversity of *H. lunulata* in the study area based on STR loci turned out to be higher than in the case of using allozyme loci. The structure of genetic variability calculated on the basis of STR loci turned out to be less pronounced compared to the use of allozyme loci as genetic markers ($F_{st} = 0,700$). All this confirms the greater selective neutrality and greater diversity of microsatellite loci compared to allozymes. The data obtained can be used to assess the genetic diversity of *H. lunulata* populations.

Введение

Наземные моллюски рода *Helicopsis* являются степными видами, распространенными в центральной и восточной Европе, Закавказье, Малой и Средней Азии до Копетдага [Shileyko, 1978; Balashov, 2016]. Значительная часть представителей этого рода в связи с исчезновением целинных степей находится в уязвимом состоянии и занесена в региональные и международные охранные списки стран Европы [IUCN, 2024]. При этом систематическое положение многих моллюсков рода *Helicopsis* до конца не установлено и в настоящее время проводятся работы по их таксономической ревизии [Gural-Sverlova, 2010; Sychev, Snegin, 2016; Duda *et al.*, 2018; Balashov *et al.*, 2021]. Так, согласно полученным данным, на территории юга Среднерусской возвышенности вместо ранее описанного вида *Helicopsis striata* (Müller, 1774), занесенного в Красные книги Белгородской и Воронежской областей [Red Data Book..., 2019], обитают несколько разных видов из рода *Helicopsis* [Sychev, Snegin, 2016; Balashov *et al.*, 2021]. На основе анализа секвенирования митохондриальных генов и данных AFLP-анализа было высказано предположение, что на указанной территории обитают три вида *H. filimargo* (Krynicky, 1833), *H. hungarica* (Soos & Wagner, 1935) и *H. lunulata* (Krynicky, 1833). При этом по изменчивости морфологических и молекулярно-генетических признаков, особенностям экологии, на территории юга Среднерусской возвышенности ареалы данных видов не перекрываются и в одном локалитете встречаются особи только одного вида [Sychev, Snegin, 2016; Sychev, 2017]. Таким образом, уязвимый статус и сложность таксономической идентификации моллюсков рода *Helicopsis*, отражают актуальность исследования данных видов, в том числе на популяционно-генетическом уровне. В данном аспекте особую роль играет разработка молекулярно-генетических маркеров для оценки уровней внутривидового и межвидового генетического разнообразия и дифференциации *Helicopsis*. В течение длительного времени оценку генетического разнообразия проводили с помощью изоферментных локусов, RAPD- и ISSR-маркеров ДНК. Данные методы имеют как свои преимущества, так и недостатки. Так, большим преимуществом изоферментов является кодоминантный тип наследования и относительная нейтральность аминокислотных замен в них. По этим группам генетических маркеров был накоплен большой объем данных [Snegin, 2015; Sychev, 2017]. Однако анализ аллозимов является достаточно трудоемким. Кроме того, в этом методе анализируются не сами гены, а продукты их экспрессии, проявление которых может отчасти зависеть от внешних факторов

[Doichinov *et al.*, 2015]. RAPD- и ISSR-маркеры позволяют работать непосредственно с ДНК [Snegin, 2017], но характеризуются доминантным типом наследования, в связи с чем в процессе популяционно-генетического анализа теряется много информации, в частности, частоты гетерозигот носят только ожидаемый характер. При этом данные методы часто не видоспецифичны и плохо воспроизводимы. В течение последних десятилетий одними из наиболее широко используемых генетических маркеров стали микросателлитные (STR) локусы [Tautz, 1989; Abdul-Muneer, 2014]. Они представляют из себя повторы мотивов из 2, 3, 4 и более нуклеотидов. При этом данные повторы, как правило, по флангам имеют уникальные последовательности ДНК, к которым можно подобрать специфичные праймеры для последующей амплификации и анализа микросателлитного локуса. Такие микросателлитные или STR-маркеры характеризуются высокой изменчивостью, воспроизводимостью, кодоминантным типом наследования, и, что немаловажно, они часто видоспецифичны [Krapal *et al.*, 2016; Yamamoto *et al.*, 2018; Nishida *et al.*, 2022]. Кроме того, возможно проведение мультиплексных ПЦР, в результате которых в одной пробирке одновременно анализируются несколько различных STR-маркеров, что существенно экономит временные и материальные ресурсы.

Целью настоящей работы является анализ видоспецифичности впервые описанных нами STR-маркеров для моллюсков рода *Helicopsis*, а также популяционно-генетический анализ *H. lunulata* юга Среднерусской возвышенности.

Материалы и методы

Всего нами исследовано 143 моллюска из рода *Helicopsis*, собранных в восьми локалитетах на территории юга Среднерусской возвышенности. Установление видовой принадлежности особей *Helicopsis* проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена COX1, полученных нами методом Сенгера и задепонированных в GenBank (Табл. 1). Для этого осуществляли выделение тотальной ДНК из тканей мантии набором «ДНК-Экстран-2» (Синтол, Россия). Далее проводили амплификацию фрагментов гена COX1 с помощью универсальных праймеров LCO1490: 5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3' и HC02198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAA AATCA-3' [Folmer *et al.*, 1994], очистку целевых ампликонов с помощью набора CleanUp Standard (Евроген, Россия), сиквенсовую реакцию с прямого и обратного праймеров с помощью набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Sequencing kit (Applied Biosystems, США) согласно протоколу.

Табл. 1. Пункты сбора материалов *Helicopsis* spp.Table 1. *Helicopsis* spp. materials collection points.

№	Локалитет	Вид	Координаты	GenBank, ID	N
1.	«Ливенка»	<i>Helicopsis lunulata</i>	50.463112°N, 38.251801°E	PQ932566	1
2.	«Осадчее»	<i>Helicopsis lunulata</i>	50.351807°N, 38.937335°E	PQ932567	18
3.	«Засосна»	<i>Helicopsis lunulata</i>	50.629086°N, 38.416745°E	PQ932568	24
4.	«Верхние Лубянки»	<i>Helicopsis lunulata</i>	50.452115°N, 37.736558°E	PQ932569	16
5.	«Новая Безгинка»	<i>Helicopsis lunulata</i>	50.892483°N, 38.095592°E	PQ932570	20
6.	«Калужный яр»	<i>Helicopsis lunulata</i>	49.950585°N, 38.898371°E	PQ932571	21
7.	«Белая гора»	<i>Helicopsis filimargo</i>	50.624591°N, 36.621052°E	PQ932572	21
8.	«Телешовка»	<i>Helicopsis hungarica</i>	51.039340°N, 37.284891°E	PQ932573	22

Секвенирование проводили на генетическом анализаторе ABI3500 (Applied Biosystems). Полученные данные обрабатывали в программах Sequencing Analysis Software 6 (Applied Biosystems), BioEdit v. 7.1.3.0 [Hall *et al.*, 1999], выравнивание прямых и обратных сиквенсов проводили в программе MEGA6 v. 10.2.6 [Kumar *et al.*, 2018]. Всего из каждого локалитета было отсеквенировано по одной особи. При этом для филогенетического анализа из GenBank нами использованы последовательности гена COX1 других видов рода *Helicopsis*, а также *Xerolenta obvia* в качестве внешнего контроля [Sychev, Snegin, 2016; Hausdorf, Bössneck, 2016; Duda *et al.*, 2018; Balashov *et al.*, 2021]. Таким образом, всего в анализ было вовлечено 17 последовательностей гена COX1. Оценку попарных генетических расстояний и построение филогенетического дерева *Helicopsis* проводили методом максимального правдоподобия на основе модели Тамуры-Нея в программе MEGA 6 [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 бутстреп-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.

Для поиска микросателлитных локусов была выбрана особь из локалитета «Ливенка» бассейна реки Оскол (Табл. 1). Далее проводили амплификацию фрагментов ДНК, богатых микросателлитными повторами [Van der Nest *et al.*, 2000], с помощью ISSR-праймера *UBC807* (AG)₈T и RAPD-праймера *OPA10* (5'-GTGATCGCAG-3') на амплификаторе Veriti (Applied Biosystems,

США). После этого анализировали продукты амплификации с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле и вырезали фрагменты геля с ампликонами размером от 500 до 1300 п.о., проводили их очистку с помощью набора CleanUp Standard. Очищенные фрагменты ДНК клонировали в вектор pAL2-T (Евроген), после чего трансформировали *Escherichia coli* XL-1 Blue. Далее проводили ПЦР-скрининг проросших клонов с помощью праймеров M13 Forward 5'-GTTGTAACGACGGCCAGTG-3' и M13 Reverse 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'. Выделение плазмидной ДНК из положительных клонов проводили с использованием наборов Plasmid MiniPrep (Евроген). Каждую полученную плазмиду секвенировали с помощью праймеров M13 Forward или M13 Reverse методом Сенгера.

Далее к уникальным последовательностям, фланкирующим микросателлитные локусы, были подобраны праймеры для ПЦР. Дизайн праймеров проводили в онлайн-сервисе OligoAnalyzer IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>). Проверку качества праймеров осуществляли в программе Primer Pooler v1.84 [Brown *et al.*, 2017]. При этом прямые праймеры проектировали с флуоресцентными красителями ROX, TAMRA, R6G или FAM с целью проведения фрагментного анализа и автоматизации процесса генотипирования улиток. Синтез спроектированных праймеров проводили в компании «СИНТОЛ» (Россия). Для амплификации микросателлитных локусов реакционная смесь включала 0,25мМ dNTP, 3мМ MgCl₂, 1 ед SynTaq T⁺ ДНК-полимеразы и буфер, по 2,5 пмоль прямого и обратного праймера, 50 нг геномной ДНК. Протокол амплификации: 94°C – 3 мин, 4 цикла [98°C – 30 с, 61°C – 2 мин, 72°C – 1 мин 30 с], 6 циклов [94°C – 30 с, 61°C – 2 мин, 72°C – 1 мин 30 с], 22 цикла [90°C – 30 с, 61°C – 2 мин, 72°C – 1 мин 15 с], 68°C – 20 мин.

Фрагментный анализ ПЦР-продуктов проводили на генетическом анализаторе НАНОФОР-05 (ИАП РАН). Для оценки аллельного разнообразия выявленных микросателлитных локусов и проведения на их основе популяционно-генетиче-

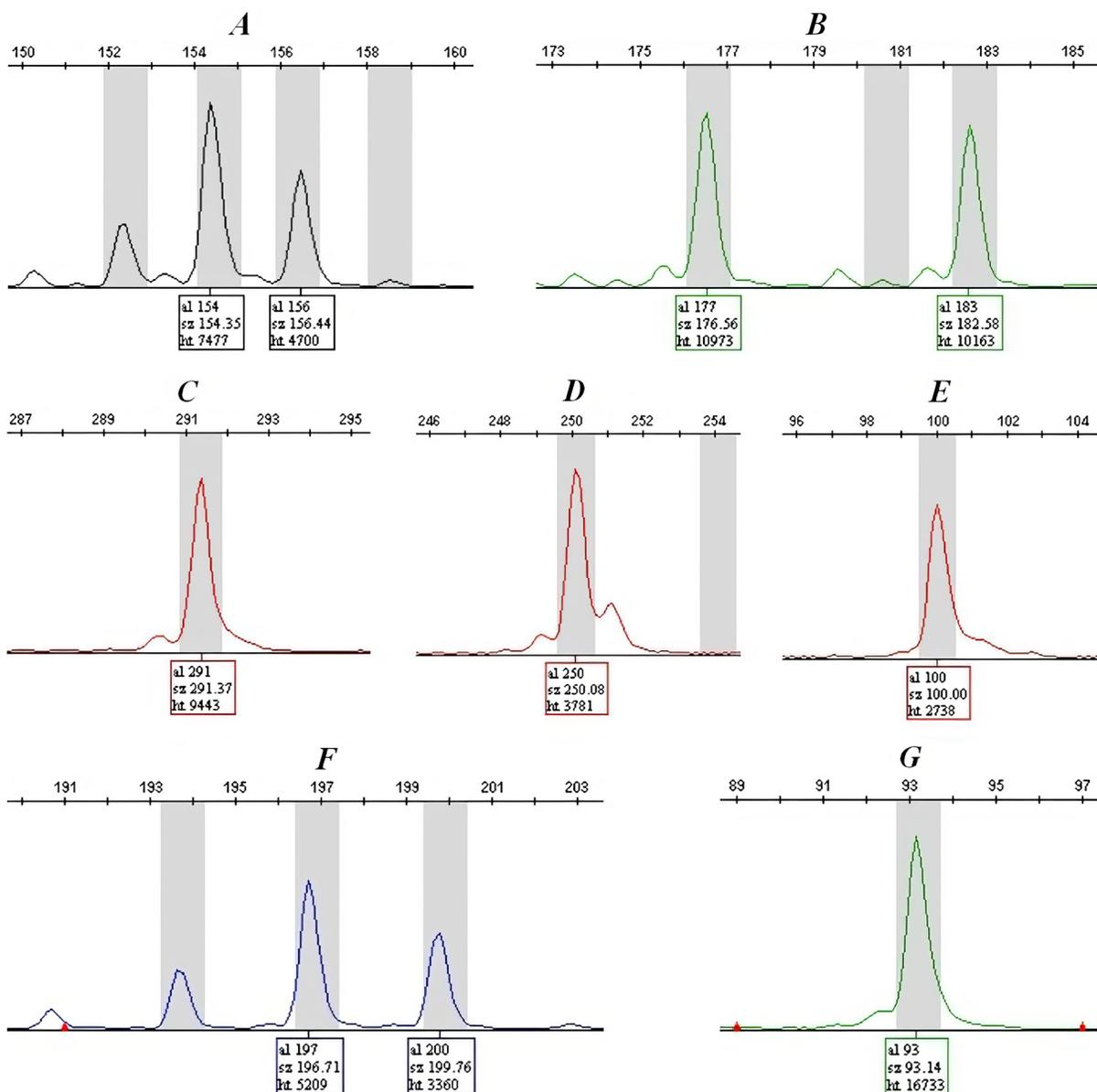


РИС. 1. Результат фрагментного анализа *Helicopsis* sp. по микросателлитным маркерам. А – Hel_7 (аллели 154 и 156), В – Hel_17 (аллели 177 и 183), С – Hel_5 (аллель 291), D – Hel_13 (аллель 250), Е – Hel_24 (аллель 100), F – Hel_18 (аллели 197 и 200), G – Hel_80 (аллель 93).

FIG. 1. The result of the fragmentary analysis of *Helicopsis* sp. by microsatellite markers. A – Hel_7 (alleles 154 and 156), B – Hel_17 (alleles 177 and 183), C – Hel_5 (allele 291), D – Hel_13 (allele 250), E – Hel_24 (allele 100), F – Hel_18 (alleles 197 and 200), G – Hel_80 (allele 93).

ского анализа моллюсков рода *Helicopsis* нами было собрано 142 особи из локалитетов юга Среднерусской возвышенности: «Осадчее», «Засосна», «Верхние Лубянки», «Новая Безгинка», «Калужный яр», «Белая гора», «Телешовка» (Табл. 1). Анализ полученных микросателлитных профилей проводили в программе Gene Mapper Software v4.1 (Applied Biosystems) (Рис. 1).

Программное обеспечение GenAlEx 6.5 [Peakall, Smouse, 2006] использовалось для расчета стандартных индексов разнообразия и оценки неравновесия Харди-Вайнберга (HWE) с использованием параметров по умолчанию.

Результаты и их обсуждение

На основе ранее проведенного анализа результатов секвенирования митохондриальных генов [Sychev, Snegin, 2016; Balashov *et al.*, 2021], особи *Helicopsis* из местообитаний «Засосна», «Белая гора» и «Телешовка» были отнесены соответственно к видам *H. lunulata*, *H. filimargo* и *H. hungarica*. По результатам проведенного нами филогенетического анализа на основе сиквенсов гена COXI у *Helicopsis* из 16 локалитетов восточной Европы данные виды формируют отдельные кластеры (Рис. 2). При этом *H. striata* в

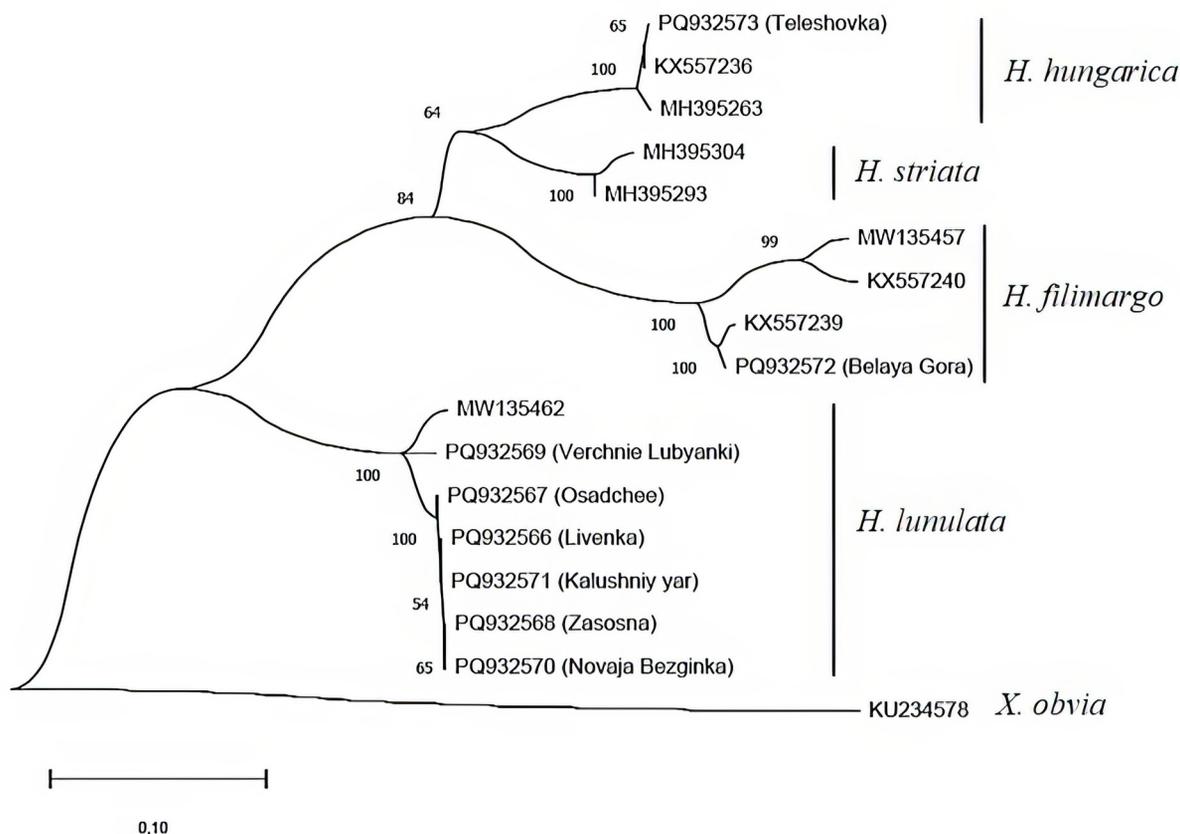


РИС. 2. Филограмма *Helicopsis* sp., построенная по методу максимального правдоподобия на основании сиквенсов фрагментов гена COX1.

FIG. 2. Maximum-likelihood phylogram of *Helicopsis* sp. based on sequences of the COX1 gene.

значительной степени дистанцируется от них и не встречается на территории юга Среднерусской возвышенности.

Средняя р-дистанция между видами *Helicopsis* составила $0,11 \pm 0,01$. Межвидовые попарные значения р-дистанций составляют $0,124-0,143$ для пары *H. lunulata* и *H. hungarica*, $0,141-0,166$ для пары *H. lunulata* и *H. filimargo*, и $0,127-0,152$ для пары *H. filimargo* и *H. hungarica*. В пределах каждого выделенного вида *Helicopsis* р-дистанции существенно ниже и составляют $0,002-0,011$ у *H. hungarica*, $0,000-0,034$ у *H. lunulata*, а также $0,011-0,074$ у *H. filimargo*. Особи из локалитетов «Ливенка», «Верхние Лубянки», «Новая Безгинка», «Калюжный яр», «Осадчее» имеют низкое генетическое расстояние с *H. lunulata* из местообитания «Засосна» ($0,000-0,028$), в связи с чем относятся к одному виду. Примечательно, что из всех исследованных местообитаний *H. lunulata* на юге Среднерусской возвышенности наиболее дистанцировавшейся оказалась особь из локалитета «Верхние Лубянки» (Табл. 2). В целом, полученные данные по COX1 согласуются с результатами ранее проведенного филогенетического анализа на основе митохондриальных

генов [Balashov *et al.*, 2021]. Кроме того, подтверждаются более высокие генетические расстояния между кладами *H. filimargo*, что требует дальнейшего исследования.

В результате проведенной работы по поиску микросателлитных локусов было получено 11 уникальных последовательностей геномной ДНК *H. lunulata*, из которых семь фрагментов содержали микросателлитные локусы с числом повторов мотива не менее четырех нуклеотидов [Sychev, Snegin, 2024]. Данные последовательно-

Табл. 2. Матрица попарных генетических дистанций Нея у *Helicopsis lunulata*.

Table 2. Pairwise population matrix of Nei genetic distance of *Helicopsis lunulata*.

Локалитет	1	2	3	4	5
1. «Осадчее»	0,000				
2. «Засосна»	0,062	0,000			
3. «Верхние Лубянки»	0,356	0,348	0,000		
4. «Новая Безгинка»	0,057	0,040	0,345	0,000	
5. «Калюжный яр»	0,087	0,017	0,406	0,075	0,000

Табл. 3. Последовательности праймеров для микросателлитных локусов *Helicopsis lunulata*.Table 3. Microsatellite loci primer sequences for *Helicopsis lunulata*.

Локус	Мотив	Последовательности праймеров (5'–3')	GenBank, No
Hel_5	[GTTGA] ₅	F: (ROX)AAAGAGAGTTCTCGTGGCTTTC R: ACAGGTTGGAGGAACAAATAGATC	PP993067
Hel_7	[TC] ₁₄	F: (TAMRA)CTCAGTGCCTTACTATCACTC R: AGACTGAGAATTACTAAGAGACAGC	PP993068
Hel_13	[GT] ₄ TTG TGC[GT] ₄	F: (ROX)CAGACATTATACATCCCCAGTTAG R: ATCATAGCATATAACTTAGCCTCTG	PP993069
Hel_17	[ATG] ₁₂	F: (R6G)GAGACGTTGGATGATCATAATGAG R: TAGAATCTAGCGTGAAGGTGTTAG	PP993070
Hel_18	[GTA] _n	F: (FAM)GTAGCAATAGTAGTAAAGCAGCAG R: TAACAGCTACTACTGCGGTTG	PP993071
Hel_24	[ACT] ₅	F: (ROX)GTTCTGTGATGTCGGTTCTTG R: TATCAGCAGCTGCCATATCAG	PP993072
Hel_80	[CA] ₄ [TA] ₄	F: (R6G)GTGATCGCAGAAGTAGTGCTC R: GCATATATTATAGCTCCGTGACCG	PP993073

Табл. 4. Характеристика микросателлитных локусов для *Helicopsis* sp.Table 4. Characteristics of *Helicopsis* sp. microsatellite loci.

Локус	<i>H. lunulata</i> (N=99)			<i>H. filimargo</i> (N=21)			<i>H. hungarica</i> (N=22)		
	size, bp	N _a	PHW	size, bp	N _a	PHW	size, bp	N _a	PHW
Hel_5	291–296	2	0,96	–	–	–	–	–	–
Hel_7	142–158	6	<u>0,00</u>	144–150	2*	<u>0,00</u>	150	1*	<u>0,00</u>
Hel_13	235–250	3	<u>0,00</u>	254–262	4*	<u>0,00</u>	238	1	M
Hel_17	176–182	3	0,99	202–260	3	0,64	180	1	M
Hel_18	197–310	11	<u>0,00</u>	213–261	3*	<u>0,00</u>	190	1	M
Hel_24	97–100	2	0,96	100	1*	<u>0,00</u>	100	1	M
Hel_80	93	1	M	–	–	–	–	–	–

Примечание: N_a – число аллелей, * – присутствуют ноль-аллели, PHW – значение P теста на равновесие Харди-Вайнберга (подчеркнуты достоверные отличия при P<0,05; M – мономорфный локус).

сти депонированы нами в базе данных GenBank NCBI под номерами PP993067–PP993073 (Табл. 3). По результатам фрагментного анализа по всем локусам у *H. lunulata* наблюдается амплификация целевых продуктов и получены однозначные генотипы. Установлено, что при рассмотрении пяти отдельных популяций *H. lunulata* частоты генотипов по всем полиморфным локусам находятся в состоянии равновесия Харди-Вайнберга. В то же время анализ всей совокупности особей этого вида как единой выборки выявляет достоверное отклонение от распределения Харди-Вайнберга для нескольких локусов (Табл. 4). Данное явление объясняется эффектом Валунда, возникающего вследствие дефицита гетерозигот в разнородных выборках, и может указывать на генетическую дифференциацию популяций *H. lunulata* района исследования [Gautier *et al.*, 2019]. Напротив, для *H. filimargo* и *H. hungarica* по локусам Hel_5 и Hel_80 полностью отсутствовала амплификация, в связи с чем их можно считать специфичными для *H. lunulata*.

По четырем локусам у отдельных особей *H. filimargo* наблюдается отсутствие амплификации. Вместе с отклонением в них частот генотипов от распределения Харди-Вайнберга это свидетельствует о наличии ноль-аллелей. Необходимо отметить, что одной из причин появления ноль-аллелей (отсутствия амплификации) являются изменения нуклеотидной последовательности ДНК в местах отжига праймеров [Wen *et al.*, 2013]. Примечательно, что у *H. hungarica* выявлен только один локус с присутствием ноль-аллеля. Напротив, по локусу Hel_17 наблюдается стабильная амплификация у всех исследованных видов, что может говорить о его универсальности для рода *Helicopsis*. Таким образом, ввиду видоспецифичности многих STR-маркеров, полученные данные подтверждают выводы филогенетического анализа о присутствии на территории Среднерусской возвышенности трех различных видов *Helicopsis*.

Дальнейший популяционно-генетический анализ проводили только для *H. lunulata* юга

Табл. 5. Показатели генетической изменчивости в популяциях *Helicopsis lunulata* на основе STR-локусов.Table 5. Indicators of genetic variability in *Helicopsis lunulata* populations based on STR loci.

Популяция	P, %	N_{au}/N_a	A_a	A_e	I	H_o	H_e	F
«Осадчее»	43	1/11	1,57±0,30	1,17±0,14	0,18±0,11	0,09±0,05	0,10±0,07	0,03±0,06
«Засосна»	43	6/20	2,86±1,16	1,64±0,42	0,43±0,26	0,18±0,11	0,20±0,12	0,07±0,04
«Верхние Лубянки»	43	4/11	1,57±0,30	1,24±0,21	0,19±0,13	0,12±0,09	0,11±0,08	-0,05±0,01
«Новая Безгинка»	29	1/13	1,86±0,60	1,50±0,32	0,32±0,21	0,16±0,11	0,18±0,12	0,10±0,02
«Калужный яр»	57	2/13	1,86±0,34	1,23±0,13	0,25±0,13	0,12±0,06	0,14±0,07	0,06±0,05
Среднее по региону	48	14/28	1,94±0,28	1,36±0,12	0,27±0,08	0,13±0,04	0,15±0,04	0,04±0,02

Примечание: P - доля полиморфных локусов, N_{au} – число приватных аллелей, N_a – общее число аллелей, A_a – наблюдаемое число аллелей, A_e – эффективное число аллелей, I – индекс Шеннона, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, F – коэффициент инбридинга.

Табл. 6. Показатели генетической изменчивости в популяциях *Helicopsis lunulata* на основе полиморфных аллозимных локусов [Sychev, 2017].Table 6. Indicators of genetic variability in *Helicopsis lunulata* populations in based on polymorphic allozyme loci [Sychev, 2017].

Популяция	P, %	N_{au}/N_a	A_a	A_e	I	H_o	H_e	F
«Осадчее»	0	0/6	1,00±0,00	1,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	–
«Засосна»	50	0/9	1,50±0,22	1,43±0,20	0,32±0,15	0,18±0,09	0,23±0,10	0,19±0,09
«Верхние Лубянки»	68	3/12	2,00±0,37	1,56±0,24	0,43±0,16	0,18±0,06	0,28±0,11	0,28±0,13
«Калужный яр»	33	3/8	1,33±0,21	1,01±0,00	0,02±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	-0,01±0,00
Среднее по региону	38	6/16	1,46±0,13	1,25±0,09	0,19±0,06	0,09±0,03	0,13±0,04	0,19±0,05

Среднерусской возвышенности. Из семи проанализированных микросателлитных маркеров лишь один локус Hel_80 оказался мономорфным (Табл. 4). При этом остальные маркеры имели от 2 до 11 аллелей на локус. Всего же по всем семи локусам удалось выявить 28 аллелей. Из них 14 аллелей оказались приватными и не встречались более чем в одной популяции (Табл. 5).

Исследованные популяции различались как по уровню аллельного разнообразия, так и по показателям генетической изменчивости. Наиболее полиморфной является популяция «Засосна» (индекс Шеннона $I=0,43±0,26$). А наиболее оригинальным генофондом отличается популяция «Верхние Лубянки», что подтверждает результаты филогенетического анализа по сиквенсу гена COX1 (Табл. 2). AMOVA подтвердил высокую генетическую дифференциацию популяций *H. lunulata*. Так, на долю изменчивости между популяциями приходится 43% всех вариаций, в то время на изменчивость внутри популяций – 57%. Индекс Φ_{ST} оказался равным 0,425 ($p=0,001$), а поток генов Nm равен 0,338 особи за поколение. Отмечается так же и относительно высокий средний уровень индекса фиксации F_{ST} , равный $0,27±0,14$. Все это говорит о высокой степени подразделенности генофонда *H. lunulata* на границе видового ареала в условиях пресеченного ландшафта юга Среднерусской возвышенности, препятствующего потоку генов. Для сравнения, у широко распространенного наземного моллюска

Fruticicola fruticum (Müller, 1774) в восточной Европе значение Φ_{ST} оказалось ниже и составило 0,298, а $Nm=0,708$ [Snegin, Snegina, 2017]. Известно, что низкий поток генов может привести к увеличению дрейфа генов, сопровождающегося увеличением частот редких и приватных аллелей [Star, Spencer, 2013]. Действительно, в популяции «Засосна» наблюдается 6 приватных аллелей, а в популяции «Верхние Лубянки» – 4. При этом частота приватного аллеля 158 локуса Hel_7 в популяции «Засосна» достигает 0,300, а частоты приватных аллелей 209 в локусе Hel_18 и 235 в локусе Hel_13 популяции «Верхние Лубянки» – 0,938 и 1,000 соответственно. В то же время значения F_{ST} в значительной степени варьируют между локусами, принимая значения от 0,019 для Hel_5 до 0,936 для Hel_13.

Примечательно, что при анализе этих же популяций *H. lunulata* на основе четырех локусов неспецифических эстераз и двух локусов супероксиддисмутазы, выполненном нами ранее [Sychev, 2017], индекс Φ_{ST} оказался более высоким, чем при использовании STR-локусов, и составил 0,70 при $Nm=0,107$. Кроме того, по сравнению с изоферментами, микросателлитные локусы в среднем характеризуются более высоким уровнем генетической изменчивости, в том числе большим наблюдаемым числом аллелей, более низкими значениями коэффициента инбридинга. Так, примечательно, что популяции «Осадчее» и «Калужный яр», в высокой степени мономорф-

ные по изоферментам, имеют довольно высокое разнообразие по микросателлитным локусам (Табл. 5 и 6). Кроме того, межпопуляционные различия по уровню генетической изменчивости по микросателлитным локусам менее выражены, по сравнению с локусами изоферментов. Все это подтверждает большую селективную нейтральность, а также большее аллельное разнообразие STR-локусов по сравнению с аллозимными генетическими маркерами [Abdul-Muneer, 2014].

Таким образом, наше исследование *H. lunulata* на основе микросателлитных локусов в условиях юга Среднерусской возвышенности показывает сложную генетическую структуру моллюска на границе его видового ареала. Это может быть вызвано фрагментированностью ландшафта, изоляцией ряда популяций, низким потоком генов между ними и, как следствие, увеличением дрейфа генов. Все это проявляется в относительно высоких частотах редких и частных аллелей в каждой популяции. В целом, исследованные STR-локусы можно использовать для популяционно-генетического анализа *H. lunulata* как независимо, так и вместе с аллозимными локусами. При этом отдельные микросателлитные маркеры можно использовать при анализе популяций и других видов рода *Helicopsis*.

Благодарности

Авторы выражают благодарность анонимным рецензентам за замечания и ценные советы, которые позволили улучшить содержание рукописи.

Список литературы

- Abdul-Muneer P.M. 2014. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*, 2014: 691759.
- Balashov I.A. 2016. Stylommatophorans (Stylommatophora). *Fauna Ukrainy*, Vol. 29, *Molluski*. 5. Kyiv: Naukova dumka, 1–592 [In Russian].
- Balashov I.A., Neiber M.T., Hausdorf B. 2021. Phylogeny, species delimitation and population structure of the steppe-inhabiting land snail genus *Helicopsis* in Eastern Europe. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 193(3): 1108–1125.
- Brown S. S., Chen Y. W., Wang M., Clipson A., Ochoa E., Du M. Q. 2017. PrimerPooler: automated primer pooling to prepare library for targeted sequencing. *Biology Methods and Protocols*, 2(1): 1–10.
- Doichinov A., Bachvarova D., Ignatova-Ivanova T. 2015. Polymorphism of lipoamid-dehydrogenase (diaphorase) in natural populations of *Helix pomatia* Linnaeus, 1758 (Gastropoda, Stylommatophora) and *Calliptamus italicus* (Linnaeus, 1758) (Insecta, Orthoptera) under chronic exposure to low doses of radiation. *British Journal of Environmental Sciences*, 3(2): 1–11.
- Duda M, Haring E, Bieringer G, Eschner A, Mrkvicka A, Mason K. 2018. Taxonomic reassessment of *Helicopsis austriaca* Gittenberger, 1969 and its relationships to *H. striata* (O.F. Müller, 1774) and *H. hungarica* (Soos & H. Wagner, 1935) (Eupulmonata: Helicoidea). *Journal of Molluscan Studies*, 84: 432–450.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- 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.
- Gautier C., Esquibet M., Fournet S., Piriou C., Yvin J.-C., Nguema-Ona E., Grenier E., Montarry J. 2019. Microsatellite markers reveal two genetic groups in European populations of the carrot cyst nematode *Heterodera carotae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 73: 81–92.
- Gural-Sverlova N.V. 2010. Review of land molluscs from the genus *Helicopsis* (Hygromiidae) of Donetsk upland and adjoining territories with description of new species. *Ruthenica, Russian Malacological Journal*, 20(1): 13–26 [In Russian].
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41: 95–98.
- Hausdorf B., Bössneck U. 2016. *Helicopsis persica* n. sp. from northern Iran (Gastropoda: Geomitridae). *Zootaxa*, 4066: 194–200.
- IUCN Red List of Threatened Species. Version 2024-1 <https://www.iucnredlist.org/search?taxonomies=115595&searchType=species>
- Krapal A.M., Popa O.P., Iorgu E.I., Cojocaru L.B., Popa A.F., Popa L.O. 2016. Development of the first polymorphic microsatellite markers for the Roman snail *Helix pomatia* L., 1758 (Helicidae) and cross-species amplification within the genus *Helix*. *Genetics and Molecular Research*, 15(3): gmr.15038817.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549.
- Nishida S., Mimura K., Mori H., Chiba S. 2022. Characterization of polymorphic microsatellite markers for the Japanese endangered land snail *Mandarina*. *BMC Research Notes*, 15(1): 1–5.
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1): 288–295.
- Red Data Book of the Belgorod Region. Rare and endangered plants, fungi, lichens and animals*. 2019. Belgorod: Belgorod State University, 1–668 [In Russian].
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406–425.
- Shileyko A.A. 1978. Terrestrial mollusks of the superfamily Helicidae. *Fauna SSSR, Molluski*. 3(6): 1–384 [In Russian].
- Snegin E.A. 2015. Temporal dynamics of the genetic structure and effective size of *Bradybaena fruticum*

- Müll. (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) populations in the south of the Central Russian Upland. *Russian Journal of Ecology*, 46(3): 260–266.
- Snegin E.A. 2017. Estimating the state of population gene pools of the specially protected *Helicopsis striata* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) species based on DNA markers. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 7: 135–144.
- Snegin E.A., Snegina E.A. 2017. Assessment of the state of population gene pools of the slightly mobile animal species on the example of the land snail *Bradybaena fruticum* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) based on the DNA markers. *Ecological genetics*. 15(3): 4–19.
- Star B., Spencer H. 2013. Effects of genetic drift and gene flow on the selective maintenance of genetic variation. *Genetics*, 194(1): 235–244.
- Sychev A.A. 2017. *Malacofauna of calciphilous communities in the south of Mid-Russian upland (biology, ecology and genetics of populations)*. Dissertation of Candidate of biological sciences. Belgorod. 1–279 [In Russian].
- Sychev A.A., Snegin E.A. 2016. To the problem of systematics of the genus *Helicopsis* (Gastropoda: Pulmonata: Hygromiidae) from Eastern Europe. *Ruthenica, Russian Malaological Journal*, 26(3-4): 175–189 [In Russian].
- Sychev A.A., Snegin E.A. 2024. Characteristics of the first microsatellite markers of the steppe snail *Helicopsis* sp. (Gastropoda; Pulmonata). *Materials of the second international scientific conference «Mollusks: biology, ecology, evolution and formation of malacofauna»*. Arkhangelsk: 165–168 [In Russian].
- 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.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Acids Research*, 17: 6463–6471.
- Van der Nest M.A., Steenkamp E.T., Wingfield B.D., Wingfield M.J. 2000. Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified intersimple sequence repeats (ISSR). *Plant Breed*, 119: 433–436.
- Wen Y., Uchiyama K., Han W., Ueno S., Xie W., Xu G., Tsumura Y. 2013. Null alleles in microsatellite markers. *Biodiversity Science*, 21(1): 117–126.
- Yamamoto S., Komatsu H., Kitaura J., Aoyama T., Iwaguchi S.-I., Nakamura M., Kawane M., Collins T.M., Yusa Y. 2018. Development of 11 microsatellite markers and paternity analysis in the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. *VENUS*, 76(1–4): 79–85.

