

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДИСТАНЦИЙ МЕЖДУ НЕКОТОРЫМИ ВИДАМИ СЕМЕЙСТВА *Bradybaenidae* (Mollusca, Pulmonata)

© 2017 г. Э. А. Снегин^{1, *}, А. А. Сычев¹, М. Е. Гребенников^{2, **}, Е. А. Снегина¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород 308015

²Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург 620144

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

**e-mail: mt.71@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2016 г.

На основе межмикросателлитных локусов (ISSR) и нуклеотидных последовательностей ядерных (18S и ITS-1) и митохондриальных генов (COI и 16S) был проведен филогенетический анализ трех видов наземных моллюсков семейства *Bradybaenidae* (Mollusca, Pulmonata) — *Bradybaena fruticum* Müll., *Bradybaena schrencki* Midd. и *Bradybaena transbaicalia* Shileyko с целью уточнения их таксономического статуса. В ходе проведенных исследований выяснилось, что *Br. fruticum* дистанцируется от двух других видов (*Br. schrencki* и *Br. transbaicalia*). Генетические расстояния между последними позволяют усомниться в их видовой самостоятельности. Выдвигается предположение, что вид *Br. transbaicalia* можно рассматривать как форму *Br. schrencki* var. *transbaicalia*.

Ключевые слова: ISSR, гены COI, ITS-1, 16S, 18S, наземные моллюски, филогенетический анализ.

DOI: 10.7868/S0016675817020126

Вопросы, связанные с надежной идентификацией видов, уже более 200 лет (начиная с К. Линнея) вызывают споры в научной среде. За это время открыто немало подходов, обеспечивающих классификацию организмов, значительно приближенную к естественной классификации. Тем не менее поиск таких критериев продолжается, так как во многих таксономических группах ключевых морфологических и иных визуальных показателей либо нет, либо они очень ненадежны. С появлением полимеразной цепной реакции и секвенирования стало возможным в качестве генетических маркеров использовать фрагменты непосредственно самой молекулы ДНК. Сейчас в таксономию активно внедряется метод ДНК-штрихкодирования видов, где в качестве факторов-идентификаторов выступают уникальные видоспецифичные мутации ядерной и митохондриальной ДНК.

В отношении наземных моллюсков важными таксономическими критериями служат параметры раковины, строения тела (у слизней) и строение половой системы. Однако в ряде случаев из-за так называемых “перекрывающихся” рядов из-

менчивости не всегда удается точно определить видовую принадлежность.

Подобная проблема возникла в отношении трех видов семейства *Bradybaenidae* — *Bradybaena fruticum* Müll., *Bradybaena schrencki* Midd. и *Bradybaena transbaicalia* Shileyko¹ (рис. 1).

Хотя в наиболее известном определителе по наземным моллюскам [1] указаны признаки, позволяющие с той или иной степенью вероятности судить о видовой принадлежности изучаемых особей, тем не менее сам автор признает, что указанные виды очень близки по элементам морфологии раковины и анатомии половой системы (особенно *Br. fruticum* и *Br. schrencki*).

Положение осложняется тем, что три вида на территории Евразии имеют перекрещивающиеся ареалы и обитают в сходных биотопах. Например, если ареал *Br. fruticum* ранее определяли только в рамках Европейского континента (от Западной Европы до Урала), то в настоящее время существуют достаточно веские доказательства присутствия этого вида на юге Западной Сибири (в Том-

¹ В некоторых работах эти виды относят к роду *Fruticola* [4–6].



Рис. 1. Раковины трех видов моллюсков рода *Bradybaena*. 1 – *Br. fruticum* из пункта “Белгород”, 2 – *Br. schrencki* из пункта “Горно-Алтайск”, 3 – *Br. transbaicalia* из пункта “Урал”.

ской, Тюменской областях и в Красноярском крае) [2]. Ареал *Br. transbaicalia* ранее ограничивали только территорией первоописания – хребет Хамар-Дабан в Забайкалье. Сейчас этот вид известен из различных точек в Прибайкалье, в Красноярске (Академгородок) и на Среднем Урале [3]. Причем раньше особей этого вида, вероятно, относили к *Br. schrencki* форме *major* [7]. Ареал собственно *Br. schrencki* охватывает Северо-Восточную Европу, Сибирь, Алтай, Камчатку.

Данные обстоятельства позволили П.В. Матёкину усомниться в таксономической самостоятельности этих видов. Особенно автор настаивал на признании одним видом *Br. schrencki* и *Br. fruticum* [8].

Это предположение заставило нас проверить таксономический статус этих видов с использованием современных молекулярных методов диагностики. Данная задача диктовалась еще одним обстоятельством. Дело в том, что *Br. fruticum* в настоящее время используется в качестве модельного объекта для популяционно-генетических исследований как индикатор антропогенного воздействия на различные экосистемы в разных ландшафтах [6, 9–15] и решение обозначенной выше таксономической проблемы позволит избежать получения ложных результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экстракции ДНК использовались образцы мантии моллюсков, тщательно отжатых от слизи. ДНК выделяли согласно протоколу набора реактивов Silica upi на основе сорбента (Bioком, Россия).

В качестве ДНК-маркеров задействованы ISSR-ампликоны и нуклеотидные последовательности ядерных (18S и ITS-1) и митохондриальных генов (COI и 16S), имеющих хороший таксономический сигнал и ранее уже используемых для филогенетических реконструкций брюхоногих моллюсков. ПЦР-реакцию проводили на амплификаторе Verity (Applied Biosystems, США) в 20 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, ПЦР-буфер (10 ммоль трис-НСI (рН 8.3),

50 ммоль КСI, 2 ммоль MgCl₂), 0.25 ммоль dNTP, 0.5 мкмоль праймера, 1 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы (ингибированной для горячего старта). Последовательности праймеров и условия амплификации указаны в табл. 1.

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

ISSR-ампликоны были получены с помощью праймеров, меченных флуорофором 6-FAM (ДНК-синтез, Россия). После ПЦР полученные ISSR-фрагменты очищали с помощью набора Diatom® DNA Clean-Up на основе сорбента (Isogene, Россия). После амплификации к 1 мкл ПЦР-продукта добавляли 9 мкл формамида Hi-Di™ и 0.3 мкл раствора размерного стандарта GS 600LIZv2.0. Подготовленные таким образом образцы анализировали на указанном ДНК-секвенаторе. Анализ размера фрагментов проводили с помощью программного обеспечения GeneMapper® Software v4.1 (Applied Biosystems). Всего в диапазоне от 100 до 600 пн нами было диагностировано 497 локусов по праймеру SAS1 и 462 локуса по праймеру UBC827. На основе полученных данных составляли бинарные матрицы, в которых наличие пика обозначали как “1” (аллель p), а отсутствие – “0” (аллель q). Анализ молекулярной дисперсии AMOVA [22] осуществляли в программе GenAlEx v. 6.5 [23]. Расчет генетических расстояний по Неи и Ли [24], кластеризацию выборок методом ближайшего связывания (NJ) [25] и бутстреп-оценку (1000 генераций) проводили в программе TREECON ver. 1.3b [26]. При этом бинарный вектор каждой популяции, состоявший из 959 фрагментов, характеризовал наличие или отсутствие фрагмента определенной длины хотя бы у одной особи из всей популяции. Всего методом ISSR было проанализировано 128 особей из 8 популяций рода *Bradybaena* (табл. 2).

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

ДНК-маркеры	Праймеры	Температурный профиль
ISSR (UBC827)	FAM 5'-ACACACACACACACACG-3'	1-й 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
ISSR (SAS1)	FAM 5'-GTGGTGGTGGTGGC-3'	
COI [16, 17]	5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3' 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	1-й 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 rRNA [17, 18]	5'-CGGCCGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' 5'-GGAGCTCCGGTTTGAACCTCAGATC-3'	1-й 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
ITS-1 [17, 19, 20]	5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3' 5'-GCTGCGTTCCTCATCGATGC-3'	1-й цикл 3 мин/94°C, 40 циклов (30 с/92°C, 30 с/52°C, 1 мин/72°C), 1 цикл 5 мин/72°C
18S rRNA [17, 21]	5'-CTGGTTGAT(CT)CTGCCAGT-3' 5'-CTGAGATCCAACCTAGGAGCTT-3'	1-й 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

Для секвенирования ДНК от каждого исследуемого вида использовали одну особь. После амплификации фрагменты ДНК очищали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле, после чего вырезали участки геля с целевой ДНК и далее проводили ее элюцию с помощью набора реактивов Diatom® DNA Elution на основе сорбента (Isogene, Россия). Пробоподготовку для секвенирования осуществляли с помощью набора реагентов BigDye® Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems) согласно протоколу. Далее проводили прямое и обратное секвенирование образцов. Полученные данные первоначально обрабатывали в программе Sequencing Analysis® Software 6 (Applied Biosystems). Выравнивание прямых и обратных последовательностей проводили в программе BioEdit V.7.0.0 [27]. Для выбора оптимальной модели нуклеотидных замен и расчета генетических дистанций использовали программу jModelTest [28], при этом для всех используемых генетических маркеров была выбрана обобщенная модель с полным временным преобразованием GTR с гамма-коррекцией. Реконструкцию филогенетических деревьев и оценку достоверности их топологии проводили с помощью программы MrBayes [29, 30]. В ходе байесовского подхода использовали пять запусков программы, для генерации деревьев использовали 2000000 марковских цепей, для построения консенсусного дерева сохранялось каждое 1000-е сгенерированное дерево. Визуализацию филогенетических деревьев осуществляли в программе FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Для сопоставления из GenBank нами были взяты последовательности анализируемых генов других видов рода *Bradybaena* [17, 31–35]. В качестве контроля уровня семейства использовали данные секвенирования генов у вида *Helicopsis striata* (семейство Hygromiidae). В табл. 3 представлены коды нуклеотидных последовательностей, помещенные в GenBank (NCBI).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дендрограмма, построенная по результатам фрагментного анализа, представлена на рис. 2. Согласно полученным данным, выборка из популяций *Br. transbaicalia* дистанцируется от популяций как *Br. fruticum*, так и *Br. schrencki*. Попарные значения генетической дифференциации Φ_{st} (табл. 4) на основе 959 межмикросателлитных локусов также показали, что *Br. transbaicalia* значительно дистанцируется как от популяций *Br. fruticum* ($\Phi_{st} > 0.3$), так и от *Br. schrencki* ($\Phi_{st} = 0.272$). При этом указанные генетические дистанции сопоставимы с межгрупповыми различиями между некоторыми популяциями *Br. fruticum*. Например, между *Br. fruticum* (“Кисловодск”), с одной стороны, и *Br. fruticum* (“Урал”) и *Br. fruticum* (“Стенки Изгорья”), с другой. Различия между группой *Br. schrencki* и популяциями *Br. fruticum* также укладываются в межпопуляционные дистанции *Br. fruticum*.

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

Таблица 2. Пункты сбора моллюсков для фрагментного анализа и секвенирования

Вид	Анализ	Пункт сбора	Координаты
<i>Bradybaena schrencki</i>	ISSR N = 19 S	“Горно-Алтайск”. г. Горно-Алтайск (Россия); небольшой лесной массив вдоль ул. Ленина	51°57'19.40" с.ш., 85°58'09.31" в.д.
<i>Bradybaena transbaicalia</i>	ISSR N = 19 S	“Урал”. Свердловская обл., Сухоложский р-н, г. Сухой Лог (Россия); подножье скалы известняка на правом берегу р. Пышма, крутой каменистый склон	56°55'15.90" с.ш., 62°01'26.90" в.д.
<i>Bradybaena fruticum</i>	ISSR N = 20	“Кисловодск”. г. Кисловодск; курортный парк; долина р. Ольховка; заросли крапивы	43°53'21.40" с.ш., 42°43'52.40" в.д.
	ISSR N = 19	“Урал”. Свердловская область, Нижнесергинский район (Россия); природный парк “Оленьи ручьи”; сосново-еловый лес с березой и лиственницей, поляна заросли таволги, малины	56°31'01.00" с.ш., 59°14'49.00" в.д.
	ISSR N = 15	“Стенки Изгорья”. Белгородская область, Новооскольский район (Россия); заповедный участок “Стенки Изгорья”; заболоченный биотоп, заросли ольхи, в подлеске лопух и крапива	50°41'23.25" с.ш., 37°49'12.22" в.д.
	ISSR N = 14	“Киров”. г. Киров (Россия); территория городского парка; пойма р. Вятка; заросли крапивы и таволги	58°34'57.11" с.ш., 49°41'50.75" в.д.
	ISSR N = 10	“Дивногорье”. Воронежская область (Россия); памятник природы “Дивногорье”; пойма р. Тихая Сосна, заросли лопуха, крапивы, хмеля	50°57'48.99" с.ш., 39°17'40.35" в.д.
	ISSR N = 12	“Воронов камень”. Липецкая область (Россия); заповедный участок “Воргольское”; скальные выходы девонских известняков в пойме р. Воргол	52°34'25.32" с.ш., 38°21'05.34" в.д.
	S	“Белгород”. Окрестности г. Белгород (Россия); пойма р. Северский Донец, заросли ивы и клена	50°36'38.40" с.ш., 36°37'19.19" в.д.
<i>Helicopsis striata</i>	S	“Белгород”. Окрестности г. Белгород (Россия), юго-западный крутой меловой склон правого берега р. Северский Донец	50°37'28.66" с.ш., 36°37'15.97" в.д.

Примечание. N – количество особей, используемых для ISSR-анализа, S – группы, используемые для секвенирования.

Таблица 3. Коды последовательностей секвенированных генов, помещенные в GenBank

Вид	Коды GenBank			
	COI	16S	18S	ITS-1
<i>Br. schrencki</i>	KX270740*	KX270729*	KX270737*	KX270733*
<i>Br. transbaicalia</i>	KX270741*	KX270730*	KX270739*	KX270734*
<i>Br. fruticum</i> (1)	KX270742*	KX270731*	KX270738*	KX270735*
<i>Br. fruticum</i> (2)	AY546264	AY546344	AY546384	AY546304
<i>Br. similaris</i>	AB902872	GQ851164	—	AB852967
<i>Br. phaeogramma</i>	—	AF098714	—	—
<i>Br. phaeogramma phaeogramma</i>	AB902879	—	—	AB902905
<i>Br. ravidia</i>	KF765753	—	—	—
<i>Br. brevispira</i>	KF765755	—	—	—
<i>Br. virgo virgo</i>	KF765751	—	—	—
<i>Br. blakeana</i>	—	AB893777	—	AB893912
<i>Br. circulus circulus</i>	AB902860	—	—	AB902885
<i>H. striata</i> *	AY546282	KX270732*	AY546402	KX270736*

Примечание. *Br. fruticum* (1) – особь из г. Белгород, Россия; *Br. fruticum* (2) – особь из г. Шлюхтерн, Германия.

* Данные авторов статьи.

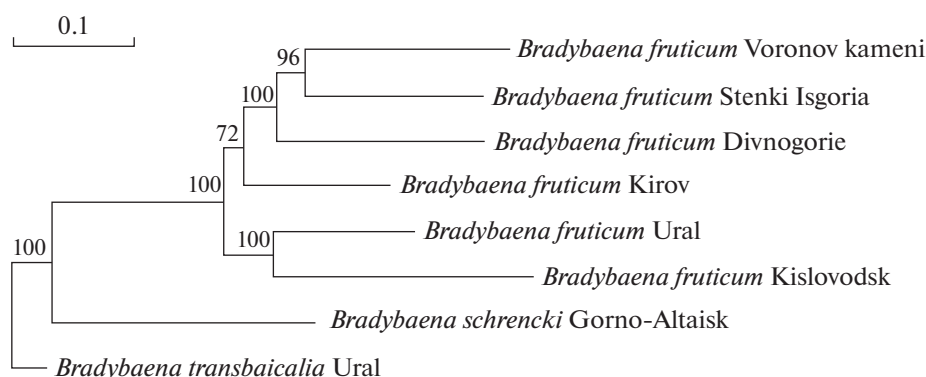


Рис. 2. Дендрограмма генетических расстояний, построенная методом ближайшего связывания (NJ), между популяциями *Bradybaena* sp. по ISSR-локусам. В узлах приведены величины бутстреп-оценки (%).

Согласно полученным данным, последовательность митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы *c* (COI), содержащей 463 пн, показала большое сходство между *Br. schrencki* и *Br. transbaicalia* ($D = 0.062$). Генетическая дистанция между этими двумя видами сопоставима с расстоянием между двумя особями *Br. fruticum* из двух удаленных друг от друга пунктов (г. Шлюхтерн, Германия, и г. Белгород, Россия; $D = 0.016$). При этом генетические различия между другими относительно близкими видами рода *Bradybaena* по этому маркеру более значительны. Например, между *Br. circulus circulus* и *Br. phaeogramma phaeogramma* генетическая дистанция $D = 0.395$, а между *Br. ravidia* и *Br. virgo virgo* — $D = 0.368$. Примечательно, что генетическое расстояние между кластерами “*Br. fruticum*” и “*Br. schrencki* + *Br. transbaicalia*” оказалось равным $D = 0.502$.

Анализ последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера, разделяющего индивидуальные ядерные гены рРНК (ITS-1, 619–626 пн), продемонстрировал еще большее сходство между *Br. schrencki* и *Br. transbaicalia* ($D = 0.004$). Генетиче-

ская дистанция между этими двумя видами по этому маркеру оказалась меньше, чем между представителями разных популяций *Br. fruticum* ($D = 0.014$). Однако стоит отметить, что, согласно филограмме (рис. 2), генетическая дистанция между хорошими видами *Br. phaeogramma phaeogramma* и *Bradybaena similaris* по данному маркеру также оказалась небольшой ($D = 0.012$). Стоит отметить также, что *Br. transbaicalia* в позиции 39–42 пн имеет вставку CAGC, отсутствующую у других видов семейства. Кроме того, у *Br. schrencki* (в позиции 458–460 пн) и у *Br. transbaicalia* (в позиции 462–464 пн) имеется оригинальная вставка TGC.

Филогенетическую близость *Br. schrencki* и *Br. transbaicalia* продемонстрировала также нуклеотидная последовательность (399 пн) рибосомного гена 16S митохондриальной ДНК ($D = 0.006$). При этом генетическая дистанция между двумя особями *Br. fruticum* оказалась в 2 раза больше ($D = 0.013$), а расстояние между *Br. phaeogramma* и *Bradybaena similaris*, расположенными в одном кластере, составило $D = 0.331$. Обращает внимание, что *Br. fruticum* в отличие от других видов се-

Таблица 4. Попарные оценки генетической дифференциации (Φ_{st}) между исследованными популяциями рода *Bradybaena* по всем 959 ISSR-локусам

Популяции	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>Br. schrencki</i> (Горно-Алтайск)	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
2. <i>Br. transbaicalia</i> (Урал)	0.272	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
3. <i>Br. fruticum</i> (Кисловодск)	0.326	0.438	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
4. <i>Br. fruticum</i> (Урал)	0.268	0.391	0.272	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001
5. <i>Br. fruticum</i> (Стенки Изгорья)	0.264	0.368	0.282	0.205	0.000	0.001	0.001	0.001
6. <i>Br. fruticum</i> (Киров)	0.208	0.311	0.214	0.109	0.130	0.000	0.001	0.001
7. <i>Br. fruticum</i> (Дивногорье)	0.208	0.337	0.252	0.174	0.080	0.073	0.000	0.001
8. <i>Br. fruticum</i> (Воронов камень)	0.253	0.363	0.265	0.219	0.106	0.104	0.069	0.000

Примечание. Под диагональю приведены оценки Φ_{st} , а над диагональю — уровень их значимости.



Рис. 3. Филогенетические деревья *Bradybaena* sp., построенные байесовским методом на основе последовательности генов ITS-1, 16S, COI. В узлах приведены апостериорные вероятности выше 0.5.

мейства имеет вставку GAACC в позиции 254–258 пн.

Последовательности ядерной 18S рРНК, включающие 618 пн, у сравниваемых трех видов семейства Bradybaenidae оказались полностью идентичными. Определенные генетические дистанции удалось установить только между представителями различных семейств.

Стоит отметить, что по совокупности последовательностей генов COI, 16S и ITS-1 у исследуемых нами видов генетические расстояния составили между *Br. schrencki* и *Br. transbaicalia* – 0.019, между двумя особями *Br. fruticum* – 0.012, а между кластером “*Br. fruticum*” и “*Br. schrencki + transbaicalia*” – 0.169. Примечательно, что полученные результаты сопоставимы с аналогичными данными по другим наземным моллюскам. Так, по

указанной совокупности генов между видами одного рода генетические расстояния составили, например, в роде *Monacha* – 0.110, *Helicella* – 0.100, *Candidulla* – 0.100, *Caracolliana* – 0.140 [17]. При этом по отдельно взятой последовательности гена COI, например в роде *Satsuma*, генетические дистанции между видами варьировали от 0.103 до 0.285, а между разными формами вида *S. mellea* генетическое расстояние составило 0.082 [34].

ОБСУЖДЕНИЕ

Ввиду того, что по ISSR-локусам генетические дистанции между изучаемыми видами укладываются в межпопуляционные расстояния, можно говорить о том, что фрагментный анализ, по всей видимости, не может дать однозначного ответа о таксономическом статусе изучаемых групп моллюсков. Причиной этого может быть большая изменчивость ISSR-локусов как внутри популяций, так и на межпопуляционном уровне. Учитывая, что изучаемые виды филогенетически очень близки, мы можем наблюдать сходные ряды наследственной изменчивости, которые нивелируют межвидовые различия. Вероятно, ISSR-локусы более приемлемы в качестве генетических маркеров для изучения популяционной структуры видов, имеющих устоявшееся таксономическое реноме.

В отношении генетических расстояний, выявленных с помощью нуклеотидных последовательностей используемых генов, можно отметить одну закономерность, согласно которой вид *Br. fruticum* явно дистанцируется от двух, вероятно, викарирующих азиатских видов *Br. schrencki* и *Br. transbaicalia*. Учитывая значительную генетическую близость последних, их видовая самостоятельность вызывает сомнение. Если принять во внимание тот факт, что *Br. schrencki* был описан значительно раньше (Middendorff, 1851) и был отмечен в многочисленных точках Евразии, то *Br. transbaicalia* (Shileyko, 1978), известного из нескольких точек в районе озера Байкал и по одной точке на Урале и в г. Красноярске, вероятно, можно считать либо недавно обособившимся от *Br. schrencki* видом, либо, как указывалось ранее [4], формой *maior* этого вида (в современной интерпретации *Br. schrencki* var. *transbaicalia*).

При этом стоит отметить, что таксономическая ревизия семейства Bradybaenidae на основе генетических маркеров уже поставила под сомнение самостоятельность некоторых видов, входящих в него, выделение которых было основано на морфологических признаках (строение раковины и половой системы). В качестве примера можно привести работу Т. Хирано с соавт. [33], где про-

водится ревизия некоторых островных видов из родов *Phaeohelix* и *Bradybaena*.

Весьма примечательным является и тот факт, что анализ последовательностей генов COI и ITS-1 показал, что *Br. fruticum*, *Br. schrencki* и *Br. transbaicalia* входят в один кластер и филогенетически дистанцируются от других видов семейства Bradybaenidae². Исходя из того, что родиной этого семейства является Восточная Азия [4], можно предположить, что эти три (или два) вида являются монофилетическими. В ходе освоения Евразийского континента в плиоцене *Br. fruticum* в основном двигалась в западном направлении, осваивая Европейский континент, а *Br. schrencki* адаптировалась к более суровым условиям Сибири. В отдельных изолированных популяциях этого вида могли наблюдаться элементы аллопатрии, что привело к формированию *Br. transbaicalia* (или var. *transbaicalia*).

В заключение хотелось бы отметить, что исследование филогенетических отношений трех изученных нами видов семейства Bradybaenidae на основе большего количества маркеров и различных популяций позволит построить более реальную историческую картину формирования этой группы наземных моллюсков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шилейко А.А. Наземные моллюски надсемейства Helicoidea // Фауна СССР. Моллюски. Новая серия. Л.: Наука, 1978. Т. 3. Вып. 6. 384 с.
2. Удалой А.В. К вопросу о распространении кустарниковой улитки *Fruticicola fruticum* (Muller, 1774) на юге Западной Сибири // Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России: Матер. 4-й Междунар. науч.-практич. конф. М., 2011. С. 104–106.
3. Хохуткин И.М., Ерохин Н.Г., Гребенников М.Е. Моллюски: Биоразнообразие, экология. Каталоги коллекций Зоологического музея Института экологии растений и животных УрО РАН. Екатеринбург: УрО РАН, 2003. 238 с.
4. Shileyko A.A. Treatise on Recent terrestrial pulmonate molluscs. Part 12: Bradybaenidae, Monadeniidae, Xanthonychidae, Epiphragmophoridae, Helminthoglyptidae, Elonidae, Sphincterochilidae, Cochlicellidae // Ruthenica. 2004. Supplement 2. P. 1627–1763.
5. Кантор Ю.И., Сысоев А.В. Каталог моллюсков России и сопредельных стран. М.: Т-во научн. изд. КМК, 2005. 627 с.

² Исключение составил вид *Bradybaena blakeana* (W. Newcomb, 1865) с острова Хоккайдо (Япония), который по маркеру ITS-1 вошел в одну кладу с тремя изучаемыми нами видами, а по 16S оказался в одной группе с *Br. fruticum*. Полагаем, что генетическую близость этого островного вида с континентальными моллюсками еще предстоит обсудить в будущем.

6. Зейферт Д.В., Хохуткин И.М. Экология кустарниковой улитки *Fruticicola fruticum*. М.: Т-во научн. изд. КМК, 2010. 92 с.
7. Лихарев И.М., Раммельмейер Е.С. Наземные моллюски фауны СССР // Определители по фауне. М.; Л.: Наука, 1952. Вып. 43. 512 с.
8. Матёкин П.В. Видовой статус и распространение некоторых легочных моллюсков семейства Bradybaenidae // Моллюски: морфология, таксономия, филогения, биогеография и экология: Сб. науч. тр. по матер. Седьмого (XVI) совещ. по изучению моллюсков. 14–17 ноября 2006 г. СПб: ЗИН РАН, 2007. С. 171–172.
9. Хохуткин И.М. Структура изменчивости видов на примере наземных моллюсков. Екатеринбург: УрО РАН, 1997. 175 с.
10. Falniowski A., Szarowska M., Witkowska-Pelc E. Intra- and interpopulation genetic differentiation and gene flow in a group of isolated populations of *Bradybaena fruticum* (Müller, 1774) in South Poland // J. Zool. Systemat. and Evol. Res. 2004. V. 42. № 1. P. 70–80.
11. Макеева В.М., Белоконь М.М., Малюченко О.П. Оценка состояния генофонда природных популяций беспозвоночных животных в условиях фрагментарного ландшафта Москвы и Подмосковья (на примере кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll.)) // Генетика. 2005. Т. 41. № 11. С. 1495–1510.
12. Снегин Э.А. Эколого-генетические аспекты расселения *Bradybaena fruticum* (Mollusca, Gastropoda, Pullmonata) в элементах лесостепного ландшафта // Экология. 2005. № 1. С. 39–47.
13. Снегин Э.А. Оценка состояния популяционных генофондов наземных моллюсков в условиях влияния горно-обогатительных комбинатов на примере *Bradybaena fruticum* Müll. (Gastropoda, Pulmonata) // Экологич. генетика. 2010. Т. VIII. № 2. С. 45–55.
14. Снегин Э.А. Пространственные и временные аспекты эколого-генетической структуры популяций беспозвоночных животных (на примере наземных моллюсков и насекомых юга Среднерусской возвышенности): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Белгород, 2012. 41 с.
15. Снегин Э.А. Временная динамика генетической структуры и эффективная численность популяций *Bradybaena fruticum* Müll. (Mollusca, Gastropoda, Pullmonata) в условиях юга Среднерусской возвышенности // Экология. 2015. № 3. С. 198–205. doi 10.7868/S0367059715020110
16. Folmer O., Black M., Heah W. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Marine Biol. and Biotechnol. 1994. V. 3. P. 294–299.
17. Steinke D., Albrecht C., Pfenniger M. Molecular phylogeny and character evolution in the Western Palaearctic Helicidae. L. (Gastropoda: Stylommatophora) // Mol. Phylogenet. and Evol. 2004. V. 32. P. 724–734. doi 10.1016/j.ympev.2004.03.004
18. Palumbi S., Martin A., Romano S. et al. The simple fool's guide to PCR version 2.0. Honolulu: Univ. Hawaii, 1991. 47 p.
19. Armbruster G.F.J., van Moorsel C.H.M., Gittenberger E. Conserved sequence patterns in non-coding ribosomal ITS-1 of distantly related snail taxa // J. Molluscan Studies. 2000. V. 66. P. 570–573.
20. Van Moorsel C.H.M., van Nees W.J., Mengens H.J. A quick, simple, and inexpensive Mollusc DNA extraction protocol for PCR-based techniques // Malacologia. 2000. V. 42. P. 203–206.
21. Winnepenninckx B., Backeljau T., de Wachter R. Small ribosomal subunit RNA and the phylogeny of Mollusca // Nautilus. 1994. V. 2 (Suppl.). P. 98–110.
22. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. 1992. № 131. P. 479–491.
23. Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. P. 288–295. doi 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
24. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5269–5273.
25. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. and Evol. 1987. V. 4. Issue 4. P. 406–425.
26. Van de Peer Y., De Wachter Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Computer Applications in the Biosciences. 1994. V. 10(5) P. 69–70.
27. Hall T. BioEdit: An important software for molecular biology // GEF Bull. Bioscie. 2011. V. 2(1). P. 60–61.
28. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nature Methods. 2012. V. 9. P. 772.
29. Cummings M.P., Handley S.A., Myers D.S. et al. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case // Systematic Biol. 2003. V. 52. P. 477–487. doi 10.1080/10635150390218213
30. Redelings B.D., Suchard M.A. Joint Bayesian estimation of alignment and phylogeny // Systematic Biol. 2005. V. 54. P. 401–418.
31. Chiba S. Accelerated evolution of land snails Mandarina in the oceanic Bonin Islands: evidence from mitochondrial DNA sequences // Evolution 1999. V. 53. № 2. P. 460–471.
32. Hugall A. F. Stanisic J. Beyond the prolegomenon: a molecular phylogeny of the Australian Camaenid land snail radiation // Zool. J. Linn. Soc. 2011. V. 161. № 3. P. 531–572. doi 10.1111/j.1096-3642.2010.00644.x
33. Hirano T., Kameda Y., Chiba S. Phylogeny of the land snails *Bradybaena* and *Phaehelix* (Pulmonata: Bradybaenidae) in Japan // J. Molluscan Studies. 2014. P. 1–7. doi 10.1093/mollus/eyu004
34. Wang P., Xiao Q., Zhou W.C., Hwang C.C. Revision of three camaenid and one bradybaenid species (Gastropoda, Stylommatophora) from China based on morphological and molecular data, with description of a new bradybaenid subspecies from Inner Mongolia, China // ZooKeys. 2014. V. 372. P. 1–16. doi 10.3897/zookeys.372.6581
35. Mori Y., Yokoyama J., Kawata M. et al. Evidence of introgressive hybridization between the morphologically divergent land snails *Ainohelix* and *Ezohelix* // Biolog. J. Linn. Soc. 2015. V. 115. № 1. P. 77–95. doi 10.1111/bij.12466

Assessment of the Genetic Distances between Some Species of the Family Bradybaenidae (Mollusca, Pulmonata)

E. A. Snegin^{a, *}, A. A. Sychev^a, M. E. Grebennikov^{b, **}, and E. A. Snegina^a

^aBelgorod State National Research University, Belgorod, 308015 Russia

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

^bInstitute of Ecology of Plants and Animals, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia

**e-mail: mt.71@mail.ru

On the basis of inter-simple sequence repeat (ISSR) loci and the nucleotide sequences of nuclear (18S and ITS-1) and mitochondrial genes (COI and 16S), a phylogenetic analysis of the three species of terrestrial mollusks of the family Bradybaenidae (Mollusca, Pulmonata), *Bradybaena fruticum* Müll, *Bradybaena schrencki* Midd., and *Bradybaena transbaicalia* Shileyko, was conducted to clarify their taxonomic status. The analysis showed that *Br. fruticum* was far apart from the other two species (*Br. schrencki* and *Br. transbaicalia*). The genetic distance between the latter puts in doubt their status as distinct species. It is suggested that the species *Br. transbaicalia* can be treated as a form of *Br. schrencki* var. *transbaicalia*. English translation of the paper published in Russian Journal of Genetics, 2017, Vol. 53, No. 2, is available ONLINE by subscription from: <http://www.springer.com/>, <http://link.springer.com/journal/11177>

Keywords: ISSR, COI, ITS-1, 16S, 18S genes, terrestrial mollusks, phylogenetic analysis.