

REFERENCES

1. Lezhneva S. V. Otchet o prohozhdenii stazhirovki na kafedre fizicheskoy geografii i landshaftovedenija MGU imю M. V. Lomonosova / Pod obshchej red. N. V. Loveliusa. SPb.: Asterion, 2013. 24 s.
2. Lovelius N. V. Izmenchivost' prirosta derev'ev. Dendroindikacija prirodnyh processov i antropogennyh javlenij. L.: Nauka, 1979. 231 s.

Е. Е. Прохорова, Е. А. Жемчужникова, Г. Л. Атаев*

Победитель конкурса поддержки публикационной активности
молодых исследователей (проект 3.1.2, ПСР РГПУ им. А. И. Герцена)

**Использование RAPD-анализа для изучения
генетической популяционной изменчивости
моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata)**

*Разработана и стандартизирована методика молекулярного генотипирования моллюсков *Planorbarius corneus* с помощью RAPD-анализа. Проведен анализ фенотипического разнообразия трех популяций роговых катушек, обитающих на территории Ленинградской и Калининградской областей. Отобраны праймеры, позволяющие выявлять межпопуляционные различия между моллюсками из разных популяций.*

Ключевые слова: моллюски, *Planorbarius corneus*, RAPD-анализ, генетический полиморфизм.

E. Prokhorova, E. Zhemchuzhnikova, G. Ataev

**Application of RAPD For the Investigation
of Populational Variability of *Planorbarius corneus* snails (Gastropoda, Pulmonata)**

*The method of molecular genotyping of *Planorbarius corneus* snails by RAPD-analysis was developed. Populational variability in three populations of *P. corneus* from Leningradskaya Oblast and Kaliningradskaya Oblast was analysed. Three primers for the detection of intrapopulation differences between snails from different populations were selected.*

Keywords: snails, *Planorbarius corneus*, RAPD, genetic variability.

По морфологическим критериям моллюск *Planorbarius corneus* является очень полиморфным видом [3]. В литературе даже существует точка зрения, что роговая катушка представляет собой сборную группу близких совместно обитающих видов [2; 5; 6].

В случаях, когда морфологические критерии оказываются недостаточными или спорными, для видовой идентификации моллюсков все чаще используют методы молекулярного генотипирования. Одной из методик, позволяющих оценить генотипический полиморфизм популяций, является генотипирование с помощью полимеразной цепной реакции со случайными праймерами (RAPD-анализ). В настоящее время RAPD-анализ широко используется в изучении генома для генотипирования, конструирования генетических карт, анализа генетической структуры популяций, маркирования признаков [11; 16; 17]. Однако существенным недостатком этого метода является чувствительность к экспериментальным условиям и необходимость стандартизации протокольных компонентов для каждого объекта [8].

В настоящем исследовании впервые была разработана методика молекулярного генотипирования моллюсков *P. corneus* с помощью RAPD-анализа. Была оценена популяционная изменчивость роговых катушек из двух популяций на территории Ленинградской области и популяции из Калининградской области.

Моллюски *Planorbarius corneus* были собраны в 2012–2013 годах в трех точках: в р. Оредеж в районе пос. Вырица Гатчинского района Ленинградской области ($n = 7$), в оз. Сюевярви Всеволожского района Ленинградской области ($n = 5$), в прудах на территории пос. Рыбачий Калининградской области ($n = 5$). Видовую идентификацию проводили по определителю Жадина [1].

ДНК выделяли из тканей ноги и гепатопанкреаса путем экстракции фенолом-хлороформом из ядер, очищенных при центрифугировании через сахарозную подушку по стандартной методике [12]. Оценку нативности и чистоты выделенной ДНК проводили путем спектрофотометрического анализа и электрофореза в 0,8% агарозном геле.

В работе был проверен 21 случайный праймер длиной по 10 нуклеотидов, используемых для выявления генотипических различий между различными видами и линиями моллюсков близкого рода *Biomphalaria*, двустворчатых моллюсков и слизней [7; 9; 14–16] (табл. 1). Праймеры использовали индивидуально и комбинировали между собой.

Амплификацию ДНК со случайными праймерами осуществляли согласно методу, описанному в литературе [13], на термоциклере «Терцик-МС2» («ДНК-Технология», Россия). Оптимальный состав реакционной смеси и температурные профили для амплификации были подобраны экспериментальным путем. ДНК в количестве 5 нг, 10 нг, 15 нг, 20 нг амплифицировали в реакционной смеси (20 μ л), содержащей 2 ед. Taq-полимеразы, 200 мкМ каждого дНТФ, 2 мкл инкубационного буфера (1,5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,5) 6,4 пМ каждого праймера.

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности и температуры отжига случайных праймеров, использованных для генотипирования моллюсков *Planorbarius corneus*

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Температура отжига, °C	Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Температура отжига, °C
P1	TTGAGGCCCT	36	G1	TGCCGAGCTG	37
P2	TGTTGTGCCC	36	G2	GTTGCCAGCC	40
P3	CTCATACGCG	36	G3	AGGGAACGAG	37
P4	GTGGCTAGGT	39	G4	GGTCCCTGAC	35
P5	GGGAATTCGG	36	G5	CAGGCCCTTC	40
P6	GCTGCGTGAC	39	G6	CTCTCCGCCA	38
P7	CCAATTCACG	37	G7	AGTGCTACGT	39
P8	CGGTTTGGA	36	G8	CTGATGCTAC	38
P9	TGGTGACTGA	38	G9	GGGTAACGCC	37
P10	GTCCCGACGA	39	G10	CTGCTGGGAC	39
P11	GAAACGGGTG	37			

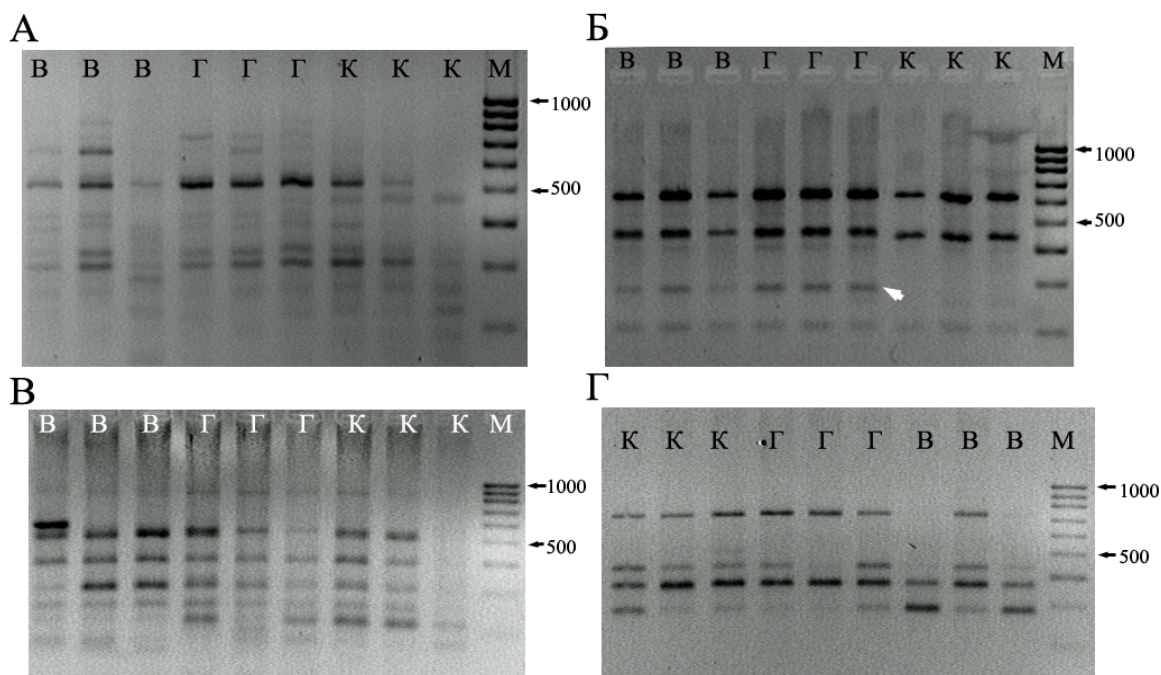
Температурный профиль ПЦР включал в себя: 1 цикл (94 °C — 5 мин), 2 цикла (95 °C — 30 с, 30 °C — 2 мин, 72 °C — 1 мин), 35 циклов (95 °C — 30 с, температура отжига праймера (T_0) — 2 мин, 72 °C — 1 мин), 1 цикл (72 °C — 7 мин).

Электрофоретический анализ ПЦР-фрагментов рДНК осуществляли в 2%-ном агарозном геле по стандартной методике [12]. В каждой выборке подсчитывалось общее число RAPD-фрагментов и число полиморфных фрагментов. Примерные длины RAPD-фрагментов определяли графическим методом. Процент полиморфных локусов (P,%) рассчитывали по формуле $P, \% = (F / P) \times 100\%$, где F — число амплифицированных фрагментов, P — число полиморфных локусов. Индекс фенотипического разнообразия Шеннона (H_0) рассчитывали по формуле: $H_0 = -\sum F \log_2 F$, где F — частота присутствия или отсутствия амплифицированного фрагмента.

Коэффициент подобия S между популяциями по Дайсу (S) рассчитывали по формуле $S = 2a/2a + b + c$, где a — количество фрагментов полученных на ДНК моллюсков обеих популяций, b — количество фрагментов, полученных на ДНК моллюсков одной популяции; c — количество фрагментов, полученных на ДНК моллюсков другой популяции.

Наиболее четкие RAPD-профили на ДНК моллюсков *Planorbarius corneus* были получены при использовании 15 нг (для праймеров P1–P11) и 20 нг (для праймеров G1–G10) ДНК в реакционной смеси. Первоначально в работе для RAPD-анализа был использован 21 праймер. С праймерами P1, G3, G7 и сочетаниями праймеров P2 + P5, P2 + P7, P3 + P6, P4 + P6, P3 + P10 были получены различимые и воспроизводимые в повторных амплификациях результаты. Только RAPD-профили, полученные с этими праймерами, были использованы для дальнейшего анализа.

С используемыми праймерами у отдельных особей было выявлено от 2 до 16 четких фрагментов ДНК размером от 168 до 1400 п. н. Часть RAPD-профилей представлены на рисунке.



RAPD-профили, полученные на ДНК моллюсков *Planorbarius corneus* с использованием праймеров P2+P7 (А), P2+P5 (Б), P4+P6 (В), G7 (Г). Обозначения (здесь и далее): В — всеволжская популяция, Г — гатчинская популяция, К — калининградская популяция, М — ДНК-маркер молекулярных весов 100–1000 п. н. Стрелкой обозначен ПЦР-фрагмент, полученный только на ДНК моллюсков из всеволжской и гатчинской популяций

Число RAPD-фрагментов и процент полиморфных локусов, выявляемых с различными праймерами, представлены в табл. 2. Средний процент полиморфных локусов во всеволжской популяции составляет 59%, в гатчинской популяции — 57,6%, в калининградской популяции — 58,6%. Индекс фенотипического разнообразия Шеннона в них 0,21, 0,23, 0,22 соответственно. Таким образом, показатели фенотипического разнообразия различных популяций по исследованным локусам очень близки. Небольшие зачтения индекса Шеннона такого полиморфного вида, как роговая катушка, могут быть обусловлены небольшими выборками, использованными в исследовании [18].

Таблица 2

Число воспроизводимых RAPD-фрагментов, получаемых на ДНК моллюсков *Planorbarius corneus* из разных популяций и процент полиморфных локусов

Праймеры	<i>P. corneus</i> (В)			<i>P. corneus</i> (Г)			<i>P. corneus</i> (К)		
	F	P	P (%)	F	P	P (%)	F	P	P (%)
G3	10	8	80	3	0	0	6	2	33,3
G7	4	0	0	4	1	25	4	0	0
P1	7	4	57,1	7	6	85,7	8	6	75
P2 + P5	9	0	0	9	0	0	8	0	0
P2 + P7	7	5	71,4	9	7	77,7	10	8	80
P3 + P6	6	5	83,3	6	5	83,3	5	4	80
P4 + P6	6	6	100	7	6	85,7	8	7	87,5
P3 + P10	12	8	66,6	11	9	81,8	9	7	77,8
Всего	61	36	59	59	34	57,6	58	34	58,6

F — число воспроизводимых RAPD-фрагментов, P — число полиморфных локусов, P — процент полиморфных локусов

Для выявления межпопуляционных различий среди моллюсков *P. corneus* наиболее пригодными оказались праймеры G3, G7 (рис. Г), P2 + P5 (рис. Б). RAPD-профили, получаемые с этими праймерами на ДНК роговых катушек из разных популяций, достоверно и воспроизводимо различаются.

Коэффициент подобия, по Дайсу, между моллюсками исследованных популяций рассчитанный по RAPD-профилям, полученным с разными праймерами, сильно отличался (табл. 3). Средний коэффициент подобия между гатчинской и всеволжской популяциями составил 0,81, между гатчинской и калининградской — 0,75, между всеволжской и калининградской — 0,78.

Выявленные межпопуляционные различия являются незначительными. Расхождения в коэффициенте подобия, по Дайсу, сравнимы с различиями лабораторных лилий моллюска *Biomphalaria glabrata*, отличающимися по степени восприимчивости к трематодной инвазии. Коэффициент подобия, по Дайсу, между RAPD-профилями, полученными с праймером G7 на моллюсках чувствительной и резистентной линиях биомфаларий, составил 0,69 [7]. Ранее с использованием праймера G7 были получены данные о RAPD-изменчивости моллюсков *Planorbarius corneus*, незараженных и природнозараженных трематодами. Коэффициент подобия, по Дайсу, между этими группами составил 0,14 [4].

**Коэффициент подобия, по Дайсу,
между популяциями моллюсков *Planorbarius corneus***

Праймеры	P2 + P5		G3		G7	
	Г	В	Г	В	Г	В
К	0,94	0,94	0,75	0,85	0,57	0,57
В	1	–	0,88		0,57	

Наиболее интересный результат был получен с сочетанием праймеров P2+P5, выявляющих единичный фрагмент (235 п. н.), представленный только у представителей популяций, обитающих на территории Ленинградской области (рис. Б). Таким образом, просто визуализация RAPD-профиля на электрофореze позволяет определить область сбора образца.

Таким образом, отобранные в исследовании праймеры (табл. 2) пригодны для выявления генотипических внутривидовых полиморфизмов, а праймеры G7, G3 и P2+P5 могут быть использованы для выявления генетических различий между популяциями. При этом для воспроизведения результата необходимо четкое соблюдение экспериментальных условий.

В настоящее время для видовой идентификации моллюсков широко используются такие методы, как кариотипирование, анализ хромосомных и аллозимных маркеров, вычитающая субстратная гибридизация [10]. Большим преимуществом стандартизированного исследования ДНК методом RAPD-анализа является воспроизводимость и однозначная интерпретируемость получаемых результатов. Именно RAPD-анализ позволяет выявлять конкретные генетические различия. Кроме того, любая информация, полученная в исследовании ДНК со случайными праймерами, — вклад в картирование генома исследуемого вида.

Разработанная методика может быть применена для дальнейшего генотипирования моллюсков *P. corneus* и определения генотипических различий между его популяциями. Для выявления конкретных генетических различий необходимо дальнейшее секвенирование отдельных ПЦР-фрагментов, полученных в реакции амплификации со случайными праймерами.

Работа выполнена в Лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. А. И. Герцена при поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых № МК-2935. 2013.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жадин В. И. Моллюски пресных и солоноватых вод СССР. 1952. 376 с.
2. Кантор Ю. И., Сысоев А. В. Каталог моллюсков России и сопредельных стран. М.: РАН, Ин-т проблем экол. и эвол. им. А. Н. Северцова. 2005. 627 с.
3. Межжерин Д. А., Гарбар А. В., Гарбар Д. А. Систематическая структура комплекса *Planorbarius corneus* S.L. (Gastropoda): анализ аллозимных маркеров и морфометрических признаков // Вестник зоологии. 2005. № 39 (6). С. 11–17.
4. Рыжик М. С. Генотипирование моллюсков *Planorbarius corneus*, зараженных партенитами трематод // Герц. чтения. № 9. СПб.: Теса, 2009. С. 45–47.

5. Стадниченко А. П. Прудовикообразные (пузырчиковые, витушковые, катушковые) // Фауна Украины. Киев: Наук. Думка, 1990. № 29 (4). 292 с.
6. Старобогатов Я. И., Прозорова Л. А., Богатов В. В., Саенко Е. М. Моллюски // Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Т. 6. СПб.: Наука, 2004. С. 9–491.
7. Abdel-Hamid A. H., Rawi S. M., Arafa A. F. Identification of a genetic marker associated with the resistance to *Schistosoma mansoni* infection using RAPD analysis // Mem. Inst. Osw. Cruz. 2006. 101 (8). P. 863–868.
8. Grosberg R. K., Levitan D. R., Cameron B. B. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers. In Molecular Zoology; Advances, Strategies and Protocols. NY: Wiley-Liss. 1996. P. 67–100.
9. Holmes S. P., Witbaard R., Meer J. Phenotypic and genotypic population differentiation in the bivalve mollusc *Arctica islandica*: results from RAPD analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 254. 2003. P. 163–176.
10. Jones C. S., Lockyer A. E., Rollinson D., Noble L. R. Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata*-*Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling. Parasitology. 2001. № 123. P. 181–196.
11. Lewis F. A., Knight M., Richards C. S. A laboratory-based approach to biological control of snails. Mem. Inst. Osw. Cruz. 1997. 92 (5). P. 661–662.
12. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. T. 1–3. NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
13. Simpson A. J., Dias Neto E., Johnston D. A. et al. Recent molecular approaches to the study of schistosome genetics. Exp. Paras. 77 (3). 1993. P. 376–379.
14. Sleem S. H., Ali T. G. Application of RAPD-PCR in taxonomy of certain freshwater bivalves of genus *Caelatura* // Glob. J. Mol. Sciences. 2008. № 3 (1). P. 27–31.
15. Soroka M., Skujienė G. Species identification of slugs of genus *Arion* (Mollusca, Pulmonata) on the basis of genetics studies. Ekol. 57 (2). 2011. P. 70–80.
16. Spada R. G. M., Silva D. da, Abdel-Hamid A-Z., et al. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. Mem. Inst. Osw. Cruz. 97 (1). 2002. P. 53–58.
17. Vidigal T. H. D. A., Spatz L., Kissinger J. C. Analysis of the first and second Internal Transcribed Spacer sequences of ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* complex (Mollusca: Planorbidae). Mem. Inst. Osw. Cruz. 2004. 99 (2). P. 153–158.
18. Wei K. J., Xiong B. X., Zhang G. R. Genetic diversity of five freshwater mussels in genus *Anodonta* (Mollusca: Bivalvia) revealed by RAPD analysis. Acta Hydrob. 2006. № 20. P. 685–691.

REFERENCES

1. Zhadin V. I. Moljuskii presnyh i solonovatyh vod SSSR. 1952. 376 s.
2. Kantor Ju. I., Sysoev A. V. Katalog moljuskov Rossii i sopredel'nyh stran. M.: RAN, In-t problem ekol. i evol. im. A. N. Severtsova, 2005. 627 s.
3. Mezhzherin D. A., Garbar A. V., Garbar D. A. Sistematičeskaja struktura kompleksa *Planorbarius corneus* S.L. (Gastropoda): analiz allozimnyh markerov i morfometričeskikh priznakov // Vestnik zoologii. 2005. № 39 (6). S. 11–17.
4. Ryzhik M. S. Genotipirovanie moljuskov *Planorbarius corneus*, zarazhennyh partenitami trematod // Gerts. chtenija. 9. SPb: 2009. S. 45–47.
5. Stadnichenko A. P. Prudovikoobraznye (puzyrchikovye, vitushkovye, katushkovye) // Fauna Ukrainy. Kiev: Nauk. Dumka, 1990. № 29 (4). 292 s.
6. Starobogatov Ja. I., Prozorova L. A., Bogatov V. V., Saenko E. M. Moljuskii // Opredelitel' presnovodnyh bespozvonochnyh Rossii i sopredel'nyh territorij. T. 6. SPb: Nauka. 2004. S. 9–491.
7. Abdel-Hamid A. H., Rawi S. M., Arafa A. F. Identifitsation of a genetic marker assotsiated with the resistance to *Schistosoma mansoni* infection using RAPD analysis. Mem. Inst. Osw. Cruz. 2006. № 101 (8). P. 863–868.
8. Grosberg R. K., Levitan D. R., Cameron B. B. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers. In Molecular Zoology; Advances, Strategies and Protocols. NY: Wiley-Liss. 1996. P. 67–100.

9. Holmes S. P., Witbaard R., Meer J. Phenotypic and genotypic population differentiation in the bivalve mollusk *Arctica islandica*: results from RAPD analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 254. 2003. P. 163–176.
10. Jones C. S., Lockyer A. E., Rollinson D., Noble L. R. Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata*-*Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling // Parasitology. 2001. № 123. P. 181–196.
11. Lewis F. A., Knight M., Richards C. S. A laboratory-based approach to biological control of snails. Mem. Inst. Osw. Cruz. 1997. 92 (5). P. 661–662.
12. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. T. 1–3. NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
13. Simpson A. J., Dias Neto E., Johnston D. A. et al. Recent molecular approaches to the study of schistosome genetics. Exp. Paras. 1993. 77 (3). P. 376–379.
14. Sleem S. H., Ali T. G. Application of RAPD-PCR in taxonomy of certain freshwater bivalves of genus *Caelatura* // Glob. J. Mol. Sciences. 2008. 3 (1). P. 27–31.
15. Soroka M., Skujienė G. Species identification of slugs of genus *Arion* (Mollusca, Pulmonata) on the basis of genetics studies // Ekol. 57 (2). 2011. P. 70–80.
16. Spada R. G. M., Silva D. da, Abdel-Hamid A-Z., et al. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. Mem. Inst. Osw. Cruz. 2002. 97 (1). P. 53–58.
17. Vidigal T. H. D. A., Spatz L., Kissinger J. C. Analysis of the first and second Internal Transcribed Spacer sequences of ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* complex (Mollusca: Planorbidae). Mem. Inst. Osw. Cruz. 2004. 99 (2). P. 153–158.
18. Wei K. J., Xiong B. X., Zhang G. R. Genetic diversity of five freshwater mussels in genus *Anodonta* (Mollusca: Bivalvia) revealed by RAPD analysis. Acta Hydrob. 2006. 20. P. 685–691.

О. А. Голованова

СИБИРСКИЙ МАКРОРЕГИОН В НОВОЙ РЕГИОНАЛЬНОЙ ПОЛИТИКЕ РОССИИ

Актуализируется значение Сибири в интеграции и в развитии российского пространства. Интерпретируются новые геополитические особенности Сибири, приобретенные с распадом СССР. На основе критического обзора литературы особое внимание уделяется мероприятиям, способствующим реализации поставленных для региона задач.

Ключевые слова: региональная политика, региональное развитие, экономическая стабильность.

O. Golovanova

Siberian Macroregion in New Regional Policy of Russia

The value of Siberia in the integration and development of Russian area is emphasized. The new geopolitical features of Siberia developed with the collapse of the USSR are interpreted. On the basis of the critical literature review, a special attention is paid to the activities promoting the accomplishment of regional development.

Keywords: regional policy, regional development, economic stability.