

Разработка первых микросателлитных маркеров для венской улитки *Caucasotachea vindobonensis* (Gastropoda; Pulmonata)

СЫЧЕВ А.А.¹, ЮСУПОВА А.Ю., СНЕГИН Э.А.

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

¹ Автор-корреспондент, e-mail: sychev@bsu.edu.ru

РЕЗЮМЕ. Методом секвенирования ISSR-фрагментов ДНК венской улитки (*Caucasotachea vindobonensis*), клонированных в вектор pAL2-T, получены последовательности микросателлитных локусов (STR) и фланкирующих их участков. Для девяти выявленных STR-локусов с повторами из 2, 3 и 4 нуклеотидов осуществлен дизайн праймеров, адаптированных для проведения фрагментного анализа. Последующее генотипирование 100 особей венской улитки из различных популяций Восточной Европы позволило оценить аллельное разнообразие вида по обнаруженным STR-локусам. Все локусы давали однозначные генотипы. При этом восемь STR-локусов оказались полиморфными и имели от 2 до 19 аллелей. Полученные данные можно использовать для оценки генетического разнообразия и филогенетического анализа популяций венской улитки, занесенной в Красную Книгу Белгородской области России и охранные списки Европы.

[https://doi.org/10.35885/ruthenica.2024.34\(4\).1](https://doi.org/10.35885/ruthenica.2024.34(4).1)

Development of the first microsatellite markers for the Viennese snail *Caucasotachea vindobonensis* (Gastropoda; Pulmonata)

SYCHEV A.A.¹, YUSUPOVA A. YU., SNEGIN E.A.

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

¹ Corresponding author, e-mail sychev@bsu.edu.ru

ABSTRACT. By sequencing ISSR DNA fragments of the Viennese snail (*Caucasotachea vindobonensis*), cloned into the pAL2-T vector, sequences of microsatellite loci (STR) and their flanking regions were obtained. For the nine identified STR loci with 2, 3 and 4 repeats, the design of primers adapted for fragment analysis was carried out. Subsequent genotyping of 100 individuals of the Viennese snail from various populations of Eastern Europe to estimate the volume allelic diversity of the species based on detected STR loci. All loci yielded unambiguous genotypes. Eight STR loci turn out to be polymorphic and have from 2 to 19 alleles. The data obtained can be used to assess the genetic diversity and phylogenetic analysis of populations of the Viennese snail, listed in the Red Book of the Belgorod region of Russia and the protection lists of Europe.

природных популяций охраняемых и уязвимых видов животных [Snegin, 2012]. Одним из таких видов является венская улитка *Caucasotachea vindobonensis* (C. Pfeiffer, 1828), распространенная по ксерофильным ландшафтам Центральной и Восточной Европы [Shileyko, 1978]. Вид относится к средиземноморской группе моллюсков, является реликтом третичного периода, занесен в региональную Красную Книгу Белгородской области [Red Data Book..., 2019], охранные списки стран Европы [Neubert, 2011], что требует повышенного внимания к контролю состояния его популяционных генофондов, анализу филогенетических отношений и истории формирования его ареала. Особенно это касается популяций, расположенных на границе его видового ареала на территории Среднерусской возвышенности, и являющихся одними из наиболее уязвимых к действию неблагоприятных факторов среды. С другой стороны, в настоящее время *C. vindobonensis* активно распространяется по искусственным природным ландшафтам населенных пунктов (парки, сады) Восточной Европы [Artemyeva, Semenov, 2017; Schikov, 2023]. Что позволяет рассматривать данный вид как модель для исследования адаптации популяционного генофонда в условиях инвазии и интродукции.

Относительно крупные размеры половозрелых особей венской улитки, наличие выраженных полос на раковине и их полиморфизм, удобство

Введение

Оценка генетического разнообразия является важным элементом комплексной работы по изучению жизнеспособности и адаптации

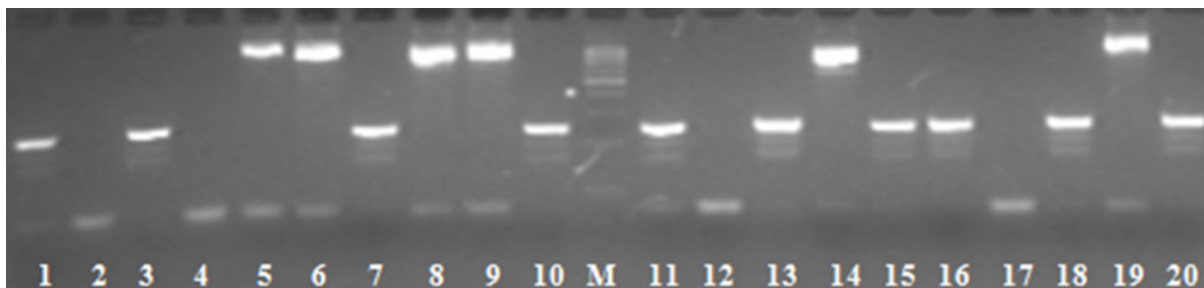


РИС. 1. Результат ПЦР-скрининга клонов *E. coli* на наличие вставки ISSR-фрагментов. М – маркер длин 100+ (Евроген). Клоны 5, 6, 8, 9, 14, 19 содержат плазмиды с целевыми вставками.

FIG. 1. Result of PCR screening of *E. coli* clones for the presence of insertion of ISSR fragments. M – length marker 100+ (Evrogen). Clones 5, 6, 8, 9, 14, 19 contain plasmids with targeted inserts.

сбора способствовали исследованию ее популяционного разнообразия в течение длительного времени. В дальнейшем в качестве генетических маркеров начали использовать биохимические признаки – локусы аллозимов (неспецифические эстеразы, супероксиддисмутаза, малатдегидрогеназа) [Snegin, 2012; Snegin, Tishchenko, 2021]. Данные маркеры с кодоминантным типом наследования позволили получить большие массивы данных о состоянии популяционных генофондов *C. vindobonensis*. Однако влияние естественного отбора на изменчивость биохимических признаков, а также трудоемкость анализа ограничивают их использование. В дальнейшем были разработаны методы анализа полиморфизма непосредственно ДНК, основанные на технологиях RAPD- и ISSR [Snegin, 2011, 2012]. Данные относительно простые подходы позволяют сканировать весь геном и анализировать полиморфизм межмикросателлитных участков. Однако доминантный характер наследования данных маркеров, а также проблемы с воспроизведением результатов, сильно ограничивают их использование.

Одними из наиболее эффективных маркеров для популяционно-генетических исследований являются микросателлитные локусы (STR) [Krapal *et al.*, 2016; Yamamoto *et al.*, 2018; Nishida *et al.*, 2022]. Данные маркеры характеризуются кодоминантным типом наследования, часто селективно-нейтральны и высокополиморфны, а использование мультиплексной ПЦР с флуоресцентно мечеными праймерами и последующим анализом продуктов амплификации на генетическом анализаторе позволяет анализировать одновременно несколько различных маркеров, что экономит материальные и временные ресурсы. В настоящей работе впервые для *C. vindobonensis* охарактеризованы микросателлитные локусы, которые можно использовать в популяционно-генетических, микроэволюционных и филогенетических исследованиях.

Материалы и методы

Для поиска микросателлитных локусов была выбрана особь *C. vindobonensis* из популяции «Никитовка» (50°36,35'87''N, 38°41,54'83''E). Выделение ДНК проводили из тканей мантии набором «ДНК-Экстран-2» (Синтол, Россия) согласно протоколу. Далее проводили амплификацию ISSR-фрагментов, богатых микросателлитными повторами (van der Nest *et al.*, 2000), с использованием праймеров *IT1* (CA)₈GT и *UBC807* (AG)₈T на амплификаторе Veriti (Applied Biosystems, США). Приготовление реакционной смеси проводили по следующему протоколу: 0,25мМ dNTP, 3мМ MgCl₂, 1 ед SynTaq T⁺ ДНК-полимеразы и буфер, 5 пмоль праймера, 50 нг геномной ДНК. Режим амплификации 94°С – 4 мин, после 40 циклов [94°С – 30 с, 55°С – 30 с, 72°С – 60 с], 72°С – 5 мин. Далее анализировали продукты амплификации с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле, вырезали фрагменты геля с ампликонами размером от 500 до 1300 п.о., проводили их очистку с помощью набора CleanUp Standart (Евроген, Россия). Очищенные ISSR-фрагменты клонировали в вектор pAL2-T (Евроген) путем лигирования. Полученной лигазной смесью трансформировали химически компетентные клетки *Eischerichia coli* XL-1 Blue. Трансформантов высевали на селективную среду с ампициллином 100 мкг/мл. Далее проводили ПЦР-скрининг проросших клонов с помощью праймеров M13 Forward

5'-GTTGTA AACGACGGCCAGTG-3'
и M13 Reverse

5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'
(режим амплификации 95°С – 10 мин, далее 35 циклов [94°С – 30 с, 60°С – 30 с, 72°С – 1 мин 30 с], 72°С – 5 мин. Анализ результатов амплификации в 1,5% агарозном геле показал наличие клонов с вставкой ISSR-фрагментов (Рис. 1). Далее проводили посев положительных клонов в 50 мл жидкой питательной среды LB со 100 мкг/

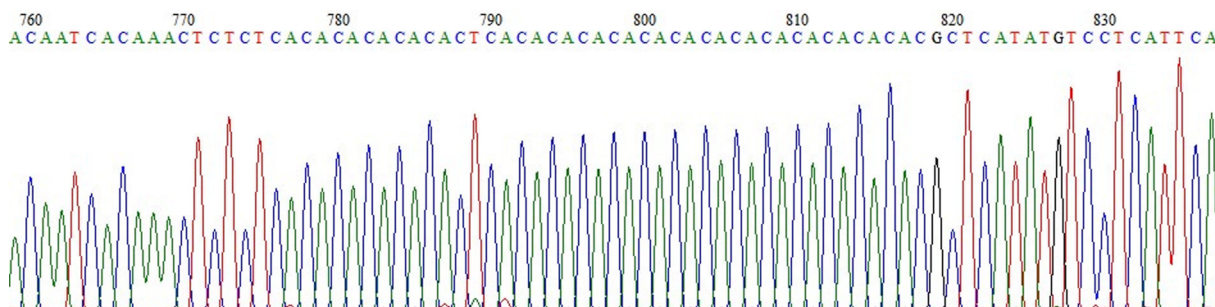


РИС. 2. Результат секвенирования плазмиды pAL2-T_UBC807_9 с выявленной микросателлитной последовательностью [CA]_n.

FIG. 2. The result of sequencing the pAL2-T_UBC807_9 plasmid with the identified microsatellite sequence [CA]_n.

мл ампициллина и их культивирование в течение ночи в шейкере-инкубаторе при 37°C и 250 грм. Из полученных культур проводили выделение плазмидной ДНК с использованием набора Plasmid MiniPrep (Евроген). Далее полученные препараты ДНК использовали для подготовки сиквенсовой реакции.

Каждую полученную плазмиду секвенировали с прямого и обратного концов с помощью праймеров M13 Forward и M13 Reverse соответственно. Для этого на реакцию брали 1,6 пмоль праймера, 1 мкл BigDye Terminator v3.1, 1,5 мкл 5× секвенсового буфера, 200 нг плазмидной ДНК. Полученную реакционную смесь доводили водой до 10 мкл, реакцию проводили в 10 мкл. Далее для наработки меченых фрагментов ДНК проводили секвенсовую реакцию по следующему температурному профилю: 1 цикл 1 мин при 96°C, 25 циклов [10 сек при 96°C, 5 сек при 50°C, 4 мин при 60°C]. После этого проводили электрофорез образцов на генетическом анализаторе ABI3500 (Applied Biosystems), для чего использовали линейку капилляров 50 см и полимер POP7. Полученные данные обрабатывали в программе Sequencing Analysis Software 6 (Applied Biosystems), BioEdit v. 7.1.3.0 [Hall *et al.*, 1999] (Рис. 2), выравнивание прямых и обратных сиквенсов проводили в программе MEGA6 v. 10.2.6 [Kumar *et al.*, 2018].

Дизайн праймеров проводили в онлайн-сервисе OligoAnalyzer IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Проверку качества праймеров осуществляли в программе Primer Pooler v1.84 [Brown *et al.*, 2017]. Синтез праймеров проводили в компании СИНТОЛ (Россия), при этом прямые праймеры были мечены флуоресцентными красками FAM, R6G, ROX или TAMRA.

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 амплифи-

кации: 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), при этом использовали линейку капилляров 36 см, полимер ПДМА-4, а также размерный стандарт СД-450 (СИНТОЛ). Для оценки аллельного разнообразия полученных маркеров на основе коллекционного материала НИЦ геномной селекции НИУ «БелГУ» нами было отобрано по 10 особей *C. vindobonensis* из десяти различных природных популяций Восточной Европы от Донецкого края до севера Среднерусской возвышенности: «Стенки Изгорья» (50°67'94.74''N, 37°80'75.55''E), «Яблоново» (50°22'22.56''N, 38°00'87.29''E), «Макевка» (48°04'65.29''N, 37°96'58.31''E), «Дон» (49°79'13.91''N, 41°12'90.30''E), «Шопино» (50°70'69.94''N, 36°58'46.52''E), «Бекарюковский бор» (50°43'61.13''N, 37°06'41.08''E), «Белгород» (50°57'10.49''N, 36°52'63.18''E), «Орел» (52°97'62.44''N, 36°07'94.71''E), «Кадиевка» (48°57'52.44''N, 38°66'08.01''E), «Острасьевы яры» (50°56'02.62''N, 36°05'98.90''E). Таким образом, общий размер выборки *C. vindobonensis* составил 100 особей. Анализ полученных микросателлитных профилей проводили в программе Gene Mapper Software v4.1 (Applied Biosystems) Рис. 3). Программное обеспечение GenAIEx 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

Всего в результате работы была выделена и отсекуирована плазмидная ДНК от 33 клонов *E. coli* с подтвержденной вставкой ISSR-фрагмента. Из них 23 клон имели вставки уникальных фраг-

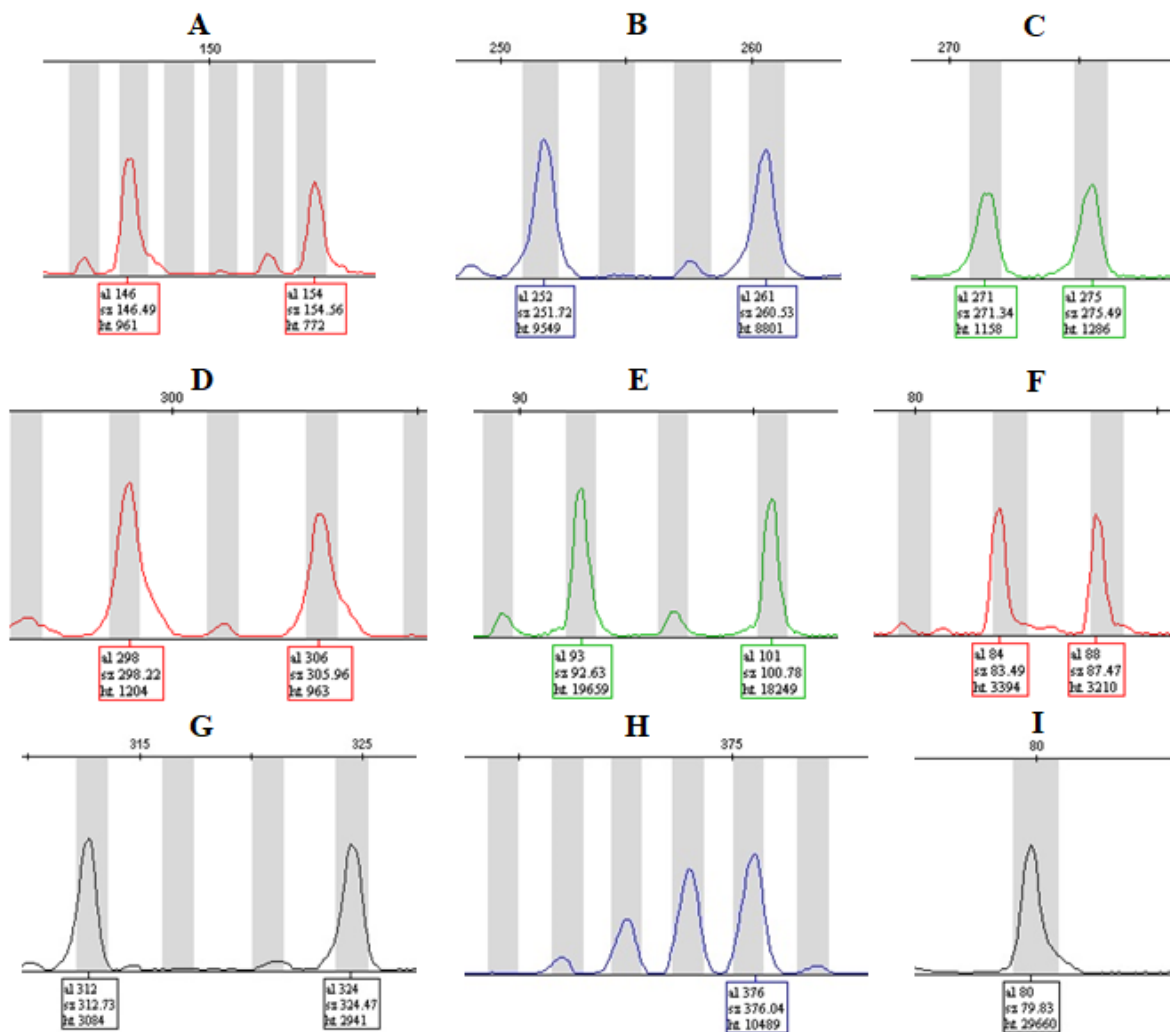


РИС. 3. Результат фрагментного анализа *C. vindobonensis* по микросателлитным маркерам. А – CV-9 (аллели 146 и 154), В – CV-25 (аллели 252 и 261), С – CV-29 (аллели 271 и 275), D – CV-5 (аллели 298 и 306), E – CV-6 (аллели 93 и 101), F – CV-19 (аллели 84 и 88), G – CV-64 (аллели 312 и 324), H – CV-74 (аллель 376), I – CV-M1 (аллель 80).

FIG. 3. The result of the fragmentary analysis of *C. vindobonensis* by microsatellite markers. A – CV-9 (alleles 146 and 154), B – CV-25 (alleles 252 and 261), C – CV-29 (alleles 271 and 275), D – CV-5 (alleles 298 and 306), E – CV-6 (alleles 93 and 101), F – CV-19 (alleles 84 and 88), G – CV-64 (alleles 312 and 324), H – CV-74 (allele 376), I – CV-M1 (allele 80).

ментов ДНК *C. vindobonensis* размером от 512 до 1266 п.о., при анализе которых было выявлено 14 различных микросателлитных последовательностей с числом повторов больше или равном 5. Для разработки микросателлитных маркеров было отобрано девять последовательностей, депонированных нами в базе GenBank NCBI под номерами OR514601-OR514606 и OR514608-OR5146010. Показатели разнообразия для каждого микросателлитного локуса и наблюдаемые диапазоны размеров их аллелей, полученные на основе анализа выборки *C. vindobonensis*, представлены в таблице 1.

Все исследованные маркеры, за исключением CV-M1, являются полиморфными и имеют от 2 до 19 аллелей на локус. При этом по локусам

CV-5 и CV-9 у 12 и 13 особей соответственно полностью отсутствовала амплификация целевых фрагментов. В то же время по остальным локусам у данных особей не было проблем с амплификацией, что говорит о приемлемом качестве препаратов ДНК. Таким образом, частичное отсутствие амплификации свидетельствует о наличии ноль-аллелей в локусах CV-5 и CV-9. Вероятно, это связано с полиморфизмом фланкирующих микросателлитных участков ДНК и неудовлетворительным отжигом праймеров [Dakin, Avise, 2004; Wen *et al.*, 2013]. Повторный дизайн праймеров не позволил улучшить ситуацию. В связи с чем при использовании данных маркеров для оценки генетической изменчивости необходимо проводить корректировку частот аллелей

Таблица 1. Последовательности праймеров и характеристика девяти микросателлитных локусов *C. vindobonensis*.Table 1. Primer sequences and characterization of nine microsatellite loci of *C. vindobonensis*.

Локус (Номер GenBank)	Мотив	Последовательности праймеров (5'-3')	Диапазон длин	Na	Ho	He	PHW
CV-9 (OR514601)	[CA] _n	F: (ROX) CAGTTATGCACGCACTCAGTAC R: GCCTTGCTGTATGTGAATGAG	140-154	6*	0,12	0,6	0
CV-25 (OR514602)	[GAA] _n	F: (FAM) TATCTGTCTGTAATCGGCACAAC R: TTCAACCTCAAAGAGAAGTCCAC	252-324	11	0,39	0,77	0
CV-29 (OR514603)	[GACA] ₈	F: (R6G) AACATCTCACACAACATGTGAATG R: GTATACCTACGAACTTGCCTGC	271-275	2	0,01	0,01	0,96
CV-5 (OR514604)	[GGTA] ₁₆	F: (ROX) GCAGGCAAGTTCGTAGGTATAC R: GTGACTCACTCGGTACAGTTTAG	290-310	5*	0,17	0,64	0
CV-6 (OR514605)	[ACTA] ₅	F: (R6G) TTCGATGTGCAATGAGGATGATC R: GGGACCTACGTAGTCAAGAAGA	77-101	4	0,21	0,44	0
CV-19 (OR514606)	[GATT] ₁₀	F: (ROX) AGTAATTGATTAATTGTTTGACCGA R: AAGCTTTACAGAGGAATCAATC	80-100	6	0,35	0,62	0
CV-64 (OR514608)	[TCAA] _n	F: (TAMRA) AGCGATGTCCAGAATAGGATATG R: TCATGCTATAGGCACTCGTTTAG	312-332	6	0,34	0,61	0
CV-74 (OR514609)	[GTA] _n	F: (FAM) TAACAGGCACAACGCAACTAC R: ATGTCATGCGGATGGGAAATTC	352-412	19	0,63	0,89	0
CV-M1 (OR514610)	[GCA] ₆	F: (TAMRA) CAACTGGATCAACAACACTAAC R: GTAATGGAGCTGCCTCTGTT	80	1	0	0	-

Примечание: Na – число аллелей, * – присутствуют ноль-аллели, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, PHW – значение P теста на равновесие Харди-Вайнберга.

в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга [Wen *et al.*, 2013].

При анализе частот генотипов по большинству исследованных локусов наблюдается значительное отклонение от распределения Харди-Вайнберга в связи с дефицитом гетерозигот. В ряде работ показано, что дефицит гетерозигот по микросателлитным локусам у животных может быть результатом присутствия ноль-аллелей [Reese *et al.*, 2004], действия отбора [McKeown *et al.*, 2017], инбридинга [Kaplanova *et al.*, 2012] и эффекта Валунда [Gautier *et al.*, 2019]. За исключением локусов CV-5 и CV-9 с установленными ноль-аллелями, дефицит гетерозигот по большинству остальных локусов сложно объяснить действием отбора или близкородственным скрещиванием. В связи со сборным характером анализируемой выборки особей *C. vindobonensis* из различных географически удаленных популяций, как инвазивных, так и аборигенных, на полученные результаты наиболее вероятно оказывает влияние эффект Валунда. В свою очередь, это указывает на генетическую разнородность популяций *C. vindobonensis* Восточной Европы и необходимость их дальнейшего популяционно-генетического анализа на основе полученных микросателлитных маркеров.

Таким образом, в настоящей работе у венской улитки были впервые выявлены пролиморфные микросателлитные локусы, которые можно использовать при оценке состояния популяционных генофондов аборигенных и инвазивных популяций данного вида.

Литература

- Artemyeva E.A., Semenov D.Yu. 2017. On the state of the population of the Viennese snail *Cepaea vindobonensis* (C. Pfeiffer, 1828) (Mollusca: Gastropoda: Helicidae) in the city of Ulyanovsk. *Nature of the Simbirsk Volga region. Collection of scientific works of the 19th interregional scientific and practical conference (Natural scientific research in the Simbirsk-Ulyanovsk region)*. Ulyanovsk, 18: 81–84 [In Russian].
- 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.
- Dakin E.E., Avise J.C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(5): 504–509.
- 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.
- 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.
- Kaplanova K., Putnova L., Bryndova M., Bartonova P., Vrtkova I., Dvorak J. 2012. Microsatellite variability in nutria (*Myocastor coypus*) genetic resource in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 57(4): 171–177.
- 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.
- McKeown N.J., Hauser L., Shaw P.W. 2017. Microsatellite genotyping of brown crab *Cancer pagurus* reveals fine scale selection and ‘non-chaotic’ genetic patchiness within a high gene flow system. *Marine Ecology Progress Series*, 566: 91–103.
- Neubert, E. (2011). *Cepaea vindobonensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Available online at <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T156371A4934517.en>. [Accessed on 14 December 2023.]
- 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. GenAIEx 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, 668 p. [In Russian]
- Reece K.S., Ribeiro W.L., Gaffney P.M., Carnegie R.B., Allen S.K. 2004. Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): confirmation of null alleles and non-mendelian segregation ratios. *Journal of Heredity*, 95(4): 346–352.
- Shchikov E.V. 2023. First discovery of *Caucasotachea vindobonensis* (Ferussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda, Helicidae) in the Southern Urals. *Materials of the XI All-Russian Scientific and Practical Conference «Concepts, tools and technologies for the development of modern science and technology»*. Stavropol: 65–66. [In Russian].
- Shileyko A.A. 1978. Terrestrial mollusks of the superfamily Helicidae. *Fauna SSSR, Molluski*, 3(6): 1–384 [In Russian].
- Snegin E.A. 2011. Vitality estimation of the *Cepaea vindobonensis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) especially protected species populations in the conditions of the Central Russian Upland forest-steppe south. *Vestnik KrasGAU*, 11: 142–148 [In Russian].
- Snegin E.A. 2012. *Spatial and temporal aspects of the ecological and genetic structure of invertebrate populations (on the example of terrestrial mollusks and insects in the south of the Central Russian Upland)*. Abstract of the dissertation of Doct. biol. sciences. Belgorod. 41 p. [In Russian].
- Snegin E.A., Tishchenko A.Yu. 2021. Long-term dynamics of morphogenetic indicators of the terrestrial mollusk *Cepaea vindobonensis* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae) in the Bekaryukovsky bor natural monument, Russia. *Nature Conservation Research*, 6(3): 58–72 [In Russian].
- 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.