

DOI 10.35694/YARCX.2020.52.4.005



ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АБОРИГЕННЫХ И ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ВИДОВ МОЛЛЮСКОВ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ЧЁРНОМ МОРЕ

Е.Е. Слынько (фото)

к.б.н., старший научный сотрудник
ФГБУН ФИЦ Институт биологии южных морей
имени А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь
ФГБУН Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Панина РАН, п. Борок
доцент кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО Ярославская ГСХА,
г. Ярославль

Ю.В. Слынько

к.б.н., ведущий научный сотрудник
ФГБУН ФИЦ Институт биологии южных морей
имени А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь

**Молекулярно-
генетическая
идентификация,
16S рРНК мтДНК,
COI мтДНК,
тихоокеанская устрица
(*Crassostrea gigas*), мидия
(*Mytillus galloprovincia-
lis*), средиземноморский
гребешок (*Flexopecten
glaber*)**

*Molecular genetic
identification, 16S rRNA
mtDNA, COI mtDNA,
Pacific oyster (*Crassostrea
gigas*), mussel (*Mytillus
galloprovincialis*),
Mediterranean scallop
(*Flexopecten glaber*)*

В настоящее время в Чёрном море с высокой степенью интенсивности выращиваются три вида двустворчатых моллюсков: тихоокеанская, или гигантская, устрица (*Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)), интродуцированная в бассейн Средиземного моря, и в частности в Чёрное море, из Дальневосточных морей и два вида аборигенов – мидия (*Mytillus galloprovincialis* Lamarck, 1819) и средиземноморский гребешок (*Flexopecten glaber* (Linnaeus, 1758)). В отношении всех трёх видов с позиций оценок биоразнообразия выявляются две основные проблемы – точное установление таксономического разнообразия и тенденции в изменениях генетического разнообразия.

Тихоокеанская устрица *Crassostrea gigas* в настоящее время является основным объектом выращивания мирового устрицеводства. В Чёрное море гигантская устрица была интродуцирована в 80-е годы XX века взамен исчезающего вида *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) [1]. До этого времени устричная фауна Чёрного моря была представлена двумя видами: скальная устрица *Ostrea lamellose* (Brocchi, 1814) и съедобная устрица *O. edulis* [2]. Последнюю активно промышленно разводят в Чёрном море, а с 1880-х годов собирали в море и подращивали в садках на устричных заводах. При общей деградации промышленного разведения устриц, переэксплуатации природных устричных банок, массового распространения раковинной болезни устриц и вселение хищного брюхоногого моллюска (рапаны) произошло почти полное исчезновение *O. edulis* практически по всей прибрежной акватории Чёрного моря. Для культивирования в Чёрном море гигантская устрица *C. gigas* сначала была завезена из Японского моря, а в дальнейшем – из питомников на побережье Нормандии, Южной Франции и Испании. Следует заметить, что среди атлантических

устриц имеется вид, морфологически схожий с тихоокеанской устрицей, – португальская устрица *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819).

Распространённая в Средиземноморском бассейне, в том числе в Чёрном море, мидия *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) вместе с *M. edulis* (атлантическая мидия) и *M. trossulus* (балтийская мидия) входит в состав таксономического комплекса видов «голубая мидия». Таксономический статус этих трёх видов долгое время дискутировался. Генетическими методами удалось закрепить за *M. galloprovincialis*, *M. edulis* и *M. trossulus* звание самостоятельных видов, однако возможность межвидовой гибридизации, приводящей к формированию гибридных зон на границах ареалов, существенно затрудняет биологические исследования [3]. Предполагается, что за счёт гибридизации атлантической популяции мидии свойственна обширная интрогрессия мтДНК *M. edulis*. В Чёрном и Азовском морях мидия представлена исключительно *M. galloprovincialis*.

Pectinidae – одно из наиболее богатых по числу видов семейство двусторчатых моллюсков, характеризующееся широкими экологическими диапазонами обитания и высоким уровнем морфологической пластичности. Также многие виды гребешков, в частности средиземноморские виды рода *Flexopecten* повсеместно используются в коммерческих целях, как ценный пищевой продукт. Согласно современным взглядам, в Чёрном море представлен только подвид *Flexopecten glaber ponticus* средиземноморского гребешка *Flexopecten glaber* [2], который был квалифицирован, как эндемик Чёрного моря, хотя некоторые авторы настаивают на самостоятельном видовом статусе *Flexopecten ponticus* (Bucquooy, Dautzenberg et Dolfus, 1889) [4].

Соответственно основной задачей нашей работы было с применением молекулярно-генетического подхода установить таксономический состав устриц, мидий и гребешков на коллекторах марикультурных хозяйств Крымского побережья Чёрного моря, а также определить параметры генетической изменчивости нуклеотидных последовательностей в культивируемых популяциях этих моллюсков.

Материал и результаты исследования

Основной материал для анализа устриц взят из питомника ИМБИ РАН (г. Севастополь), мидий – с коллекторов устрично-мидийного хозяйства в бухте Кацивели и гребешка – с коллекторов

хозяйства в бухте Донузлав. Молекулярно-генетическую идентификацию моллюсков проводили по нуклеотидной изменчивости генов митохондриальной ДНК 16S и COI для устриц, COI – для мидий и 16S – для гребешка. Оценку генетической изменчивости по каждому гену и в каждой популяции осуществляли по параметрам гаплотипического и нуклеотидного разнообразия.

Представленные данные надёжно свидетельствуют, что все проанализированные устрицы из питомника ИМБИ могут быть отнесены к виду *Crassostrea gigas* (рис. 1а). Об этом неопровержимо свидетельствуют как филогенетические отношения, так и значения *p*-расстояний. Среди гаплотипов *C. gigas*, выявляемых в питомнике ИМБИ как по COI, так и по 16S, обнаруживаются особи, как специфические для Атлантики, так и для Тихого океана. Примечательно, что среди немногочисленных гаплотипов COI из питомника ИМБИ выявлен ранее не известный гаплотип (MF663324), каковой может полагаться специфическим для крымской популяции культивируемых *C. gigas* [5]. Наиболее близким видом может считаться португальская устрица. Однако данные по обоим генам свидетельствуют, что наши особи относятся к виду *C. gigas*, а не к виду *C. angulata*, что можно было предполагать, учитывая последние данные по устрицам острова Тайвань и прилегающего побережья материкового Китая [6]. Присутствие *O. edulus* среди проанализированного материала также не отмечено.

Три вида *M. galloprovincialis*, *M. edulis* и *M. trossulus* часто объединяют под общим названием комплекс «голубой мидии» за счёт их способности к межвидовому скрещиванию [3]. *M. californuanus* является ближайшим видом, не способным к такой гибридизации. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI исследуемых особей при соотношении с последовательностями *M. edulis* и *M. trossulus* не формировали отдельную кладу, в отличие от *M. californuanus*. Это позволяет вполне уверенно отнести исследованных нами особей к комплексу «голубой мидии» (рис. 1б). Идентификация особей как *M. galloprovincialis* возможна исходя из литературных данных. Для определения видов внутри рода *Mytilus* используют ген адгезивного белка, и ранее в черноморском регионе неоднократно было показано наличие только чистого вида.

Все изученные экземпляры гребешка из Донузлава были идентифицированы по гену 16s как вид *Flexopecten glaber* и одновременно как вид

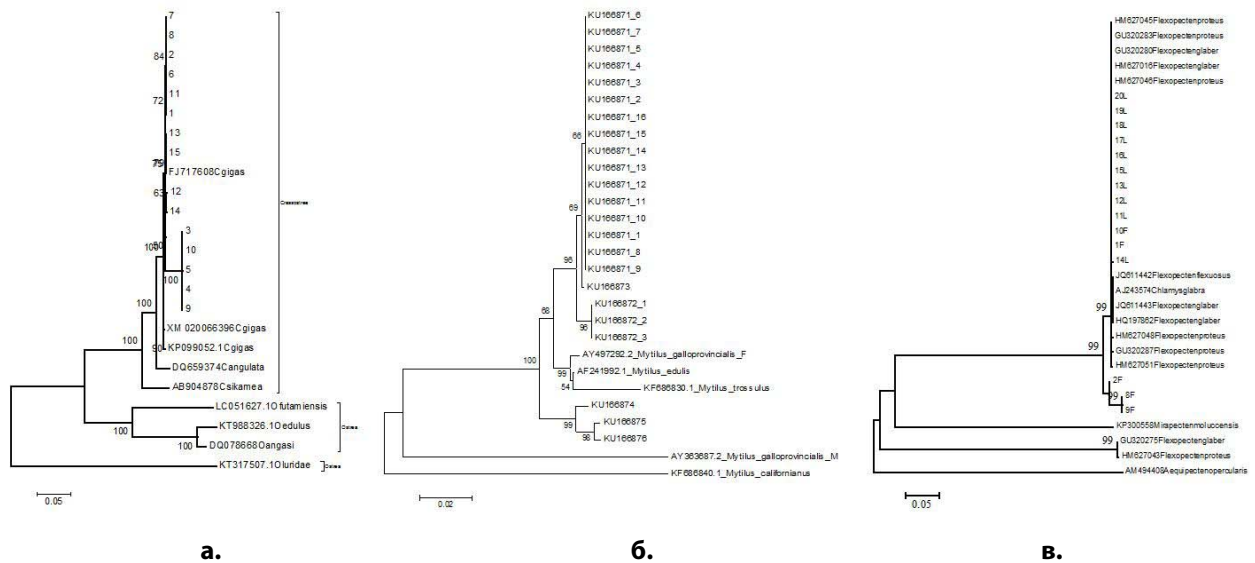


Рисунок 1 – Древа, построенные методом Neighbor-Joining на основании данных о нуклеотидной последовательности фрагментов генов б5 и COI особей устриц (а), мидий (б) и гребешка (в) из Черноморских коллекторов. Данные по устрице и мидии взяты из [7] и [8]. Остальные ветви обозначены регистрационными номерами фрагментов из NCBI. Для последовательностей, взятых из международной базы NCBI, обозначена видовая принадлежность. Числовые значения на разветвлениях отражают уровень бутстреп поддержки

F. proteus (рис. 1в). Если экземпляры из Донузлава имели *p*-расстояние от *F. glaber* 0.2%, то от *F. proteus* – 0.1%. Вероятней всего данные цифры свидетельствуют, что виды *F. glaber* и *F. proteus* входят в один таксономический комплекс. Это представление согласуется с мнением основных исследователей средиземноморских гребешков, вплоть до того, что они полагают необходимым считать эти два сестринских вида таксономическими синонимами [9]. Таким образом, по нашим данным, именно этот гребешок присутствует в мариккультуре Чёрного моря.

Особого предмета изучения требуют параметры генетической изменчивости, поскольку проанализированный материал по исследованным локусам показал существенные снижения

уровней генетического разнообразия у всех трёх видов (табл. 1). Снижение гаплотипического разнообразия в случае устрицы, с одной стороны, может быть эффектом незначительного объёма выборки, однако с другой, и что более вероятно – это результат действия эффектов основателя и соответственно высокой степени инбридинга. С другой стороны, этому, в принципе очевидному утверждению, противоречит тот факт, что был обнаружен новый гаплотип и сформирован специфичный для анализируемой группы субкластер, не имеющий аналогов среди мировых популяций *Crassostrea gigas*.

Изучение генетического разнообразия по COI между *M. galloprovincialis*, *M. edulis* и *M. trossulus* существенно затруднено из-за возможности интрогрессии и рекомбинации мтДНК,

Таблица 1 – Параметры генетической изменчивости по локусам мтДНК у трёх культивируемых видов двусторчатых моллюсков

Вид	N	h	Hd	S	Pi
<i>Crassostrea gigas</i>	15	3	0,448	4	0,0021
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	15	6	0,514	23	0,012
<i>Flexopecten glaber</i>	15	4	0,467	18	0,012

Условные обозначения: N – число изученных особей, h – число гаплотипов, Hd – гаплотипическое разнообразие, S – количество полиморфных сайтов, Pi – нуклеотидное разнообразие.

сопровождающейся формированием общих гаплотипов. Генетическое разнообразие мтДНК собственно *M. galloprovincialis* обусловлено существованием двух митохондриальных геномов: женского и мужского. Уровень различий между наследственными линиями значителен, и для *M. galloprovincialis* достигает 20%. Так как для выделения использовали соматические ткани, исследуемые фрагменты COI отнесли к мтДНК F-типа. Дополнительно было показано, что они формировали один кластер с женскими последовательностями из базы NCBI. Однако вероятнее всего, падение гаплотипического разнообразия у мидии вызвано проведением ассортативного отбора при формировании коллекторной популяции.

У гребешка, скорее всего, падение гаплотипического разнообразия, как и в случае мидии, вызвано ассортативностью скрещивания и отбором особей для коллекторного выращивания. Причём, наиболее вероятно именно последнее обстоятельство, поскольку гребешок – синхронный гермафродит с возможностью самооплодотворения. В наибольшей степени предложенные объяснения снижения гаплотипического разнообразия подтверждаются данными по уровням нуклеотидного разнообразия. Для чужеродного вида тихоокеанской устрицы, подвергшейся «эффекту основателя и действию горлышка бутылки», отмечено наиболее сильное падение нуклеотидного разнообразия – до 0.002, тогда как у аборигенных для Чёрного моря видов мидии и гребешка хотя и зафиксировано падение нуклеотидного разнообразия по сравнению со средиземноморскими и атлантическими популяциями, однако оно не столь значительно. В целом уровень нук-

леотидного разнообразия у обоих видов аборигенов не ниже 0.012. Также не следует забывать, что и мидия и гребешок – сравнительно недавние обитатели Чёрного моря (с периода не более 18 тыс. лет назад), после формирования современного Чёрного моря и окончательного его соединения со Средиземным (порядка 8 тыс. л.н.).

Вывод

Таким образом, мы можем с уверенностью утверждать, что на рассмотренных коллекторах марикультуры в Чёрном море обитают следующие виды двустворчатых моллюсков: *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* и *Flexopecten glaber*. Все они характеризуются существенным падением гаплотипического разнообразия, а чужеродный вид – тихоокеанская устрица – ещё и снижением нуклеотидного разнообразия.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке в рамках гос. тем № АААА-А18-118020790229-7 «Структурно-функциональная организация, продуктивность и устойчивость морских пелагических экосистем», № АААА-А18-118021350003-6 «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса», № АААА-А18-118012690105-0 «Фауна, систематика и биология водных беспозвоночных континентальных вод» и № АААА-А16-116090850007-7 «Повышение эффективности использования биологических и породных ресурсов различных видов домашних и сельскохозяйственных животных, рыб и птиц».

Литература

1. Орленко, А.Н. Гигантская устрица *Crassostrea gigas* (Bivalvia, Mytiloformes, Crassostreidae) как объект акклиматизации и основные этапы её трансплантации в Чёрное море [Текст] / А.Н. Орленко // Зоол. Журнал. – 1994. – 73. Вып. 1. – С. 51–54.
2. Скарлато, О.А. Класс двустворчатые моллюски. Bivalvia. Определитель фауны Чёрного и Азовского морей [Текст] / О.А. Скарлато, Я.И. Старобогатов. – Киев: Наукова думка, 1972. – Т. 3. – С. 178–250.
3. Bierne, N. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* [Text] / N. Bierne, P. Borsa, C. Daguin et al. // Molecular Ecology. – 2003. – V. 12. – № 2. – P. 447–461.
4. Анистратенко, О.Ю. Новые данные по биостратиграфии палеоген-неогеновых отложений Альминской впадины Крыма [Текст] / О.Ю. Анистратенко, Ю.В. Вернигорова, В.А. Коваленко, С.А. Люльева, Э.М. Османов, С.Я. Рамский, Т.С. Рябоконт // Проблеми стратиграфії і кореляції фанерозойських відкладів України: Матеріали XXXIII сесії Палеонтологічного товариства НАН України. Київ. – 2011. – С. 81–82.
5. Slynko, Y.V. Mitochondrial DNA Barcoding of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Mollusca: Bivalvia: Ostreidae), Cultivated in the Black Sea [Text] / Y.V. Slynko, E.E. Slynko, A.V. Pirkova, L.V. Ladygina, V.I. Ryabushko // Russian Journal of Genetics. – 2018. – V. 54. – P. 1445–1451.

6. Hsiao, Sh.-T. DNA barcoding reveals that the common cupped oyster in Taiwan is the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* (Ostreoida; Ostreidae), not *C. gigas* [Text] / Sh.-T. Hsiao, Sh.-Ch. Chuang, K.-S. Chen et al. // *J. Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – P. 1–11.

7. Слынько, Ю.В. Генетическая изменчивость по локусу COI мтДНК различных по окраске раковинных фенотипов черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) [Текст] / Ю.В. Слынько, А.Д. Куликова, Е.Е. Слынько, А.А. Солдатов // *Генетика*. – 2018а. – Том 54. – № 8. – С. 931–937.

8. Слынько, Ю.В. Баркодинг митохондриальной ДНК тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Mollusca : Bivalvia : Ostreidae), культивируемой в Черном море [Текст] / Ю.В. Слынько, Е.Е. Слынько, А.В. Пиркова, Л.В. Ладыгина, В.И. Рябушко // *Генетика*. – 2018б. – Т. 54. – № 12. – С. 1445–1451.

9. Imsiridou, A. Mitochondrial DNA Variation as a Tool for Systematic Status Clarification of Commercial Species – The Case of Two High Commercial Flexopecten Forms in the Aegean Sea. *Aquaculture* [Text] / A. Imsiridou, N. Karaiskou, E. Aggelidou, V. Katsares, S. Galinou-Mitsoudi // Z. A. Muchlisin (Ed.). London: IntechOpen. ch. – 2012. – 7. – P. 109–126. DOI: 10.5772/29426.

References

1. Orlenko, A.N. Gigantskaja ustrica *Crassostrea gigas* (Bivalvia, Mytiloformes, Crassostreidae) kak ob#ekt akklimatizacii i osnovnye jetapy ejo transplantacii v Chjornoe more [Текст] / A.N. Orlenko // *Zool. Zhurnal*. – 1994. – 73. Вып. 1. – С. 51–54.

2. Skarlato, O.A. Klass dvustvorchatye molljuski. Bivalvia. Opredelitel' fauny Chjornogo i Azovskogo morej [Текст] / O.A. Skarlato, Ya.I. Starobogatov. – Kiev: Naukova dumka, 1972. – Т. 3. – С. 178–250.

3. Bierne, N. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* [Text] / N. Bierne, P. Borsa, C. Daguin et al. // *Molecular Ecology*. – 2003. – V. 12. – № 2. – P. 447–461.

4. Anistratenko, O.Yu. Novye dannye po biostratigrafii paleogen-neogenovyh otlozhenij Al'minskoj vpadiny Kryma [Текст] / O.Yu. Anistratenko, Yu.V. Vernigorova, V.A. Kovalenko, S.A. Lyul'eva, Eh.M. Osmanov, S.Ya. Ramskij, T.S. Ryabokon' // *Problemi stratigrafii i koreljacii fanerozojs'kih vidkladiv Ukraïni: Materiali XXXIII sesii Paleontologichnogo tovaristva NAN Ukraïni. Kiïv*. – 2011. – С. 81–82.

5. Slynko, Y.V. Mitochondrial DNA Barcoding of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Mollusca: Bivalvia: Ostreidae), Cultivated in the Black Sea [Text] / Y.V. Slynko, E.E. Slynko, A.V. Pirkova, L.V. Ladygina, V.I. Ryabushko // *Russian Journal of Genetics*. – 2018. – V. 54. – P. 1445–1451.

6. Hsiao, Sh.-T. DNA barcoding reveals that the common cupped oyster in Taiwan is the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* (Ostreoida; Ostreidae), not *C. gigas* [Text] / Sh.-T. Hsiao, Sh.-Ch. Chuang, K.-S. Chen et al. // *J. Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – P. 1–11.

7. Slyn'ko, Yu.V. Geneticheskaja izmenchivost' po lokusu SOI mtДНК razlichnyh po okraske rakovinyh fenotipov chernomorskih midij *Mytilus galloprovincialis* Lam. (MOLLUSCA: BIVALVIA: MYTILIDAE) [Текст] / Yu.V. Slyn'ko, A.D. Kulikova, E.E. Slyn'ko, A.A. Soldatov // *Генетика*. – 2018а. – Том 54. – № 8. – С. 931–937.

8. Slyn'ko, Yu.V. Barkoding mitohondrial'noj DNK tihookeanskoj ustrycy *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Mollusca : Bivalvia : Ostreidae), kul'tiviruemoj v Chernom more [Текст] / Yu.V. Slyn'ko, E.E. Slyn'ko, A.V. Pirkova, L.V. Ladygina, V.I. Ryabushko // *Генетика*. – 2018б. – Т. 54. – № 12. – С. 1445–1451.

9. Imsiridou, A. Mitochondrial DNA Variation as a Tool for Systematic Status Clarification of Commercial Species – The Case of Two High Commercial Flexopecten Forms in the Aegean Sea. *Aquaculture* [Text] / A. Imsiridou, N. Karaiskou, E. Aggelidou, V. Katsares, S. Galinou-Mitsoudi // Z. A. Muchlisin (Ed.). London: IntechOpen. ch. – 2012. – 7. – P. 109–126. DOI: 10.5772/29426.