

Вороной Н.О.¹, Никитенко А.Ю.², Атопкин Д.М.^{1,2}¹Дальневосточный Федеральный университет²Биолого-почвенный институт ДВО РАН

voronoy_n@mail.ru

ПРИМОРСКИЕ ЭСТУАРНЫЕ ПОСЕЛЕНИЯ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *CORBICULA JAPONICA PRIME*, 1864 ОБЛАДАЮТ НИЗКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТЬЮ ГЕНА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ (I)

Впервые дана оценка внутривидовой генетической изменчивости эстуарного двустворчатого моллюска *Corbicula japonica Prime*, 1864 из разных водоемов Приморского Края Дальнего Востока России по данным частичного секвенирования гена первой субъединицы цитохром оксидазы (COI) митохондриальной ДНК. Сравнительный анализ генотипов позволил установить принадлежность исследуемых особей к япономорской гаплогруппе *C. japonica*. Установлено, что исследуемый участок гена COI высоко консервативен у образцов из географически удаленных локаций, что, с одной стороны, может указывает на принадлежность всех особей к одному виду, *C. japonica* и с другой стороны – на недавнее вселение моллюсков в эстуарии юга Приморья.

Ключевые слова: *Corbicula japonica*, Приморский Край, секвенирование ДНК, ген COI, генетическая изменчивость, гаплогруппы.

Двустворчатые моллюски рода *Corbicula* Megerle et Muhlfield, 1811 представляют собой группу небольших по размерам пресноводных и солоноватоводных и моллюсков. Природный ареал корбикул охватывает значительную область, от Африки и Ближнего Востока, до Австралии и о. Сахалин, распространяясь практически по всей Азии. Корбикулы широко распространены в стоячих и проточных пресноводных системах российского Дальнего Востока, образуя значительные скопления в эстуариях, лиманах, лагунах, озерах и реках Приморского, Хабаровского краев и Сахалинской области [1]. В последние десятилетия дальневосточных корбикул активно добывают и экспортируют в страны Юго-Восточной Азии.

Для успешного долголетнего ведения промысла и сохранения биоразнообразия необходимо понимание популяционно-генетической структуры вида. Определение реальной подразделенности вида на дискретные единицы воспроизводства позволяет разделить общую величину сырьевых запасов вида на запасы, приуроченные к отдельным участкам ареала, равномерно распределить промысловую нагрузку на локальные группировки, не нарушая способности этих группировок к восстановлению. В Японии и Корее генетическая структура популяций основных коммерчески ценных видов корбикул исследована достаточно подробно [2,3,4,5], при этом полностью отсутству-

ют аналогичные исследования российской части ареала корбикул.

Типичным представителем солоноватоводных моллюсков рода *Corbicula* на юге Дальнего Востока России является *Corbicula japonica Prime*, 1864. Этот вид распространен в эстуариях рек, впадающих в Японское море от Восточно-Корейского залива до западного побережья о. Сахалин. Однако для водоемов Приморского края являются валидными еще 4 вида корбикул [6], при этом определение описанных видов затруднительно ввиду изменчивости признаков раковины, используемых для межвидовой диагностики.

Поэтому целью данной работы было оценить генетическое разнообразие массовых эстуарных скоплений корбикул Приморского края для установления их видовой принадлежности.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили 78 особей *C. japonica*, собранных в 7 эстуарных водоемах Приморского края (табл. 1, рис. 1). Тотальную ДНК выделяли из тканей мышц, фиксированных в 96% этаноле, методом фенол-хлороформной экстракции по стандартному протоколу [7]. Наличие и качество выделенной ДНК проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием. Визуализацию ДНК проводили в УФ свете с помощью гель-документирующей системы

XRII, BioRad. Амплификацию участка гена COI проводили с помощью универсальных праймеров LCO1490 (5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TT 3') и HCO2198 (5' TAA ACT TCA GGG TGA CCAAAA AA 3') в условиях, описанных ранее [8].

ПЦР-продукты были секвенированы с использованием набора Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя. Детекцию продуктов сиквенсовой реакции осуществляли в генетическом анализаторе GA 3130xl

Таблица 1. Исследованные популяции *S. japonica* Приморского края

Шифр	№	Место сбора	Район	Координаты	
				Широта	Долгота
ЗЛ	1	зал. Лебединый, устье	Хасанский	42°35'52"	130°43'57"
ЛМ	4	зал. Лебединый, мост	Хасанский	42°34'41"	130°41'47"
ГУ	9	р. Гладкая, устье	Хасанский	42°42'6"	130°50'17"
Г	4	р. Гладкая, протока	Хасанский	42°42'2"	130°52'50"
ЛУ	4	лаг. Лебяжья, устье	Хасанский	42°58'56"	131°29'14"
КС	25	р. Киевка, старое русло	Лазовский	42°51'42"	133°40'30"
КН	19	р. Киевка, новое русло	Лазовский	42°51'43"	133°38'38"
РУ	3	р. Раздольная	Надеждинский	43° 19'28"	131°49'56"
РП	3	р. Раздольная	Надеждинский	43°27'1"	131°50'58"
П	3	р. Партизанская	Партизанский	42°51'43"	133°0'57"
ТП	3	оз. Пресное	Ольгинский	43°52'10"	135°28'54"



Рисунок 1. Карта-схема расположения исследованных выборок из эстуарных водоемов Приморского края (шифр мест сбора см. табл.1)

(Applied Biosystems) на базе Кафедры клеточной биологии и генетики ДВФУ.

Сборку консенсусных последовательностей выполняли в программе SeqScape v. 2.6 (Applied Biosystems). Выравнивание последовательностей выполняли с помощью модуля Clustal W, встроенного в пакет MEGA 5.0 [9]. Оценку генетической дивергенции проводили путем расчета p -дистанций в пакете MEGA 5.0. Филогенетические связи были реконструированы с помощью методов ближайшего соседа, максимальной парсимонии, максимального правдоподобия в программе PAUP 4.b.10 [10] и байесового моделирования с использованием эволюционной модели Тамуры-Нея (TrN+G+I) с гамма - распределением нуклеотидных замен и расчетом пропорции инвариантных сайтов [11] в программе Mr.Bayes 3.1.2 [12]. Выбор оптимальной эволюционной модели осуществляли с помощью информационного критерия Акейки [13] в программе Modeltest 3.7 [14]. Тест на дифференциацию AMOVA выполняли с помощью программы Arlequin v. 3.11 [15]. Достоверность филогенетических связей оценивали с помощью бутстреп анализа с использованием 1000 репликаций [16].

Результаты

Длина секвенированного участка, использованного для анализа, составила 450 пн. Значения p -дистанций между последовательностями гена *COI* у образцов *C. japonica* из разных географических локаций варьировали от 0 до 0.5%, составляя в среднем $0.16\% \pm 0.08\%$. Максимальное значение дивергенции выявлено между популяциями *C. japonica* из разных водоемов Хасанского района. Результаты теста AMOVA показали, что основная часть генетической изменчивости (92.9%) участка гена *COI* при сравнении моллюсков *C. japonica* с разными водоемами сосредоточена внутри сравниваемых выборок. Значения p -дистанций между последовательностями *C. japonica* из Дальнего Востока России (ДВР) и из Южной Кореи и Японии изменялись в диапазоне от 0.5 до 1%. Дифференциация последовательностей гена *COI* между *C. japonica* и другими видами составляла от 2.08% ("*C. fluminalis*") до 11.33% (*C. australis*).

Гаплотипическая сеть, реконструированная для *C. japonica* по данным p -дистанций, демонстрировала наличие двух гаплогрупп (рис. 2). Первая гаплогруппа включала 13 гаплотипов, обнаруженных у особей как с рос-

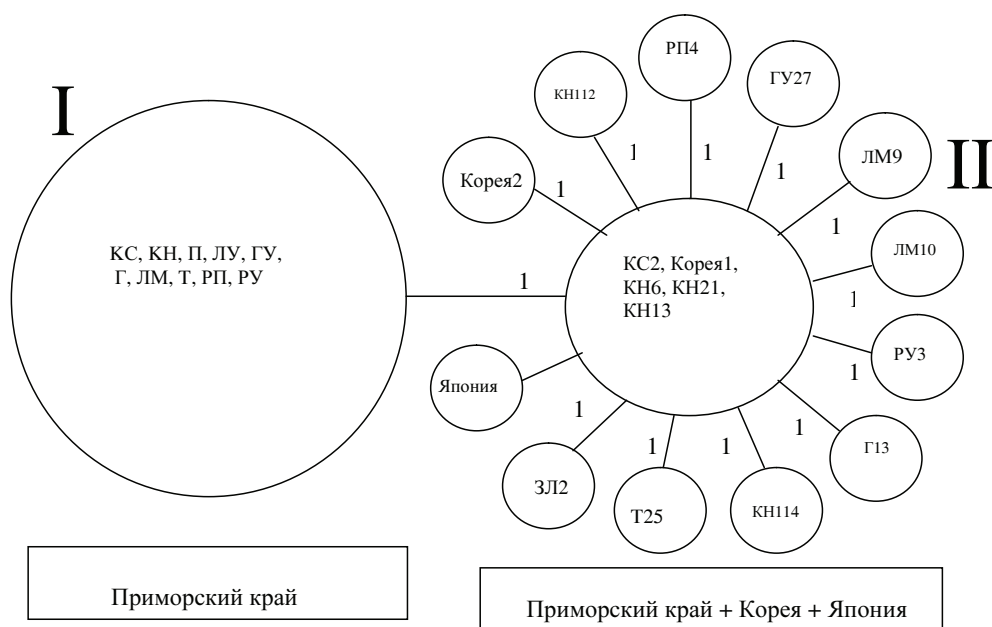


Рисунок 2. Гаплотипическая сеть, реконструированная для *C. japonica* из выборок Приморского Края, Кореи и Японии по данным частичного секвенирования гена *COI* мтДНК (шифр мест сбора см. табл.1). Указано количество мутационных шагов

сийского Дальнего Востока (примерно 10% всей выборки), так и из Японии и Южной Кореи. Вторая гаплогруппа включала остальных особей *C. japonica* из ДВР и была представлена одним гаплотипом. Полученные группы были разделены друг от друга одним мутационным шагом.

Филогенетические реконструкции показали, что вид *C. japonica* достоверно отличался от других представителей рода *Corbicula* и дифференцировался на два кластера с высокой статистической поддержкой (рис. 3). Филограммы, построенные по разным алгоритмам сохраняли свою топологию. Первый кластер включал значительную часть особей *C. japonica* с ДВР и образец из Японии, формировавший здесь базальную ветвь. Второй кластер включал в себя особей из ДВР и Южной Кореи. Дивергенция между последовательностями *C. japonica*, включенными в разные кластеры, составила 0.5%. Дифференциация особей *C. japonica* из Приморского края внутри каждого кластера не согласовывалось с географическим происхождением выборок.

Обсуждение

В данной работе впервые проведен анализ генетической изменчивости *C. japonica* на территории Приморского Края Дальнего Востока России по данным частичного секвенирования гена *COI* мтДНК. Результаты указывают на высокую консервативность данного гена внутри вида на всей исследуемой территории. Однако дифференциация дальневосточных корбикул из разных локальностей значительно ниже по сравнению с дифференциацией приморских особей и образцов из Японии и Южной Кореи. Тем не менее, данный уровень дифференциации (0.5%) не превышает минимальных значений межвидового диапазона (2.08%). Таким образом, наши

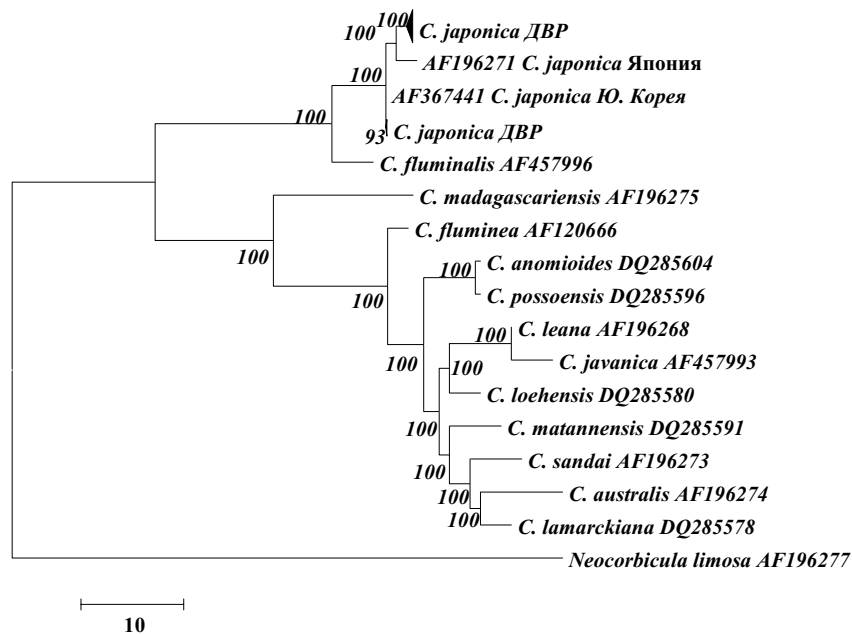


Рисунок 3. Филогенетическое дерево видов рода *Corbicula*, реконструированное с помощью алгоритма максимального правдоподобия (NJ)

данные указывают на принадлежность исследуемых моллюсков в эстуарных водоемах Приморского Края к одному виду - *C. japonica*.

Из исследованных 77 особей, собранных на расстоянии до 400 км друг от друга было обнаружено 12 гаплотипов, отличающихся друг от друга максимум двумя мутационными шагами. При этом в работе японских исследователей, в выборках *C. japonica*, собранных от устья Амура до юга Корейского полуострова и вокруг островов Японии было обнаружено 113 гаплотипов с дифференциацией до 11 мутационных шагов, среди которых 4 гаплотипа встречались практически повсеместно [5]. На основании этих данных авторы выделили 4 основные гаплогруппы: 1) Россия (устье р. Амур), Хоккайдо, Япономорская группа; 2) Тихоокеанская группа; 3) Северо-восток Корейского полуострова; 4) Юго-запад Корейского полуострова. Наши данные в целом согласовываются с результатами Иида с соавторами и указывают на принадлежность всех исследуемых нами моллюсков *C. japonica* к выделенной ими первой гаплогруппе.

Анализ собственных и литературных данных позволяет интерпретировать полученные результаты с двух взаимодополняющих позиций:

1. Низкий уровень изменчивости митохондриального гена цитохромоксидазы I свидетельствует об относительно недавнем заселении корбикулы в водоемы Приморья. По данным археологических раскопок раковинных куч было показано, что *C. japonica* отсутствовала в раннем голоцене до рубежа периода бореал-атлантик, и появилась в самом начале атлантического периода (около 7.3–7.4 тыс. л.н.), а через несколько сот лет корбикулы имели уже довольно большую численность [17] (Раков и др., 2011). Появление и широкое распространение корбикул в водах Приморского края связывают с климатическим оптимумом голоцена, сопровождавшегося повышением уровня моря на 3-4 метра выше современного [18]. До этого времени (в раннем голоцене) условия для появления и распространения корбикул в Приморье были довольно неблагоприятными. В период от 9,3-8,0 тыс. лет назад до 7,4-7,5 тыс. лет назад, отмечено значительное похолодание климата, сопровождавшегося небольшой регрессией моря [18].

По всей видимости, такого сравнительно небольшого времени существования поселений корбикулы в эстуариях Приморья недостаточно для преобладания дрейфа генов над миграцией. Поэтому высокая консервативность исследуемого участка гена COI у *C. japonica* вероятнее всего является следствием эффекта основателя. Моллюски могли заселять водоемы юга Приморья примерно в одно и то же время, о чем говорит идентичность приморских особей из разных локальностей японским гаплотипам.

2. Консервативность исследованного фрагмента гена COI объясняется обменом генами между отдельными поселениями. Эстуарные скопления корбикул из разных водоемов разделены между собой морем. Взрослые

моллюски не могут попадать из одного эстуарного водоема в другой через море из-за невозможности более 5 дней переносить морскую соленость [18]. Вероятно, такой период времени корбикулы способны переносить гипоксию, при срабатывании изолирующего рефлекса.

Логично предположить, что такой обмен может существовать благодаря перемещению личинок корбикулы. Как и большинство двустворчатых моллюсков, *C. japonica* имеет свободно плавающую планктонную личинку. Длительное (до двух недель) пребывание в планктоне [19], зависимость от приливно-отливных течений [20] и соленостно-избирательное поведение личинок корбикулы [21, 22] делает возможным их перенос между отдельными эстуарными системами. Этому может способствовать также тот факт, что нерест корбикулы происходит с июля по сентябрь [23, 24] (Maru & Nakai, 2006; Рыбалкина и др., 2013), когда наблюдается значительное распреснение прибрежных вод, вызванное ливневыми дождями.

Заключение

Таким образом, исследованные поселения эстуарных корбикул обладают низким уровнем изменчивости гена COI мтДНК. Низкие значения r -дистанций (менее 1%) между исследованными нами выборками и образцами из Японии и Кореи соответствуют внутривидовому уровню изменчивости (до 2%), что указывает на принадлежность этих моллюсков к одному виду – *C. japonica*. Учитывая особенности наследования митохондриальных генов (гены передаются по материнской линии без формирования аллельных вариантов) можно предположить, что миграционные процессы на личиночной стадии способствуют поддержанию высокого сходства между отдельными поселениями корбикул в Приморье.

2.08.2013

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, договор № 11.G34.31.0010, а также гранта Министерства образования и науки РФ № 02.740.11.0678 «Структура и функционирование прибрежных экосистем российской части Японского моря» в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

Список литературы:

1. Явнов С.В., Раков В.А. Корбикула. Владивосток: ТИНРО-центр. – 2002. 145 с.
2. Hatsumi M., Nakamura M., Muneyoshi H., Nakao S. Phylogeny of three *Corbicula* species and Isozyme polymorphism in the *Corbicula japonica* populations // *Venus*. – 1995. – V. 54. – №3. – P. 185–193.
3. Lee J.-S., Kim J.-B. Systematic study on the genus *Corbicula* (Bivalvia; Corbiculidae) in Korea // *The Korean Journal of Systematic Zoology*. – 1997. – V. 13. – P. 233–246. [In Korean with English summary]
4. Huh M. K., Lee B.K., Kim B.K., Heo Y.-S., Lee H.Y. Ecological and genetic biodiversity of *Corbicula leana* in the Nakdong River and the Nam River // *Korean J. Ecol.* – 2005. – V. 282. – P. 63–67.
5. Iida M., Kanno M., Kijima A. Genetic population structure of *Corbicula japonica* around East Asia estimated by mtDNA COI sequence analysis // *Nippon Suisan Gakkaishi*. – 2012. – V. 78. – №5. – P. 934–944.
6. Kantor Yu.I., Vinarski M.V., Schileyko A.A., Sysoev A.V. Catalogue of the continental mollusks of Russia and adjacent territories version 2.3.1. (published online on March, 2). – 2010.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. – 1984. 480 стр.
8. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. – 1994. – V. 3. – P. 294–299.
9. Tamura K., Peterson N., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*. – 2011. – V. 28. – P. 2731–2739.
10. Swofford D., Olsen G.J., Waddell P.J., Hillis D.M. Phylogenetic inference // *Molecular Systematics* / Eds Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Sunderland: Sinauer. – 1996. P. 407–514.
11. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1993. – V. 10. – P. 512–526.
12. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny // *Bioinformatics*. – 2001. – V. 17. – P. 754–755.
13. Akaike, H. A new look at the statistical model identification // *IEEE Trans. Automatic Control*. – 1974. – V. 19. – P. 716–723.
14. Posada D.P., Crandall K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution // *Bioinformatics*. – 1998. – V. 14. – P. 817–818.
15. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.1: An Interrated software package for population genetics data analysis // Switzerland: Institute of Zool. Comp. and Mol. Pop. Gen. Lab. (CMPG). – 2006. – 145 p.
16. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap // *Evolution*. – 1985. – V. 39. – P. 783–791.
17. Раков В.А., Вороний. Н.О., Шарова О.А. Особенности экологии и распространения корбикулы *Corbicula japonica* (Bivalvia) в водоемах Сахалина и Приморья в позднем голоцене // *Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова*. – 2011. – Вып. 5. – С. 447–453.
18. Короткий А.М. Колебания уровня моря и ландшафты прибрежной зоны (этапы и тенденции) // *Вестник ДВО РАН*. – 1994. – № 3. – С. 29–42.
19. Комендантов А.Ю., Орлова М.И. Экология эстуарных двусторчатых моллюсков и полихет Южного Приморья. В серии: Исследования фауны морей. СПб. – Вып. 52. – №60. – 2003. 164 с.
20. Baba K. Ecological study on spawning and early life stage of the brackish water bivalve *Corbicula japonica* in Lake Abashiri // *Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Stn.* – 2006. – V. 71. – P. 1–41
21. Roegner G.C. Transport of molluscan larvae through a shallow estuary // *Journal of Plankton Research*. – 2000. – V. 22. – №9. – P. 1779–1800.
22. Hajime S., Hisami K., Kazuko N., et al. Selectivity on salinity of Asiatic brackish clam larvae, *Corbicula japonica* Prime, 1864 // *Benthos Research*. – 2005. – V. 60. – №1. – P. 1–10.
23. Lee J.-Y., Kim W.-k., Lee C.-s. Growth and survival of the brackish water clam, *Corbicula japonica* larvae according to rearing conditions // *Korean J. Malacol.* – 2011. – V. 27. – №4. – P. 337–343. [In Korean with English summary]
24. Maru K., Nakai J. Annual variation in spawning season of the brackish water bivalve, *Corbicula japonica* Prime in the Ishikari River // *Suisan Zoshoku*. – 2006. V. 54. – №3. – P. 313–318. [In Japanese with English summary]
25. Рыбалкина (Дзюба) С.М., Майорова М.А., Анисимов А.П., Кравченко Д.Н. Гаметогенез и репродуктивный цикл двусторчатого моллюска *Corbicula japonica* Prime (1864) в устье реки Киевка (Японское море) // *Биология моря*. – 2013. – Т. 39. – №4. – С. 261–271.

Сведения об авторах:

Вороний Николай Олегович, соискатель, инженер кафедры биоразнообразия и морских биоресурсов Дальневосточного федерального университета
690060 г. Владивосток, ул. Октябрьская 27-142, voronoy_n@mail.ru

Никитенко Алина Юрьевна, аспирант лаборатории паразитологии
Биолого-почвенного института ДВО РАН, glamdivine@mail.ru

Атопкин Дмитрий Матвеевич, научный сотрудник лаборатории паразитологии
Биолого-почвенного института ДВО РАН, кандидат биологических наук,
г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостоку, 159, 8(423) 231-07-18,

заведующий лабораторией кафедры клеточной биологии и генетики Дальневосточного
федерального университета. 690060 г. Владивосток, ул. Октябрьская 27-236, atop82@gmail.com