

С. В. Межжерин, Л. Н. Янович, Е. И. Жалай, М. М. Пампура,
Л. А. Васильева

Репродуктивная изоляция двух викарных форм перловицы овальной *Unio crassus* Philipsson, 1788 (*Bivalvia*, *Unionidae*) с низким уровнем генетической дифференциации

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И. А. Акимовым)

Проведенный аллозимный популяционный анализ и секвенирование двух митохондриальных генов перловицы овальной *Unio crassus* s. lato доказали реальность двух репродуктивно изолированных в зоне парапатрии равнинной и горной групп популяций этого моллюска, которые с учетом четких морфологических и генетических различий следует рассматривать как разные виды *U. crassus* s. str. и *U. stevenianus* соответственно. Поскольку уровень генетической дивергенции этих двух видов очень незначительный, а репродуктивная изоляция между ними надежная, то полученные результаты подтверждают, что для запуска видообразования достаточно незначительных генных различий.

Систематика европейских двустворчатых моллюсков семейства *Unionidae* во многом неоднозначна. И причина этого состояния заключается уже не столько в затянувшемся противостоянии двух научных школ: российской, согласно взглядам апологетов которой род *Unio* представлен в Европе не менее чем 10 видами, и европейской, сторонники которой считают, что в Европе обитают только три широкоареальных вида, сколько в необходимости дальнейшего уточнения статуса ряда географических форм этих трех широко распространенных полиморфных видов. Очевидно, что именно по пути придания статуса надвидов с последующим вычленением в их пределах ряда викарных видов (алловидов) и следует ожидать прогресса в систематике этой группы моллюсков. Эту точку зрения подтверждает ряд геногеографических исследований [1–4].

Одним из предполагаемых надвидовых комплексов является перловица овальная *Unio crassus*. Оказалось [5], что между номинативной равнинной и предгорной ее формой из рек Карпат и Крыма, последняя уже выделялась в качестве вида *U. stevenianus* Krynicki, 1837 [6], не только существуют устойчивые морфологические различия (рис. 1), но и в зоне парапатрии, которая располагается в Закарпатье (рис. 2), имеет место резкая переходная зона в частотах аллелей локуса *Mdh-1*. Этот факт дает основания считать, что в случае с равнинной и предгорной формами имеет место эволюционная дивергенция на систематически значимом уровне. Для подтверждения данного предположения проведено генетическое исследование, акцентированное, с одной стороны, на картирование с помощью энзимных локусов зоны парапатрии, проходящей по предгорьям Закарпатья, а с другой — на оценку степени генетической дивергенции этих форм на фоне их дифференциации в пределах европейских *Unio* путем секвенирования последовательностей двух митохондриальных генов.

© С. В. Межжерин, Л. Н. Янович, Е. И. Жалай, М. М. Пампура, Л. А. Васильева, 2013

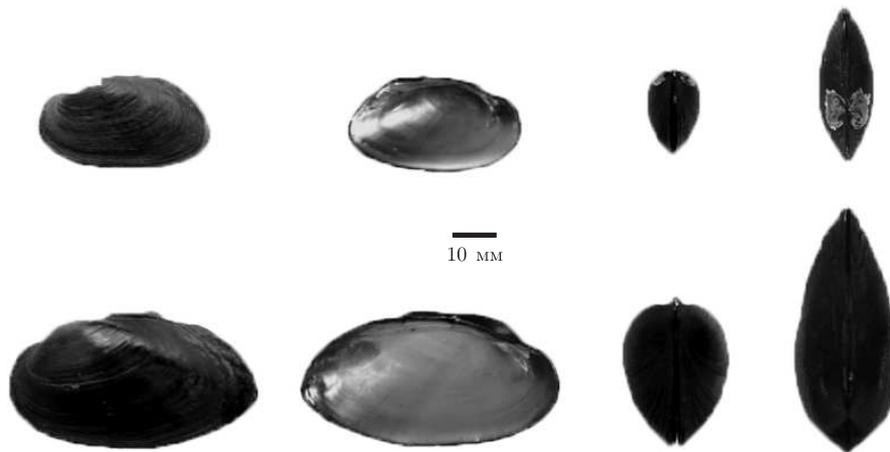


Рис. 1. Общий вид моллюсков: сверху — мелкая форма *U. stevenianus* (предгорья Карпат, р. Боржава, с. Вильховка); снизу — крупная форма *U. crassus* (р. Случь, бассейн р. Припять, г. Барановка, Житомирская обл.)

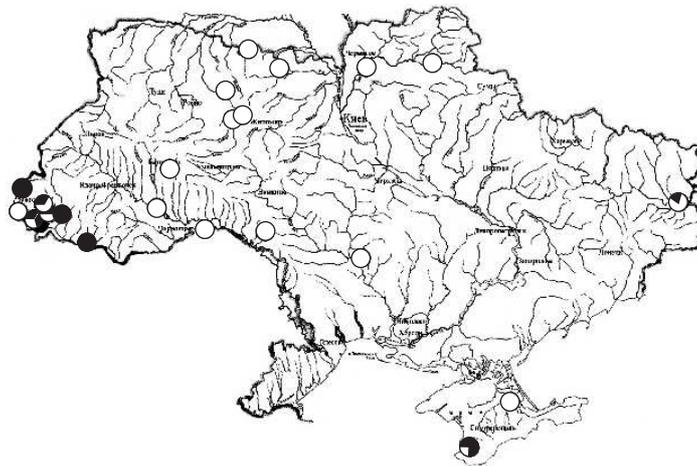


Рис. 2. Изменчивость генных частот локуса *Mdh-1* в популяциях *Unio crassus* s. lato на территории Украины. Аллели: *Mdh-1*¹⁰⁰ — заполнение черным цветом, *Mdh-1*¹¹⁰ — белым

Материалом для исследования послужили серии моллюсков *Unio crassus* s. lato, собранные в разных регионах Украины. Особое внимание при этом было уделено выборкам из Закарпатья и Крыма.

Аллозимный анализ осуществлен с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Выделение геномной ДНК производилось по стандартному протоколу с использованием набора ДНК-ЭКСТРАН-2 (“Синтол” Кат № ЕХ-511). Для сравнительного анализа использовались частичные сиквенсы двух митохондриальных генов — субъединицы I цитохром оксидазы (COI) длиной 572 п. о. и гена 16S рРНК длиной 471 п. о.

Соответствующие последовательности были амплифицированы с праймерами

LCO1490 5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3',

COI-H 5'-TCAGGGTGACCAAAAATCA-3' для COI [7];

16sar 5'-CGACTGTTTAAACAAAAACAT-3',

16sbr 5'-CCGTTCTGAACTCAGTCATGT-3' для 16S [8].

Реакция амплификации фрагмента COI проводилась по следующей циклограмме: 95 °С 5 мин, затем 35 циклов — 95 °С 30 с, 50 °С 60 с, 72 °С 60 с. Для амплификации гена 16s использовалась такая же программа, за исключением пониженной до 40 °С температуры отжига праймеров. Реакционная смесь содержала 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси ("Синтол" Кат. № М-428), по 10 пкМ праймеров и 50 нг геномной ДНК в общем реакционном объеме 25 мкл. После ферментативной очистки смесью экзонуклеазы I (Fermentas Кат. № EN0581) и щелочной фосфатазы (СибЭнзим Кат. № E328) фрагменты секвенировались в двух направлениях на генетическом анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems). Полученные последовательности после вычитки и выравнивания внесены в GenBank.

Полученные данные по распределению генотипов локуса *Mdh-1* в исследованных выборках в предгорном Закарпатье приведены в табл. 1. Очевидно, что частота аллеля *Mdh-1*¹¹⁰ в выборках резко убывает с высотой (рис. 3). Причем в выборке из Латорицы, взятой с наименьшей высоты (98 м над у. м.), имеет место его фиксация, тогда как в выборке из Апшицы, самого возвышенного места (237 м над у. м.), этот аллель замещается альтернативным *Mdh-1*¹⁰⁰. В промежуточном высотном диапазоне встречаются выборки с разным сочетанием аллелей локуса *Mdh-1*.

Таким образом, наличие с высокой частотой гена *Mdh-1*¹⁰⁰ или его фиксация отличает предгорные популяции этого вида от равнинных. При этом обращает на себя внимание явный дефицит гетерозигот в случаях, когда встречаются особи двух альтернативных генотипов (см. табл. 1). Эта же тенденция еще более очевидна по региону. Выраженный дефицит гетерозигот в данном случае связан со смешением в зоне парapatрии двух разных генетических объектов — предгорной и равнинной форм перловицы овальной, между которыми либо происходит ограниченная гибридизация, либо, вероятнее всего, имеет место репродуктивная изоляция. Последнее следует из того, что гетерозиготы *Mdh-1*^{100/110} также часто появляются в популяциях, в которых представлены только особи предгорного типа, как и в смешанных популяциях (см. табл. 1), а потому их наличие следует объяснять полиморфизмом этого локуса у предгорной формы.

Подобная дифференциация по локусу *Mdh-1* отмечена и в Крыму — между мелкой предгорной формой "*U. stevenianus*" и крупной равнинной "*U. stepanovi*". В этом случае по-

Таблица 1. Частоты аллелей и эмпирическое распределение генотипов, а также результаты (χ^2) его соотношения с теоретическим в выборках перловицы овальной в предгорном Закарпатье

Бассейн реки	Высота над у. м.	Широта	Долгота	Частота <i>Mdh-1</i> ¹⁰⁰	Генотип			χ^2
					100/100	100/110	110/110	
Боржава	142	48°15'49"	23°4'32"	0,92	20	2	0	0,56
	124	48°07'00"	22°43'00"	0,66	8	2	3	4,98
Апшица	237	48°0'24"	23°45'44"	1	3	0	0	0
Уж	115	48°37'7"	22°17'55"	1	9	0	0	0
Латорица	98	48°25'50"	22°9'50"	0	0	0	28	0
	124	48°25'60"	22°43'00"	0,96	22	2	0	0,01
	117	48°27'00"	22°37'60"	0,48	11	0	12	22,99**
	133	48°28'60"	22°43'00"	0,33	2	0	4	6,06*
В целом				0,61	75	6	47	104,1**

* $p < 0,01$. ** $p < 0,0001$.

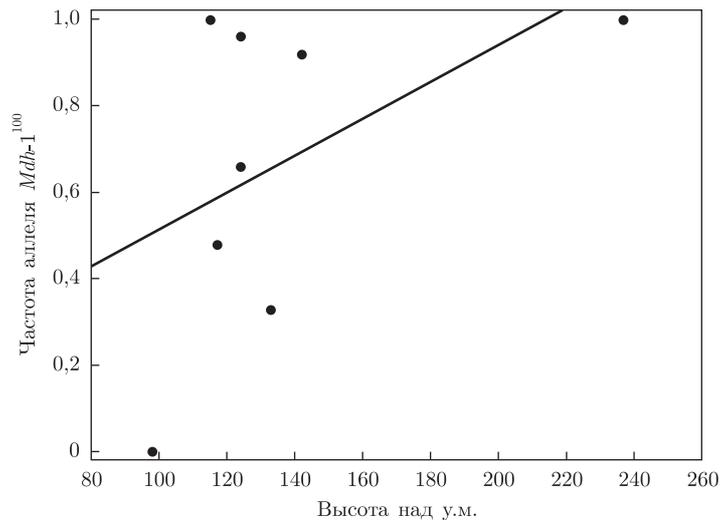


Рис. 3. Изменение частоты аллеля $Mdh-1^{100}$ в популяциях *Unio crassus s. lato* Закарпатья в зависимости от высоты над уровнем моря

пуляции первой также имеют в основном гомозиготы $Mdh-1^{100/100}$ при редких гетерозиготах $Mdh-1^{100/110}$, тогда как вторая (в данном исследовании из-за крайней немногочисленности единичный экземпляр) имела свойственную популяциям равнинной Украины фиксацию аллеля $Mdh-1^{110}$.

Проведившийся ранее мультилокусный анализ на уровне аллозимов [5] показал незначительный уровень дифференциации предгорной и равнинной форм *U. crassus s. lato*. Средняя генетическая дистанция была только $D_{Nei} = 0,08$. Незначительная дивергенция отмечается и при анализе генетической дифференциации этих форм по полинуклеотидным последовательностям митохондриальных локусов. Хотя ее значение и превышает средний уровень генетических дистанций особей разных географических популяций видов перловиц, но все же, как видно (рис. 4), генетическая дифференциация не выходит за пределы максимальных ее значений между особями разных популяций одного вида. При этом особи крымской и карпатской популяций предгорной мелкой формы *U. stevenianus* кластеризуются вместе, а особь крупной равнинной *U. stepanovi* из Крыма объединяется с равнинными популяциями номинативной *U. crassus*. Это в целом подтверждает правильность вывода, что равнинные крупные формы должны рассматриваться как *U. crassus*, а предгорные — как отдельный вид *U. stevenianus*.

Таким образом, исследование, проведенное с использованием как аллозимного популяционного анализа, так и изменчивости нуклеотидных последовательностей ДНК гомологичных генов, показывает, что крымская и карпатские предгорные формы перловицы овальной, несмотря на незначительный уровень генетической дифференциации, следует рассматривать в пределах *U. stevenianus*. Местом обитания этого вида являются быстрые речки на участках предгорий. Тогда как популяции плавнотекущих равнинных рек принадлежат к номинативному виду *U. crassus*. Представители двух видов достаточно хорошо отличаются своими размерами (см. рис. 1), имеют незначительную эволюционно-генетическую дискретность и репродуктивно изолированы друг от друга. Именно поэтому они вполне могут трактоваться как две независимые эволюционирующие субстанции, хотя время их дивергенции по историческим меркам незначительно и, вероят-

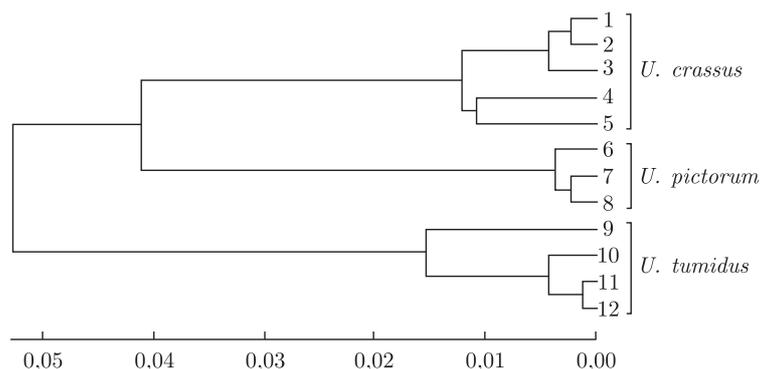


Рис. 4. UPGMA фенограмма генетических дистанций [9, 10], построенная по гомологичным последовательностям двух гомологичных локусов (COI и 16S) между отдельными особями трех видов рода *Unio*.

1 — *U. stepanovi* (р. Карасевка, с. Желябовка); 2 — *U. crassus* (р. Случь, пгт Барановка); 3 — *U. crassus* (р. Северский Донец, г. Станично-Луганское); 4 — *U. stevenianus* (р. Черная, с. Хмельницкое); 5 — *U. stevenianus* (р. Боржава, с. Ольховка); 6 — *U. pictorum* (р. Северский Донец, г. Станично-Луганское); 7 — *U. pictorum* (р. Дунай, с. Вилково); 8 — *U. pictorum* (р. Тетерев, г. Житомир); 9 — *U. tumidus* (р. Случь, пгт Барановка); 10 — *U. tumidus* (р. Тетерев, г. Житомир); 11 — *U. tumidus* (р. Дунай, г. Вилково); 12 — *U. tumidus* (р. Карасевка, с. Желябовка)

но, связано с изоляцией в период одного из позднеплейстоценовых геологических событий.

В заключение необходимо подчеркнуть, что исследование имеет важное теоретическое значение, поскольку обосновывает, что в ряде случаев репродуктивная изоляция возникает при весьма незначительном уровне генетической дифференциации, а это еще раз подтверждает возможность того, что видообразование может протекать достаточно быстро и скачкообразно.

1. Nagel K.-O., Badino G., Celebrano G. Systematics of European naiads (Bivalvia: Margaritidae and Unionidae): a review and some new aspects // Malacol. Rev. – 1998. – Supl. 7 (Bivalvia I). – P. 83–104.
2. Nagel K.-O., Badino G. Population genetics and systematics of European Unionoidea // Ecol. Stud. – 2001. – **145**. – P. 51–79.
3. Nagel K.-O., Badino G., Alessandria B. Population genetics of European Anodontinae (Bivalvia: Unionidae) // J. Moll. Stud. – 1996. – **62**. – P. 343–357.
4. Межжерин С. В., Васильева Л. А., Жалай Е. И., Янович Л. Н. Геноеографическая структура европейского ареала перловицы обыкновенной *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Unionidae) по данным аллозимного анализа // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – **8**, № 2. – С. 243–249.
5. Межжерин С. В., Васильева Л. А., Жалай Е. И., Янович Л. Н. Аллозимная и конхиологическая изменчивость перловиц рода *Unio* (Bivalvia: Unionidae) в Украине // Вестн. зоологии. – 2011. – **45**, № 4. – С. 307–319.
6. Жадин В. И. Фауна СССР. Моллюски. Сем. Unionidae. – Москва; Ленинград, 1938. – Т. 4, вып. 1. – 169 с.
7. Machordom A., Araujo R., Erpenbeck D., Ramos M. A. Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionidae) // Biol. J. Linn. Soc. – 2003. – **78**. – P. 235–252.
8. Lydeard C., Mulvey M., Davis G. M. Molecular systematics and evolution of reproductive traits of North American freshwater unionacean mussels (Mollusca: Bivalvia) as inferred from 16S rRNA DNA sequences // Proc. Roy. Soc. London. – 1996. – **351**. – P. 1593–1603.
9. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – **101**. – P. 11030–11035.

10. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Mol. Biol. and Evol. – 2011. – 28. – P. 2731–2739.

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена
НАН Украины, Киев
Житомирский государственный университет
им. Ивана Франко

Поступило в редакцию 13.06.2012

**С. В. Межжерін, Л. М. Янович, О. І. Жалай, М. М. Пампура,
Л. А. Васільєва**

**Репродуктивна ізоляція двох вікарних форм перлівниці овальної
Unio crassus Philipsson, 1788 (Bivalvia, Unionidae) з низьким рівнем
генетичної диференціації**

*Проведений алозимний популяційний аналіз та секвенування двох мітохондріальних генів перлівниці овальної *Unio crassus* s. lato довели реальність двох репродуктивно ізольованих у зоні парапатрії рівнинної та гірської груп популяцій даного молюска, які з урахуванням чітких морфологічних і генетичних відмінностей слід розглядати як різні види *U. crassus* s. str. та *U. stevenianus* відповідно. Оскільки рівень генетичної дивергенції цих двох видів дуже незначний, а репродуктивна ізоляція між ними надійна, то отримані результати підтверджують, що для запуску видоутворення достатньо незначних генних відмінностей.*

**S. V. Mezhzherin, L. M. Yanovych, Y. I. Zhalay, M. M. Pampura,
L. A. Vasilieva**

**Reproductive isolation of two *Unio crassus* Philipsson, 1788 (Bivalvia,
Unionidae) vicarious forms with low genetic differentiation level**

*The allozymic population analysis and the sequencing of *Unio crassus* s. lato two mitochondrial genes have shown two lowland and highland groups reproductively isolated within parapatria of this mollusk, which can be viewed due to distinct morphological and genetic differences as different species: *Unio crassus* str. and *U. stevenianus*. As the genetic divergence level of these mollusks is relatively low and the reproductive isolation is reliable, the obtained results prove that the gene differences are sufficient to start the species formation.*