

УДК 574.625:575.174:594

# ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПЕРВОЙ БАЛТИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *RANGIA CUNEATA* (*BIVALVIA*: *MASTRIDAE*)

© 2017 Ворошилова И.С.<sup>а,\*</sup>, Ежова Е.Е.<sup>б,\*\*</sup>, Павлова В.В.<sup>а,\*\*\*</sup><sup>а</sup> Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок 152472;<sup>б</sup> Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Москва 117997, г. Москва, Нахимовский проспект, д. 36;e-mail: \* [issergeeva@yandex.ru](mailto:issergeeva@yandex.ru); \*\* [igelinez@gmail.com](mailto:igelinez@gmail.com); \*\*\* [verasmi@mail.ru](mailto:verasmi@mail.ru)

Поступила в редакцию 01.11.2017

Изучено генетическое разнообразие первой балтийской популяции чужеродного двустворчатого моллюска *Rangia cuneata* (G.B. Sowerby I, 1831) путём секвенирования фрагмента митохондриального гена цитохром с-оксидазы, первой субъединицы (COI). Установлено, что Вислинский залив населяет единая популяция вселенца, обладающая высоким уровнем генетического разнообразия. Предполагается, что рангия вселилась в Вислинский залив с балластными водами судов на стадии личинки. В качестве наиболее вероятного донора рассматривается первая европейская популяция *R. cuneata* из Северного моря. Сведения о генетическом разнообразии могут быть полезны для прогнозирования дальнейших путей расселения моллюска.

**Ключевые слова:** *Rangia cuneata*, чужеродный вид, мтДНК, Балтийское море.

## Введение

Глобализация морской торговли и межконтинентальных транспортных перевозок играет ключевую роль в увеличении скорости биологических инвазий в морских экосистемах. Одним из важнейших способов (векторов) интродукции гидробионтов в географически удалённые регионы стал случайный перенос чужеродных видов с балластными водами судов [Ruiz et al., 1997]. Особенно успешно транспортируются эстуарные и морские эвригалинные организмы, имеющие в жизненном цикле планктонную стадию. Некоторые из них успешно натурализуются в новых местообитаниях, иногда приводя к существенным изменениям экосистем-реципиентов [Биологические инвазии..., 2004].

В последние десятилетия одним из активно расселяющихся видов стал эстуарный двустворчатый моллюск *Rangia cuneata* (G.B. Sowerby I, 1831). Нативным ареалом рангии считается Мексиканский залив [Hopkins, Andrews, 1970]. В литературе первые упоминания о находках живых экземпляров *R. cuneata*

за пределами Мексиканского залива, в Северной Каролине, датируются 1955 г. [Hopkins, Andrews, 1970]. В 1960–1988 гг. *R. cuneata* найдена на атлантическом побережье США от восточного побережья Флориды до Чесапикского залива и реки Гудзон [Carlton, 1992].

Существует две гипотезы о происхождении американских популяций рангии за пределами Мексиканского залива. Согласно первой, *R. cuneata* обитала здесь ранее. Створки представителей этого вида находили в плейстоценовых отложениях восточного побережья США до Нью-Джерси [Richards, 1938]. Предполагается, что небольшие поселения сохранились здесь до настоящего времени и дали вспышку численности в результате изменений условий обитания. Другим, наиболее вероятным, путём происхождения популяций на севере США исследователи считают случайную интродукцию рангии с марикультурой устриц [Pfitzenmeyer, Drobeck, 1964; Hopkins, Andrews, 1970].

В Европе *R. cuneata* впервые зарегистрирована в бассейне Северного моря (август 2005 г.) в эстуарии западной Шельды, в гава-

нях порта Антверпен, Бельгия, куда, предположительно, была преднамеренно интродуцирована с судовыми балластными водами [Verween et al., 2006]. В настоящее время инвазия происходит быстрыми темпами. Спустя три года после первой регистрации в бассейне Северного моря *R. cuneata* была обнаружена в каналах Амстердама, Нидерланды [Moolenbeek, 2009], а через пять лет, в 2010 г., вид впервые зарегистрирован в Балтийском море [Ежова, 2012; Рудинская, Гусев, 2012]. Первая интродукция в Балтике была широкомасштабной, практически одновременно была заселена вся акватория Вислинского залива, от солоноватоводной российской части до более опреснённой польской [Ежова, 2012; Рудинская, Гусев, 2012; Drgas, перс. сообщ.; Warzocha, Drgas, 2013]. Названные поселения моллюска являются наиболее крупными в бассейнах Северного и Балтийского морей.

К 2012 г. популяция рангии в Вислинском заливе Балтийского моря была представлена особями разных размерных групп, достигла высокой численности и могла считаться полностью натурализовавшейся [Ежова, 2012; Рудинская, Гусев, 2012]. Позднее, после натурализации рангии в Вислинском заливе, немногочисленные живые особи моллюска были обнаружены в других районах Южной и Восточной Балтики: вблизи Ниды (Литва, 2013), в районе Любека (Германия, 2013), в заливе Пярну (Эстония, 2014). В 2016 г. единичная особь *R. cuneata* была найдена в Западном Готландском бассейне, в районе Норчёппинга (Швеция, 2016) [AquaNIS..., 2017]. В 2015 г. ранее неизвестное, достаточно плотное поселение моллюска было обнаружено в Северном море, в Восточной Англии [Willing, 2015].

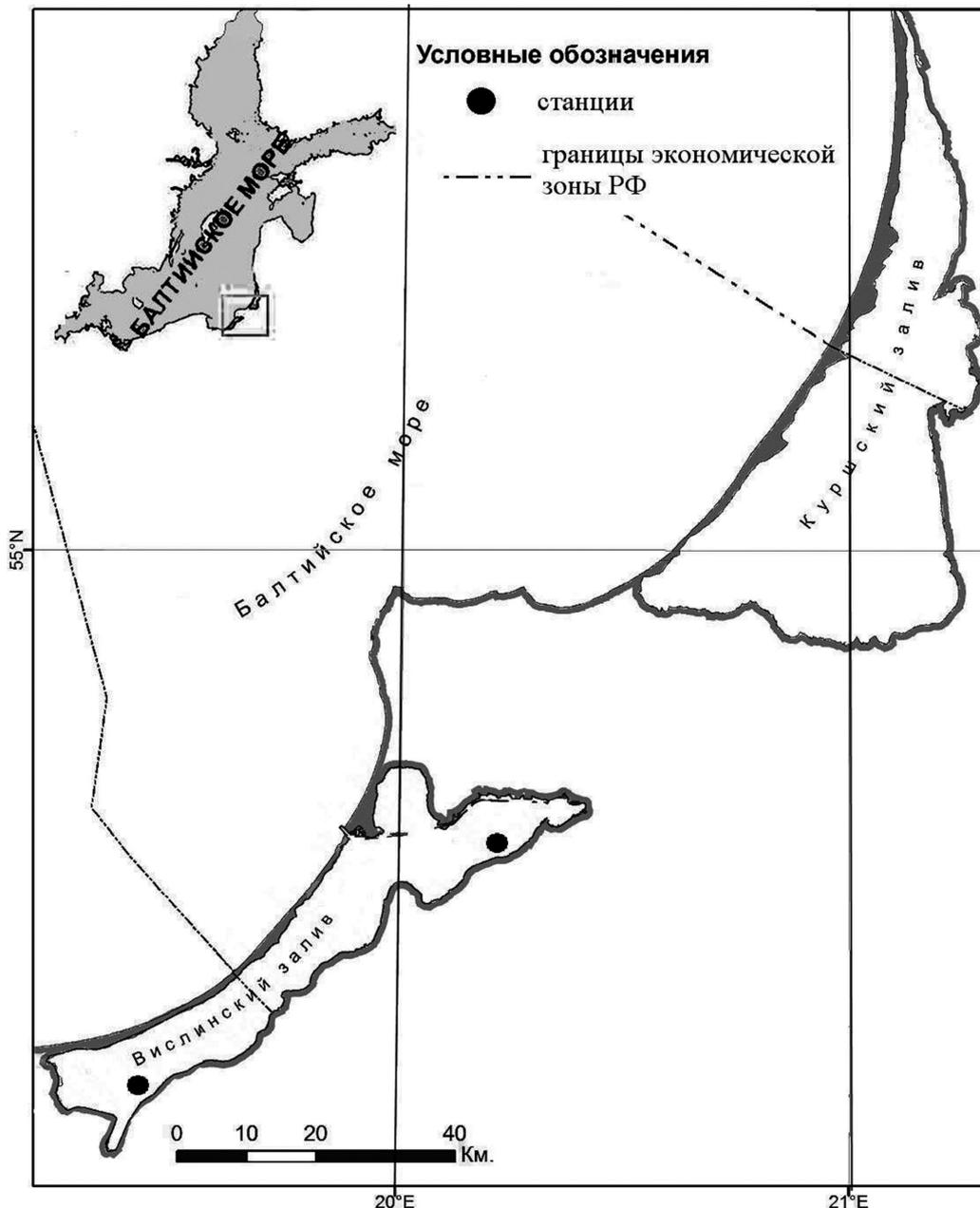
Порт Калининград связан контейнерными линиями с портами Нидерландов, Великобритании, Германии, Литвы, Финляндии и Швеции. Следовательно, популяция рангии в Вислинском заливе наряду с популяциями из бассейна Северного моря могла стать одним из источников дальнейшего расселения вида за пределами нативного ареала. Цель данной работы – изучение генетического разнообразия

и происхождения первой инвазивной популяции *R. cuneata* в Балтийском море.

### Материалы и методы

В работе проанализированы две выборки *R. cuneata*, собранные в 2015–2016 гг. в российской (23 экз.) и польской (22 экз.) акваториях Вислинского залива (рис. 1). Мышечные ткани фиксировали 96%-м этанолом, тотальную ДНК выделяли коммерческим набором Diatom™ DNA Prep 200 («Изоген») согласно инструкции производителя. Фрагмент митохондриального гена цитохром с-оксидазы, первой субъединицы (COI) длиной 703 пары нуклеотидов (пн) был амплифицирован с использованием следующей пары праймеров: LCO1490 5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3' [Folmer et al., 1994] и COI-H 5'-TCAGGGTGACCAAAAATCA-3' [Machordom et al., 2003]. Финальный объём смеси ПЦР 25 µL содержал 2.5 µL 10 х буфера для ПЦР (СибЭнзим) с 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL каждого из олигонуклеотидных праймеров (10 pM), 2.5 µL смеси каждого из четырёх дезоксирибонуклеотидов (0.2 µM каждого), 1–1.5 µL тотальной ДНК, 0.7 U Taq ДНК полимеразы (СибЭнзим) и бидистиллированную воду. Амплификацию проводили в программируемом термостате «Терцик» (ДНК-Технология). Программа амплификации включала следующие стадии: денатурация – 95 °C (4 мин), 32 цикла по 94 °C (1 мин), 58 °C (45 с), 72 °C (1 мин), и заключительный этап – 72 °C (7 мин). Продукт ПЦР после электрофореза в 1.5%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием (0.5 мкг/мл), визуализировали в ультрафиолете (λ= 312 нм). Двустороннее секвенирование проводили с использованием амплификационных праймеров. Секвенировали в ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems) на базе ИБВВ РАН согласно инструкции производителя. Нуклеотидные последовательности всех гаплотипов депонированы в NCBI (MG267050–MG267055) [National Center..., 2017].

Нуклеотидное (п) и гаплотипическое (Hd) разнообразие подсчитано с использованием пакета программ DnaSP version 5.10 [Librado, Rozas, 2009]. Сравнение нуклеотидных последо-



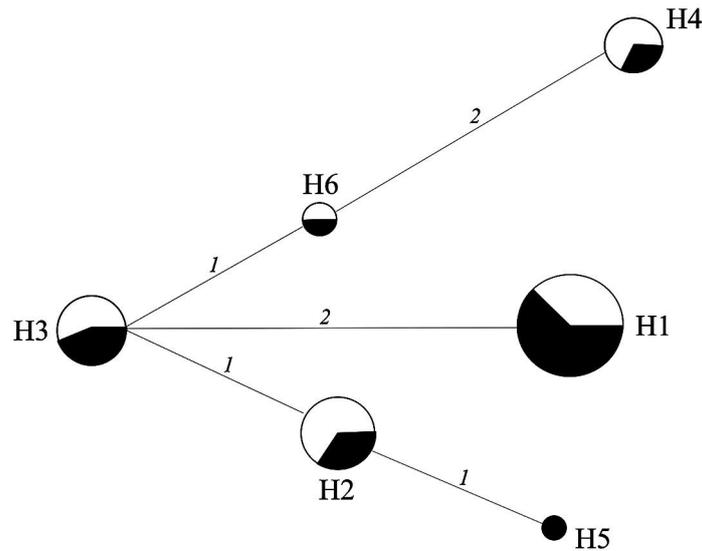
**Рис. 1.** Станции сбора проб *Rangia cuneata* в Вислинском заливе Балтийского моря.

довательностей COI, полученных нами, с депонированными ранее в международные базы данных проводили с помощью BLAST (NCBI) [National Center..., 2017]. Взаимосвязи между гаплотипами анализировали методом MJN (Median Joining Network) в NETWORK 5.0.0.1 [Bandelt et al., 1999]. Генетическую гетерогенность между выборками оценивали с помощью попарных сравнений  $F_{ST}$  (AMOVA) в пакете программ ARLEQUIN version 3.5.2.1 [Excoffier, Lischer, 2010].

### Результаты

При анализе 45 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI рангии Вислинского залива, длиной 658 пн, обнаружено шесть гаплотипов, которые различаются заменами нуклеотидов в одном или нескольких сайтах (рис. 2; таблица). Взаимосвязи между вариантами нуклеотидных последовательностей показаны на рисунке 2.

В выборках преобладают Н1-Н4 гаплотипы, единично встречаются Н5 и Н6 варианты нук-



**Рис. 2.** Медианная сеть гаплотипов фрагмента гена COI мтДНК (658 пн) *R. cuneata*. Цифрами обозначено число мутационных шагов. Чёрным цветом показана частота встречаемости каждого из гаплотипов в польской акватории, а белым – в российской.

**Таблица.** Полиморфизм фрагмента гена цитохром с-оксидазы (COI) *R. cuneata*

Выборки	N	N <sub>г</sub>	N <sub>пс</sub>	Гаплотипическое разнообразие Hd (SD)	Нуклеотидное разнообразие π (SD)
Российская акватория	23	5	6	0.787 (0.043)	0.004 (0.000)
Польская акватория	22	6	7	0.684 (0.096)	0.003 (0.001)

Примечание. N – объём выборки, N<sub>г</sub> – число гаплотипов, N<sub>пс</sub> – число полиморфных сайтов.

леотидных последовательностей. Гаплотип H6 идентичен следующим нуклеотидным последовательностям из Чесапикского залива США: KT959440, KT959412, KT959383 [National Center..., 2017]. Значения показателей нуклеотидного и гаплотипического разнообразия указаны в таблице. Различия между выборками не достоверны ( $F_{ST} = 0.000$ ,  $P = 0.39$ ).

### Обсуждение

Залив отделён от открытой Балтики Вислинской косой и сообщается с морем только узким судоходным проливом, шириной 400 м и глубиной 10–12 м (рис. 1). Все суда, заходящие в Вислинский залив в настоящее время могут двигаться лишь одним путём – через Балтийский пролив в российскую часть аква-

тории. Если рассматривать гипотезу интродукции путём сброса балластных вод, содержащих личинок, рангия могла попасть в залив исключительно с судами, зашедшими в российскую акваторию, а распространиться в польские воды – только переносом личинок с течениями. Очень быстрое, в течение всего нескольких месяцев, распространение моллюска по всей акватории Вислинского залива, количественные характеристики распределения взрослых моллюсков на начальной стадии инвазии и размерно-возрастная структура популяции в различных участках залива [Ежова, 2012; Рудинская, Гусев, 2012; Warzocha, Drgas, 2013] свидетельствуют в пользу инокуляции личинками, а не взрослыми особями. Таким образом, рангия в российских и польских во-

дах имеет общее происхождение, что подтверждается и отсутствием значимых генетических различий между этими двумя выборками.

Наиболее вероятным ресурсом для интродукции рангии в Вислинский залив могли быть популяции моллюска из бассейна Северного моря, где расположены крупнейшие европейские порты Антверпен и Роттердам, имеющие транспортные связи как с Мексиканским заливом, так и с портами в Северо-Западной Атлантике (атлантическое побережье США). В Балтийское море личинки рангии могли проникнуть с балластными водами контейнеровозов или дреджинговых судов. Известно, что для поддержания состояния судоходного фарватера 43-километрового Калининградского морского канала регулярно привлекаются дреджинговые суда, в том числе европейские.

Происходило ли расселение рангии в Европу и далее в Балтийское море непосредственно из Мексиканского залива или источником инвазии могли быть популяции, обитающие на севере США, предварительно адаптированные к северным условиям? Из нативного ареала рангии в международной базе данных и литературе [Foltz et al., 1995] представлено восемь вариантов нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI, длиной 230 пн, полученных при анализе 18 особей моллюсков. Сравнение этих данных с нашими результатами оказалось малоинформативным, поскольку одному такому гаплотипу соответствовало несколько вариантов нуклеотидных последовательностей, полученных нами. Наши последовательности были значительно длиннее и содержали варьирующие нуклеотиды за пределами области, секвенированной авторами работы [Foltz et al., 1995]. Более показательными в этом плане стали результаты рестриктового анализа, который авторы указанной выше публикации применяли в дополнение к секвенированию нуклеотидных последовательностей COI, длина анализируемого ими фрагмента составляла приблизительно 680 пн. В выборках рангии из Мексиканского залива (7 выборок, 170 экз.) обнаружены гаплотипы, у которых отсутствует один из сайтов рестрикции *Mbo*II, возникающий в результате нукле-

отидной замены Т на С в 610 позиции анализируемого нами фрагмента гена COI. Однако такие гаплотипы не найдены в пробах с побережья п-ова Флорида и с севера атлантического побережья США (5 выборок, 120 экз.). В наших выборках по частоте преобладал вариант нуклеотидной последовательности H1, который, подобно мексиканским гаплотипам, не имел полиморфного рестриктового сайта *Mbo*II.

В то же время, в Вислинском заливе обнаружен вариант H6, известный из Чесапикского залива, по данным международной базы NCBI [National Center..., 2017]. Поскольку в балтийской популяции рангии имеется ещё и вариант нуклеотидной последовательности с полиморфным рестриктовым сайтом, отсутствующий в Чесапикском заливе, расселение рангии в Европу, а далее и в Вислинский залив, не могло происходить только из популяций севера атлантического побережья США.

Обычно высокие значения показателей внутривидового полиморфизма у инвазивных популяций объясняют большим числом живых особей, основавших поселение (прессом пропагул) или множественной интродукцией [Roman, Darling, 2007; Dlugosch, Parker, 2008; Handley et al., 2011; Estoup et al., 2016]. При транспортировке балластных вод на небольшие расстояния, как это происходит в случае транспортных сообщений между Калининградом и ближайшими крупными европейскими портами, путь занимает не более нескольких дней и вероятность сохранения личинок в жизнеспособном состоянии очень велика, что и обеспечило высокое генетическое разнообразие первой популяции рангии в Балтийском море.

### Заключение

Мелководность Вислинского залива и, следовательно, быстрый прогрев воды обеспечивают благоприятные температурные условия для размножения и развития личинок, что позволило рангии образовать здесь самовоспроизводящуюся популяцию [Ежова, 2012; Рудинская, Гусев, 2012], для которой характерен высокий уровень генетического разнообразия.

Наряду с североморскими, популяция *R. cuneata* из Вислинского залива может стать, и вероятно – уже стала, одним из основных источников для дальнейшего расселения вида в Балтике. В связи с проектом создания канала через Балтийскую (Вислинскую) косу и открытия судоходства через него, реализация которого начинается в 2018 г. [Polish Press..., 2017], инвазионный потенциал рассматриваемой популяции *R. cuneata* возрастёт, и мы прогнозируем ускорение темпов колонизации прибрежных вод Балтийского моря.

### Благодарности

Авторы признательны польским коллегам из института Морского Рыболовства (Гдыня, Польша) А. Дргасу (Aleksander Drgas) и Р. Корнийову (Ryszard Kornijow) за материал, собранный в польской части Вислинского залива. Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ 17-05-00782, осзадания № 0149-2018-0035 института океанологии РАН. Сбор материала выполнен с поддержкой темы госзадания ИОРАН № 0149-2018-0035, генетический анализ – гранта РФФИ 17-05-00782.

### Литература

- Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах / Под ред. А.Ф. Алимова, Н.Г. Богуцкой. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 436 с.
- Ежова Е.Е. Новый вселенец в Балтийское море моллюск *Rangia cuneata* (Bivalvia: Mactridae) // Морський екологічний журнал. 2012. Т. 11. № 1. С. 29–32.
- Рудинская Л.В., Гусев А.А. Вселение североамериканского двустворчатого моллюска *Rangia cuneata* (G.B. Sowerby I, 1831) (Bivalvia: Mactridae) в Вислинский залив Балтийского моря // Российский журнал биологических инвазий. 2012. № 2. С. 115–127.
- AquaNIS Information system on aquatic non-indigenous and cryptogenic species // <http://www.corpi.ku.lt/data-bases/index.php/aquanis/>. Проверено 24.10.2017.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Molecular Biology and Evolution. 1999. Vol. 16. No. 1. P. 37–48.
- Carlton J.T. Introduced marine and estuarine mollusks of North America: an end-of-the-20th-century perspective // Journal of Shellfish Research. 1992. Vol. 11. No. 2. P. 489–505.
- Dlugosch K.M., Parker I.M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions // Molecular Ecology. 2008. Vol. 17. P. 431–449.
- Estoup A., Ravigné V., Hufbauer R., Vitalis R., Gautier M., Facon B. Is there a genetic paradox of biological invasion? // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 2016. Vol. 47. P. 51–72.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Molecular Ecology Resources. 2010. Vol. 10. P. 564–567.
- 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. Vol. 3. P. 294–299.
- Foltz D.W., Sarver S.K., Hrinkevich A.W. Genetic Structure of Brackish Water Clams (*Rangia* spp.) // Biochemical Systematics and Ecology. 1995. Vol. 23. No. 3. P. 223–233.
- Handley L.J.L., Estoup A., Evans D.M., Thomas C.E., Lombaert E., Facon B., Aebi A., Roy H.E. Ecological genetics of invasive alien species // BioControl. 2011. Vol. 56. No. 4. P. 409–428.
- Hopkins S.H., Andrews J.D. *Rangia cuneata* on the east coast: thousand-mile range extension, or resurgence? // Science. 1970. Vol. 167. P. 868–869.
- Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. P. 1451–1452.
- Machordom A., Araujo R., Erpenbeck D., Ramos M.A. Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionioidea) // Biological Journal of the Linnean Society. 2003. Vol. 78. P. 235–252.
- Moolenbeek R.G. Aanvullende vondsten van *Rangia cuneata* in het IJ (Noordzeekanaal) // De Kreukel. 2009. Vol. 45. No. 1. P. 6.
- National Center for Biotechnology Information // (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Проверено 25.10.2017.
- Pfitzenmeyer H.T., Drobeck K.G. The Occurrence of the Brackish Water Clam, *Rangia cuneata*, in the Potomac River, Maryland // Chesapeake Science. 1964. Vol. 5. No. 4. P. 209–215.
- Polish Press Agency (PAP, 2017) // (<http://www.pap.pl/en/news/news,863183,vistula-spit-canal-strategic-and-profitable-for-poland-minister.html>.) Проверено 24.10.2017.
- Richards H.G. Animals of the Seashore. Boston: B. Humphries press, 1938. P. 29.
- Roman J., Darling J.A. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions // Trends in Ecology & Evolution. 2007. Vol. 22. P. 454–464.
- Ruiz G.M., Carlton J.T., Grosholz E.D., Hines A.H. Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: Mechanisms, extent, and consequences // American Zoologist. 1997. Vol. 37. No. 6. P. 621–632.
- Verween A., Kerckhof F., Vincx M., Degraer S. First European record of the invasive brackish water clam *Rangia cuneata* (G.B. Sowerby I, 1831) (Mollusca: Bivalvia) // Aquatic Invasions. 2006. Vol. 1. No. 4. P. 198–203.

Warzocha J., Drgas A. The alien gulf wedge clam (*Rangia cuneata* G.B. Sowerby I, 1831) (Mollusca: Bivalvia: Mactridae) in the Polish part of the Vistula Lagoon (SE Baltic) // *Folia Malacologia*. 2013. Vol. 21. No. 4. P. 291–292.

Willing M.J. Two invasive bivalves, *Rangia cuneata* (g.b. Sowerby I, 1831) and *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad, 1831), living in freshwater in Lincolnshire, Eastern England // *Journal of Conchology*. 2015. Vol. 42. No. 2. P. 189–192.

## GENETIC DIVERSITY OF THE FIRST BALTIC POPULATION OF *RANGIA CUNEATA* (BIVALVIA: MACTRIDAE)

© 2017 Voroshilova I.S.<sup>a,\*</sup>, Ezhova E.E.<sup>b,\*\*</sup>, Pavlova V.V.<sup>a,\*\*\*</sup>

<sup>a</sup>Papanin Institute for Biology of Inland Waters of the Russian Academy of Sciences, Borok 152472;

<sup>b</sup>The Atlantic Branch of the P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Kaliningrad 236022;

e-mail: \* [issergeeva@yandex.ru](mailto:issergeeva@yandex.ru); \*\* [igelinez@gmail.com](mailto:igelinez@gmail.com); \*\*\* [verasmi@mail.ru](mailto:verasmi@mail.ru)

The genetic diversity of the first Baltic population of the bivalve mollusk *Rangia cuneata* (G.B. Sowerby I, 1831) was studied based on mtDNA COI gene sequences. It is shown the whole Vistula Lagoon is inhabited by a single population of alien species with a high level of genetic diversity. It is assumed, common *rangia* penetrated to the Vistula Lagoon at a larval stage with the ballast water. The first European *R. cuneata* population, from the North Sea, is regarded as the most probable source of introduction. Information on the introduced species population genetic diversity can be useful for forecasting of further ways of dispersal of the species.

**Key words:** *Rangia cuneata*, alien species, mtDNA, Baltic Sea.