

УДК 575.17:595.384.12

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДВУХ МОРФ КРЕВЕТОК *Periclimenes soror* Nobili, 1904 – СИМБИОНТОВ ТРОПИЧЕСКИХ МОРСКИХ ЗВЕЗД

© 2010 г. Т. И. Антохина, П. А. Сорокин

Учреждение Российской академии наук Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова, Москва 119071

e-mail: tanya@sai.msu.ru

Поступила в редакцию 29.07.2009 г.

Проанализированы нуклеотидные последовательности фрагмента митохондриального гена *COI* и высокоизменчивого ядерного фрагмента D1-D2 большой субъединицы рибосомальной РНК у двух морфологически сходных морф креветок *Periclimenes soror*, широко распространенных в Индо-Вест-Пацифике. Обе морфы – облигатные симбионты морских звезд, различающиеся характером окраски и специфичной реакцией по отношению к своим хозяевам. Не обнаружено генетической дифференциации по этим двум исследованным фрагментам.

Для определения видов у ракообразных прежде всего используется анализ морфологических признаков [1]. Однако такой метод не всегда эффективен, например при изучении сходных по морфологии репродуктивно изолированных групп или симбионтов, которые ассоциированы с разными хозяевами [2–5] и могут являться криптическими видами [6]. Идентификация криптических видов основана на молекулярном анализе, с использованием подходящих генетических маркеров и ряда других диагностических признаков, например характера окраски [6–8]. Криптические виды были обнаружены во многих группах десятиногих ракообразных: у креветок-шелкунов *Alpheus* sp. [9, 10], глубоководных креветок *Plesionika* sp. [7, 8], пенеидных креветок *Penaeus subtilis* [11] и *Penaeus japonicus* [12] и других. Некоторые из этих видов характеризуются необычно большими генетическими различиями, несмотря на морфологическое сходство [13–17].

Креветки *Periclimenes soror* Nobili, 1904 – широко распространенные в Индо-Вест-Пацифике облигатные симбионты мелководных морских звезд. Список морских звезд – хозяев *P. soror* включает 21 вид [18, 19]. В ходе исследований на о. Курошима (Восточно-Китайское море) Сакай и Окутани [20] описали четыре варианта окраски креветок *P. soror*, сходных морфологически. Самцы и молодые самки креветок – прозрачные, с возрастом самки приобретают криптическую окраску двух типов, соответствующую определенному виду хозяина. Наши предварительные наблюдения в заливе Нячанг Южно-Китайского моря также показали наличие двух характерных

морф половозрелых самок *P. soror*, различающихся не только типом окраски, но и специфичной реакцией распознавания вида своих хозяев. В зал. Нячанг наиболее показательные различия обнаружены между самками креветок, обитающими на морских звездах *Culcita novaeguineae* (Müller & Troschel, 1842) и *Acanthaster planci* (Linnaeus, 1758). Окраска самок креветок с *A. planci* всегда с ярковыраженной полосой на спине, креветок с *C. novaeguineae* – однотонная (рис. 1).

Анализ морфологических признаков двух морф самок *P. soror*, различающихся характером окраски, не выявил отличий (И.Н. Марин, устное сообщение). Результаты экспериментальных исследований показали, что каждая из двух морф креветок *P. soror* способна успешно находить морскую звезду-хозяина и реакция распознавания строго видоспецифична [19].

По мнению А.Д. Брюса (устное сообщение), вид *P. soror* представляет собой комплекс криптических видов. Однако возможно креветки-симбионты, обитающие на разных хозяевах в зал. Нячанг, относятся к одному виду, представленному отдельными популяциями, ассоциированными с отдельными видами морских звезд. В данной работе мы исследуем генетическую структуру двух групп креветок-симбионтов двух видов морских звезд, с целью проверки этих гипотез.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Креветок-симбионтов собирали на островах Мот, Мун и Нок в зал. Нячанг Южно-Китайского

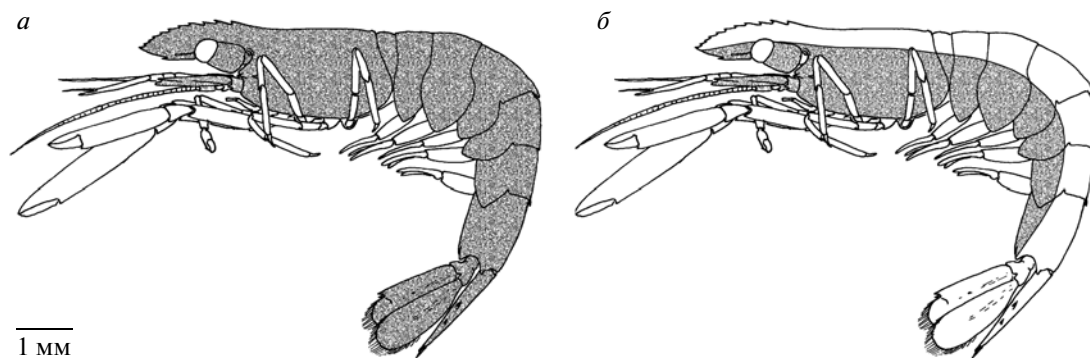


Рис. 1. Варианты окраски половозрелых самок *Periclimenes soror*, собранных в заливе Нячанг: а — с морских звезд *Culcita novaeguineae*, б — с морских звезд *Acanthaster planci*.

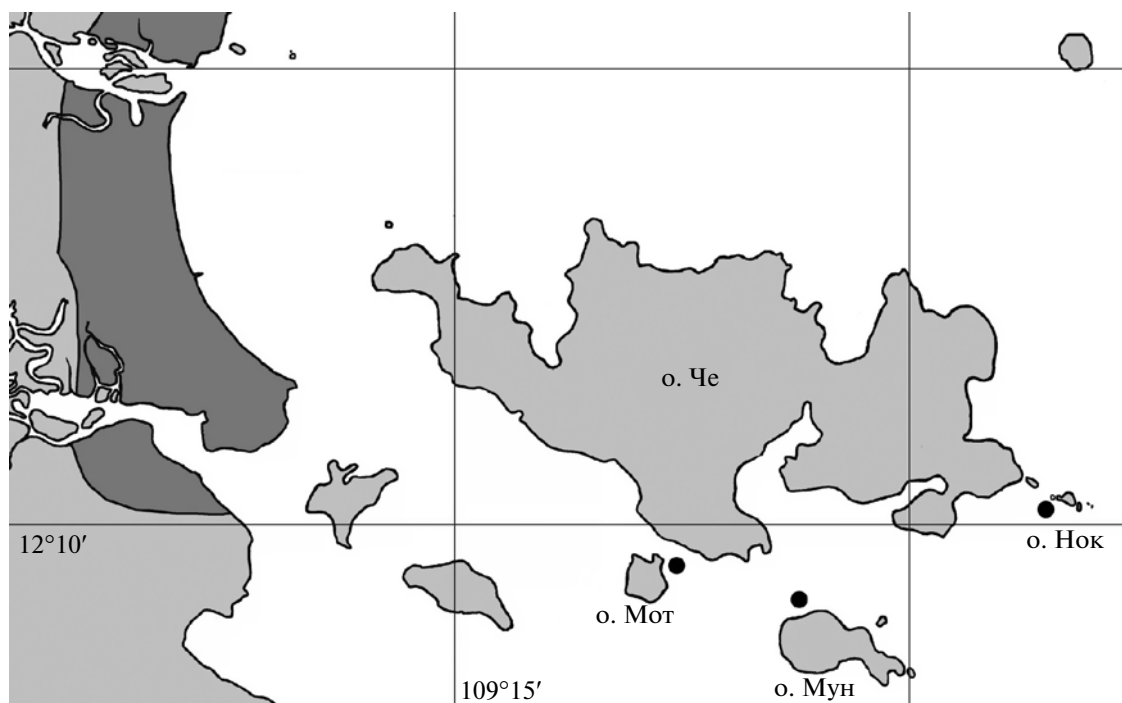


Рис. 2. Карта залива Нячанг, места сбора материала отмечены черными кружками.

моря, в период с апреля по май 2006 и 2007 гг. (рис. 2).

Для анализа мы использовали 15 и 14 особей каждой из двух морф половозрелых самок креветок (с шести звезд *Culcita novaeguineae* (Müller & Troschel, 1842) и пяти звезд *Acanthaster planci* (Linnaeus, 1758) соответственно) и, кроме того, четыре особи наиболее близкого вида *Periclimenes imperator* (Bruce, 1967) для сравнения и оценки результатов (таблица).

Для молекулярно-генетического анализа использовали последовательности фрагмента митохондриального гена *COI*. В связи с тем что митохондриальная ДНК может нести следы древней интрогрессии и поэтому не всегда может свидетельствовать о генетической обособленности популяций или видов, мы также анализировали высокоизменчивый ядерный фрагмент D1-D2 большой субъединицы рибосомальной РНК. ДНК выделяли из мышечной ткани брюшка креветок, зафиксированных в

Использованный материал

Группы креветок, собранных с разных экземпляров морских звезд	Образцы креветок
	о. Мот
mo1	1C, 2C
mo2	3C, 6C, 7C, 8C, 14C
mo3	C17, C18
mo4	A2, A3, A5, A7, A8
mo5	A11, A12, A13, A14, A15
mo6	A16, A17
<i>P. imperator</i>	P3, P12, P13, P14, P15, 1P, P11
	о. Мун
mu1	C22, C23, C24
mu2	A9
	о. Нок
n1	C2
n2	C11, C12, C15
n3	2A

Примечание. Буквами А и С обозначены морфы креветок *P. soror*, собранных с *A. planci* и *C. novaeguineae* соответственно. В каждой строке справа — образцы креветок, собранные с одного экземпляра морской звезды. Р — образцы *P. imperator*.

96 или 70%-ном этаноле, с помощью набора реагентов Diatom® DNA Prep 100 (“Изоген”, Москва). Продукты амплификации генов были получены с помощью ПЦР с праймерами для гена *COI* [21] и D1-D2 LSU rRNA [22] с использованием наборов реагентов (“Диалат”, Москва). Результаты амплификации ДНК анализировали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле и буфере TBE с добавлением этидия бромистого. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК проводили на секвенаторе ABI 3130 (“Applied Biosystems”, США). Выравнивание полученных последовательностей участков генов *COI* (~650 пн) и *28S*

РНК (~1050 пн) осуществляли с помощью программы BioEdit 7 [23]. Генетические дистанции между двумя морфами вида *P. soror* и видом *P. imperator*, значения π и H рассчитывались в программах Mega 4.0.1 [24] и Arlequin 3.11 [25]. Коэффициент α , равный 0.23 гамма распределения, для выборки фрагмента гена *COI* оценивался из данных, полученных с помощью программы modeltest 3.7. [26]. Выбранная оптимальная модель — (TVM + G) [27]. Построение филогенетических деревьев осуществляли методом ближайшего связывания (Neighbor-Joining) с использованием модели Тамура—Нея [28]. Медианную сеть гаплотипов строили с помощью программы Network 4.5.1.0. [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получены 29 последовательностей гена *COI* (625 пн) (GenBank № GQ415605-GQ415633), восемь последовательностей гена *28S* РНК (1050 пн) (GenBank № GQ415648-GQ415655) для двух морф *P. soror*, четыре последовательности гена *COI* (625 пн) (GenBank № GQ415634-GQ415637) и четыре — гена *28S* РНК (1050 пн) для *P. imperator* (GenBank № GQ415656-GQ415659). Для фрагмента гена *COI* описано 26 гаплотипов для двух морф *P. soror* и четыре гаплотипа для внешней группы, представленной *P. imperator*. Нуклеотидная изменчивость π для выборок *P. soror* и *P. imperator* равна соответственно $0.78 \pm 0.4\%$ и $0.41 \pm 0.33\%$, а гаплотипическое разнообразие H для этих же выборок равно соответственно 0.99 ± 0.01 и 1.00 ± 0.18 . Нуклеотидные дистанции (net distance) между каждой из двух групп *P. soror* и видом *P. imperator* составили 0.31 ± 0.07 . Внутри вида *P. soror* по исследуемым фрагментам митохондриальной и ядерной ДНК ни по морфам, ни по местам сбора образцов генетической дифференциации не обнаружено (рис. 3–5), нуклеотидные дистанции равны 0. Ядерный ген представлен одним гаплотипом для каждого из исследуемых видов (рис. 4). Нуклеотидная дистанция между двумя видами по ядерному гену составила 0.007 ± 0.003 .

ОБСУЖДЕНИЕ

Характер окраски является хорошим признаком для идентификации криптических видов десятиногих ракообразных [6], и многие виды десятиногих ракообразных, такие как *Periclimenes inornatus* и *P. ornatus* [30], манящие крабы *Uca speciosa* и *U. spinicarpa* [31], креветки-шелкуны *Alpheus* spp. [32] и др., были описаны благодаря внимательному изучению характера окраски. Несмотря на это,

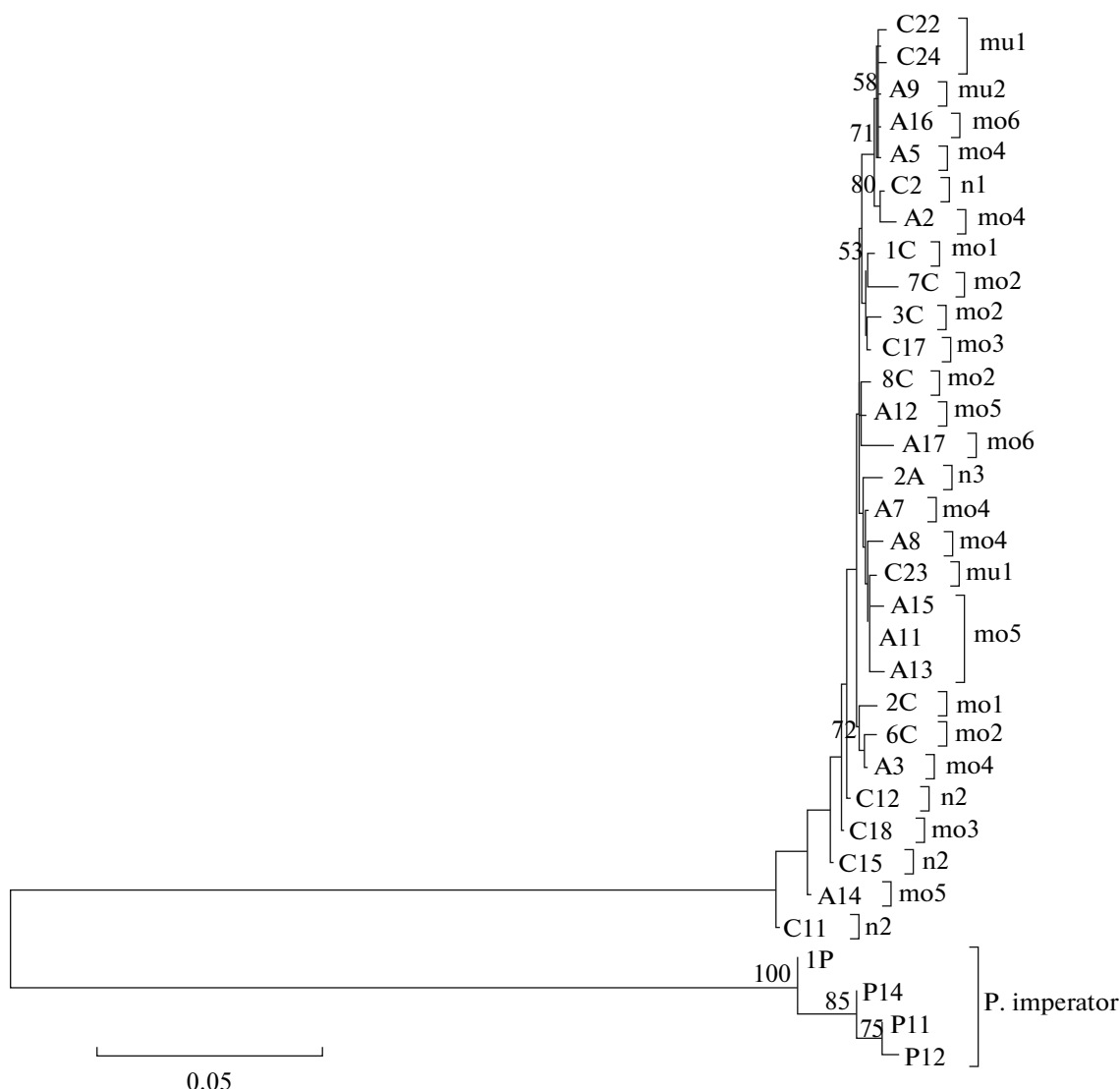


Рис. 3. Дендрограмма филогенетических отношений между гаплотипами исследованных групп и морф (А и С) *Peri-climenes soror* и *P. imperator* (P), построенная на основании фрагмента гена *COI* (625 пн) методом ближайшего связывания (Neighbor-Joining) с использованием модели Тамура–Нея. В узлах – результаты бутстреп-анализа (1000 реплик). Шкала – генетическая дистанция между гаплотипами.

результаты наших молекулярно-генетических исследований креветок не подтвердили гипотезу о комплексе криптических видов *P. soror* и генетической изолированности групп, обитающих на разных морских звездах-хозяевах в зал. Нячанг.

Возможно, это объясняется незначительным разнообразием генетической структуры вида *P. soror* в Индо-Вест-Пацифике, в частности “Коралловом Треугольнике” [33], что по-видимому, связано с природой симбиотических отношений между креветками и морскими звездами. Креветки *P. soror* встречаются на 21 виде морских звезд-

хозяев [19] в разнообразных местах обитания – от глубоководных песчаных грунтов до коралловых рифов и мелких лагун. Таким образом, личинки *P. soror* могут найти подходящую среду обитания везде, где присутствует любой из видов-хозяев. Эта природа отношений может облегчить генный поток среди популяций *P. soror* и объяснить их незначительную генетическую изменчивость в Индо-Вест-Пацифике.

За помощь при организации и проведении полевых работ авторы признательны руководству и техническому персоналу Российско-Вьетнамского

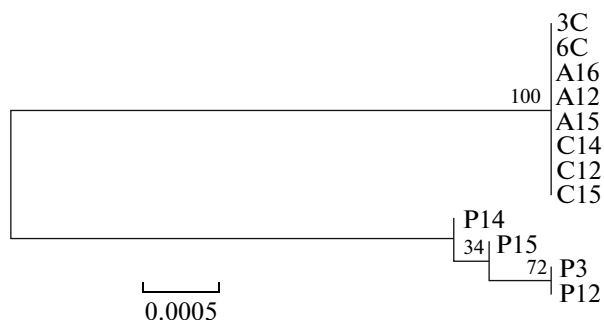


Рис. 4. Дендрограмма филогенетических отношений между гаплотипами *Periclimenes soror* (A и C) и *P. imperator* (P), построенная на основании фрагмента D1-D2 28S РНК (1050 пн) методом ближайшего связывания (Neighbor-Joining) с использованием модели Тамура–Нея. В узлах — результаты бутстреп-анализа (1000 реплик). Шкала — генетическая дистанция между гаплотипами.

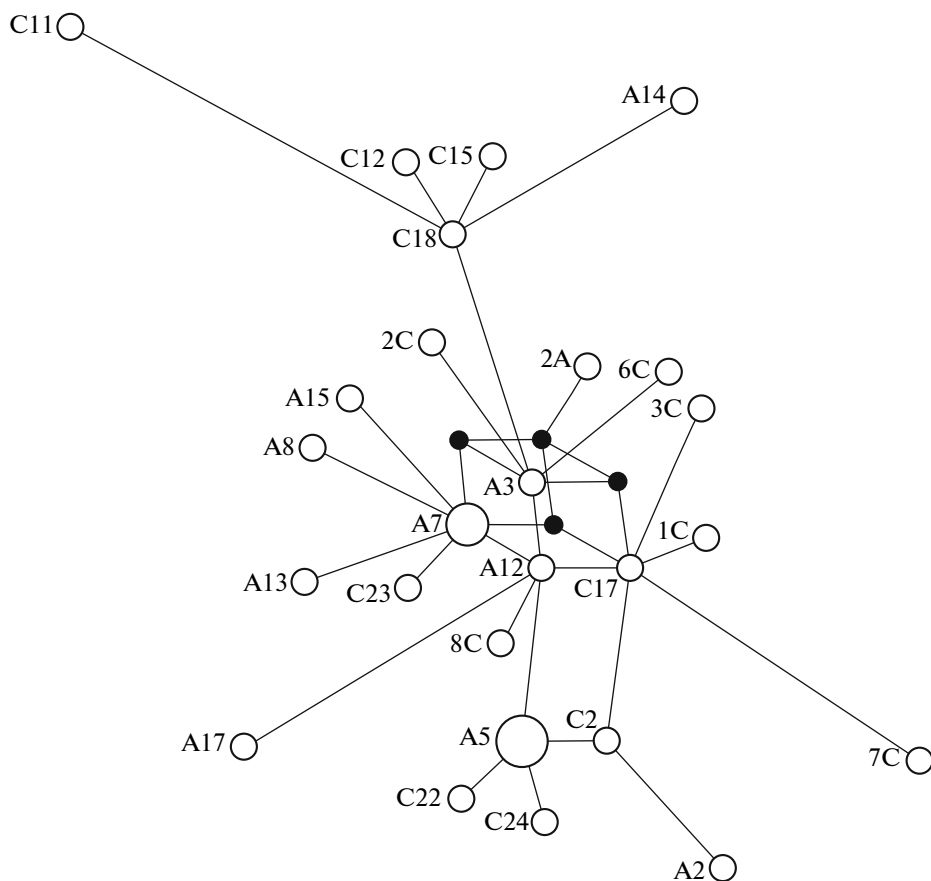


Рис. 5. Медианная сеть гаплотипов для выборки *Periclimenes soror*, построенная на основании фрагмента гена *COI* (625 пн). Белыми окружностями обозначены гаплотипы. Расстояния между гаплотипами пропорциональны генетическим дистанциям. Черными кружками обозначены гипотетические промежуточные гаплотипы.

тропического центра. Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией морфологии и экологии морских беспозвоночных Т.А. Бритаеву и сотрудникам Е.С. Меховой, И.Н. Марину, а также сотрудникам кабинета методов молекулярной

диагностики ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН за ценные консультации и помощь в обработке материала.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-92244-ГФЕН_а и выполнена в рамках Федераль-

ной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (2009-1.1-141-063-021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McLaughlin P.A.* Comparative morphology of recent Crustacea. San Francisco: WH Freeman, 1980.
2. *Tsoi K.H., Chan T.Y., Chu K.H.* Molecular population structure of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* species complex in western Pacific // *Marine Biology*. 2007. V. 150. P. 1345–1364.
3. *Stevens P.M.* A genetic analysis of the pea crabs (Decapoda: Pinnotheridae) of New Zealand. I. Patterns of spatial and host-associated genetic structuring in *Pinnotheres novaezelandiae* Filhol // *J. Experim. Marine Biology and Ecology*. 1990. V. 141. P. 195–212.
4. *Weber L.I., Galleguillos R.* Morphometric and electrophoretic evidences for two species of the genus *Liopeolothistes* (Crustacea: Decapoda: Porcellanidae) and some aspects of their variability // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1991. V. 100B. P. 201–207.
5. *Duffy J.E.* Species boundaries, specialization, and the radiation of sponge-dwelling alpheid shrimp // *Biological J. Linnean Society*. 1996. V. 58. P. 307–324.
6. *Knowlton N.* Cryptic and sibling species among the decapod Crustacea // *J. Crustacean Biology*. 1986. V. 6. P. 356–363.
7. *Chan T.Y., Crosnier A.* Crustacea Decapoda: Deep sea shrimps of the genus *Plesionika* Bate, 1888 (Pandalidae) from French Polynesia, with descriptions of five new species // *Resultats des Campagnes MUSORSTOM*. Vol. 18 / Ed. Crosnier A. *Memoirs du Museum national d'Histoire naturelle*. 1997. V. 176. P. 187–234.
8. *Chan T.Y.* The “*Plesionika rostricrescentis* (Bate, 1888)” and “*P. lophotes* Chace, 1985” species groups of *Plesionika* Bate, 1888, with descriptions of five new species (Crustacea: Decapoda: Pandalidae) // *Tropical deep-sea benthos*. Vol. 23 / Eds Marshall B., Richer de Forges B. *Memoirs du Museum national d'Histoire naturelle*. 2004. V. 191. P. 293–318.
9. *Knowlton N., Keller B.D.* Two more sibling species of alpheid shrimps associated with the Caribbean sea anemones *Bartholomea annulata* and *Heteractis lucida* // *Bul. Marine Science*. 1985. V. 37. P. 893–904.
10. *Williams S.T., Knowlton N., Weigt L.A., Jara J.A.* Evidence for three major clades within the snapping shrimp genus *Alpheus* inferred from nuclear and mitochondrial gene sequence data // *Molec. Phylogenetics and Evolution*. 2001. V. 20. P. 375–389.
11. *Gusmao J., Lazoski C., Sole-Cava A.M.* A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analysis // *Marine Biology*. 2000. V. 137. P. 435–446.
12. *Tsoi K.H., Wang Z.Y., Chu K.H.* Genetic divergence between two morphologically similar varieties of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* // *Marine Biology*. 2005. V. 147. P. 367–379.
13. *Bucklin A., Frost B.W., Kocher T.D.* Molecular systematics of six *Calanus* and three *Metridia* species (Calanoida: Copepoda) // *Marine Biology*. 1995. V. 121. P. 655–664.
14. *Knowlton N., Weigt L.A.* New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama // *Proc. Royal Society*. 1998. V. 265. P. 2257–2263.
15. *Sarver S.K., Silberman J.D., Walsh P.J.* Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies or species of the Florida spiny lobster *Panulirus argus* // *J. Crustacean Biology*. 1998. V. 18. P. 177–186.
16. *Knowlton N.* Sibling species in the sea // *Ann. Rev. Ecology and Systematics*. 1993. V. 24. P. 189–216.
17. *Knowlton N.* Molecular genetics analyses of species boundaries in the sea // *Hydrobiologia*. 2000. V. 420. P. 73–90.
18. *Bruce A.J.* The shrimps associated with the Indo-West Pacific echinoderms, with the description of a new species in the genus *Periclimenes* Costa, 1884 (Crustacea: Pontoninae) // *Memoirs Australian Museum*. 1982. V. 16. P. 191–216.
19. *Antokhina T., Marin I., Britayev T.* Distribution and host selection by shallow-water asteroid-associated pontonine shrimp *Periclimenes soror* Nobili, 1904 (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) in Nhatrang Bay, Vietnam // *Experim. Marine Biology*. 2010. В печати.
20. *Sakaji H., Okutani T.* Association of *Periclimenes soror* Nobili (Decapoda, Caridea) with starfishes off Kuroshima Island, Yaeyama group // *Res. Crustacea*. 1988. V. 17. P. 29–38. (in Japanese)
21. *Folmer O., Black M., Hoeh W. et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molec. Marine Biology and Biotechnology*. 1994. V. 3. P. 294–299.
22. *Sonnenberg R., Nolte A., Tautz D.* An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification // *Frontiers in Zoology*. 2007. V. 4:6.
23. *Hall T.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symposium*. 1999. V. 41. P. 95–98.
24. *Tamura K., Dudley J., Nei M. et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // *Molec. Biology and Evolution*. 2007. V. 24. P. 1596–1599.
25. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // *Evolut. Bioinformatics Online*. 2005. V. 1. P. 47–50.
26. *Possada D., Crandall K.* Selecting the best fit model of the nucleotide substitution // *Systematic Biology*. 2001. 50. P. 580–601.
27. *Hasegawa M., Kishino H., Yano T.* Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // *J. Molecular Evolution*. 1985. V. 22. P. 160–174.
28. *Tamura K., Nei M.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region

30. Bruce A.J. The evolution and zoogeography of shallow-water tropical shrimps // Informative Series, Department of Scientific and Industrial Research. New Zealand, 1978. V. 137. P. 337–355.
31. Salmon M., Ferris S.D., Johnston D. et al. Behavioral and biochemical evidence for species distinctiveness in the fiddler crabs *Uca speciosa* and *U. spinicarpa* // Evolution. 1979. V. 33. P. 182–191.
32. Knowlton N., Keller B.D. A new, sibling species of snapping shrimp associated with the Caribbean sea anemone *Bartholomea annulata* // Bul. Marine Science. 1983. V. 33. P. 353–362.
33. Crandall E.D., Jones M.E., Munoz M.M. et al. Comparative phylogeography of two seastars and their ectosymbionts within the Coral Triangle // Molec. Ecology. 2008. V. 17 (23). P. 5276–5290.

Molecular Genetic Analysis of the Two Morphs of Sea Star Shrimp *Periclimemes soror* Nobili, 1904, the Symbionts of Tropic Sea Stars

T. I. Antokhina and P. A. Sorokin

Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia
e-mail: tanya@sai.msu.ru

Two morphologically similar morphs of the *Periclimemes soror* shrimps were subjected to nucleotide sequence analysis of the mitochondrial *COI* gene fragment and highly variable nuclear fragment, D1/D2 domain of the large subunit of their ribosomal RNA genes. These shrimps are widely distributed in the Indo-West-Pacific and are obligate symbionts of sea stars. The morphs are different in color patterns, as well as in specific reaction relative to their hosts. The nucleotide sequence data obtained revealed no differentiation relative to the fragments examined.