

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 594:575

ГИБРИДИЗАЦИЯ ДВУХ ВИДОВ ДРЕЙССЕН *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) И *Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897) В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

© 2010 г. И. С. Ворошилова*, В. С. Артамонова**, А. А. Махров**, Ю. В. Слынько*

* Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок

** Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 117071 Москва, Ленинский просп., 33

e-mail: issergeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.04.2009 г.

Дрейссениды характеризуются высоким разнообразием по морфологии раковины. В связи с этим в совместных поселениях не всегда удается определить принадлежность некоторых особей к одному из двух видов *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) или *Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897). Возможно, что такие особи могут быть межвидовыми гибридами. Нами проведен анализ видоспецифичных аллозимных локусов типичных представителей двух видов дрейссенид и предполагаемых межвидовых гибридов. Впервые с использованием генетических методов в естественных условиях выявлен межвидовой гибрид *D. polymorpha* и *D. bugensis*. Показано, что материнским видом гибридной особи стала *D. bugensis*.

Быстрое расширение ареала бугской дрейссены (*D. bugensis*), которое происходит начиная с 1990-х гг., затронуло как пресноводные водоемы Европы, так и Северной Америки (Журавель, 1967; Антонов, 1993; Spidle *et al.*, 1994; Харченко, 1995; Rosenberg, Ludansky, 1995; Orlova *et al.*, 2003, 2004). По мере проникновения в водоемы, уже населенные *D. polymorpha*, *D. bugensis* стала образовывать с ней устойчивые совместные поселения; при этом сроки размножения обеих видов частично перекрываются.

Дрейссениды отличаются высоким разнообразием по форме раковины (Карпевич, 1955; Антонов, 1997), и это существенно затрудняет исследование смешанных популяций *D. polymorpha* и *D. bugensis* из-за того, что в них достаточно часто встречаются особи, не обладающие четкими диагностическими признаками того или иного вида. Такие особи были описаны, в частности, в совместных поселениях в Угличском и Рыбинском водохранилищах бассейна Верхней Волги и были предположительно интерпретированы как межвидовые гибриды (Orlova *et al.*, 2003).

В то же время генетические методы (анализ изоферментов и ДНК) показали, что дистанция между этими моллюсками значительна и характеризует их как таксономически валидные виды (Spidle *et al.*, 1994; Stepien *et al.*, 1999).

В ходе специального генетического исследования совместных поселений двух видов дрейссен в Великих озерах Северной Америки взрослых межвидовых гибридов обнаружено не было (Spidle *et al.*, 1995), а эксперимент по гибридизации дал неоднозначные результаты. Полученные гибридные личинки погибли, однако осталось не-

ясным, была ли связана их гибель с несовместимостью геномов двух видов моллюсков или это произошло из-за неподходящих условий выращивания личинок (Nichols, Black, 1994).

Цель исследования — выяснение возможного гибридного происхождения нетипичных морф в совместных поселениях двух видов дрейссен Рыбинского водохранилища с использованием методов биохимической и молекулярной генетики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью выявления гибридов генетическими методами в работе были проанализированы моллюски из смешанных популяций *D. polymorpha* и *D. bugensis* Волжского плеса Рыбинского водохранилища, собранные на станциях Глебово (58°00' с.ш.; 38°26' в.д.) и Коприно (58°05' с.ш.; 38°18' в.д.).

По форме створок раковины все исследованные особи отчетливо дифференцировались на три дискретные морфологические группы — типичные *D. polymorpha*, *D. bugensis* и особи, имевшие нетипичный морфотип, которых относили к группе вероятных межвидовых гибридов (рис. 1).

Для предполагаемых гибридов были характерны следующие морфологические признаки: в передней трети раковины четко выражен киль, что характерно для *D. polymorpha*, но располагается он ближе к спинному краю. В остальной части раковины киль закруглен и проходит ближе к середине створки — признак, отличающий *D. bugensis* (рис. 1).

Всего методами аллозимного анализа и анализа полиморфизма длины рестриктных фрагментов (ПДРФ) локуса COI митохондриальной ДНК

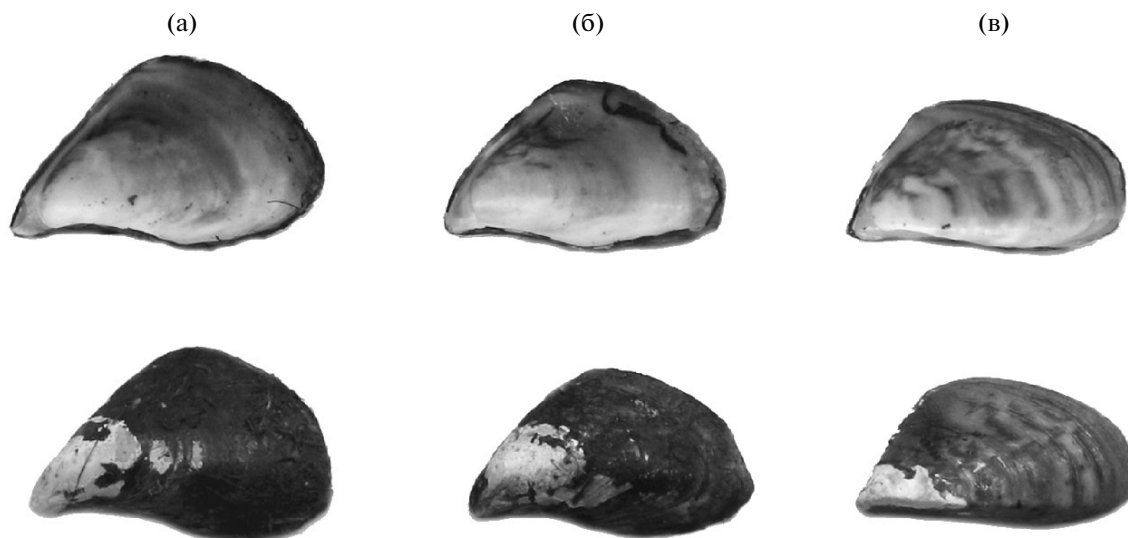


Рис. 1. Створки раковин дрейссенид: а — *D. bugensis*, б — гибрид *D. bugensis* × *D. polymorpha*, в — *D. polymorpha*.

(мтДНК) было изучено 37 экз. дрейссенид. Среди них присутствовали 10 экз. типичных *D. polymorpha*, 11 — *D. bugensis* и 16 особей, имевших нетипичный морфотип.

Собранный материал хранили в низкотемпературном холодильнике при -70°C , для аллозимного анализа использовали преимущественно ткани жабр дрейссен. Электрофорез ферментов проводили в 12.5%-ном крахмальном геле с использованием морфолинцитратной буферной системы (рН 6.8) (Clayton, Tretiak, 1972) или в 7.5%-ном полиакриламидном геле с использованием *трис*-ЭДТА-боратного буфера (Peacock *et al.*, 1965). Гистохимическое окрашивание выполняли по методикам (Aebersold *et al.*, 1987).

Для выявления гибридов использовали аллозимные локусы, которые согласно данным (May, Marsden, 1992; Spidle *et al.*, 1994; Андреева и др., 2001), могли оказаться видоспецифичными для *D. polymorpha* и *D. bugensis* или локусы, частоты аллелей которых существенно различались у этих двух видов (общий растворимый белок (*GP**), малатдегидрогеназа (*MDH-1**, *MDH-2**), фосфоглюкомутаза (*PGM**), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (*6-PGD**), малик-энзим (*MEP-2**), эстераза (*EST-2**)).

При определении видовой принадлежности материнского вида, что было особенно важно в случае предполагаемых гибридов, применяли метод анализа ПДРФ локуса COI митохондриальной ДНК (мтДНК). Ранее было показано, что нуклеотидная последовательность фрагмента этого локуса, длиной 619 пн, различается у двух видов дрейссен на 16–17% (Baldwin, 1996).

Для выявления диагностических сайтов рестрикции нами сопоставлены взятые из международной базы данных GenBank нуклеотидные последовательности *D. polymorpha* (AF510510) и *D. bugensis* (DQ 840132). Для подтверждения диагностической значимости сайтов рестрикции *Dra I* и *Rsa I* с помощью программы BLAST (NCBI, GenBank) проанализирован полиморфизм всех имеющихся в GenBank нуклеотидных последовательностей локуса COI для этих видов дрейссенид (*D. polymorpha*: AF120663, AF474404, AF479636, AF492005, AF510508–AF510510, AM748975–AM748977, AM748985, AM748986, AM748988–AM748990, AM748997, AM748999, AM749001, DPU47653, DQ840121–DQ840125, EF414493–EF414495, EU484431–EU484435, EU484437–EU484456; *D. bugensis*: AF096765, AF479637, AF495877, AF510504, DBU47650, DBU47651, DQ840132, EF080861, EF080862, EU484436, EU604834, EU651840).

ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из замороженных тканей моллюсков. Для синтеза фрагмента, содержащего сайты рестрикции по *Dra I* и *Rsa I*, диагностические для двух видов моллюсков, использовали праймеры 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' и 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer *et al.*, 1994).

Синтез вели на амплификаторе “Терцик” (ДНК-Технология, Москва) в 25 мкл буфера для амплификации фирмы “Fermentas” (Литва): 10 мМ *трис*-HCl (рН 8.8); 50 ммоль KCl, 1.5–2 ммоль MgCl_2 ; 0.08% Nonidet P40 (состав буфера приведен по данным фирмы-изготовителя). Смесь для амплификации содержала 100–300 нг

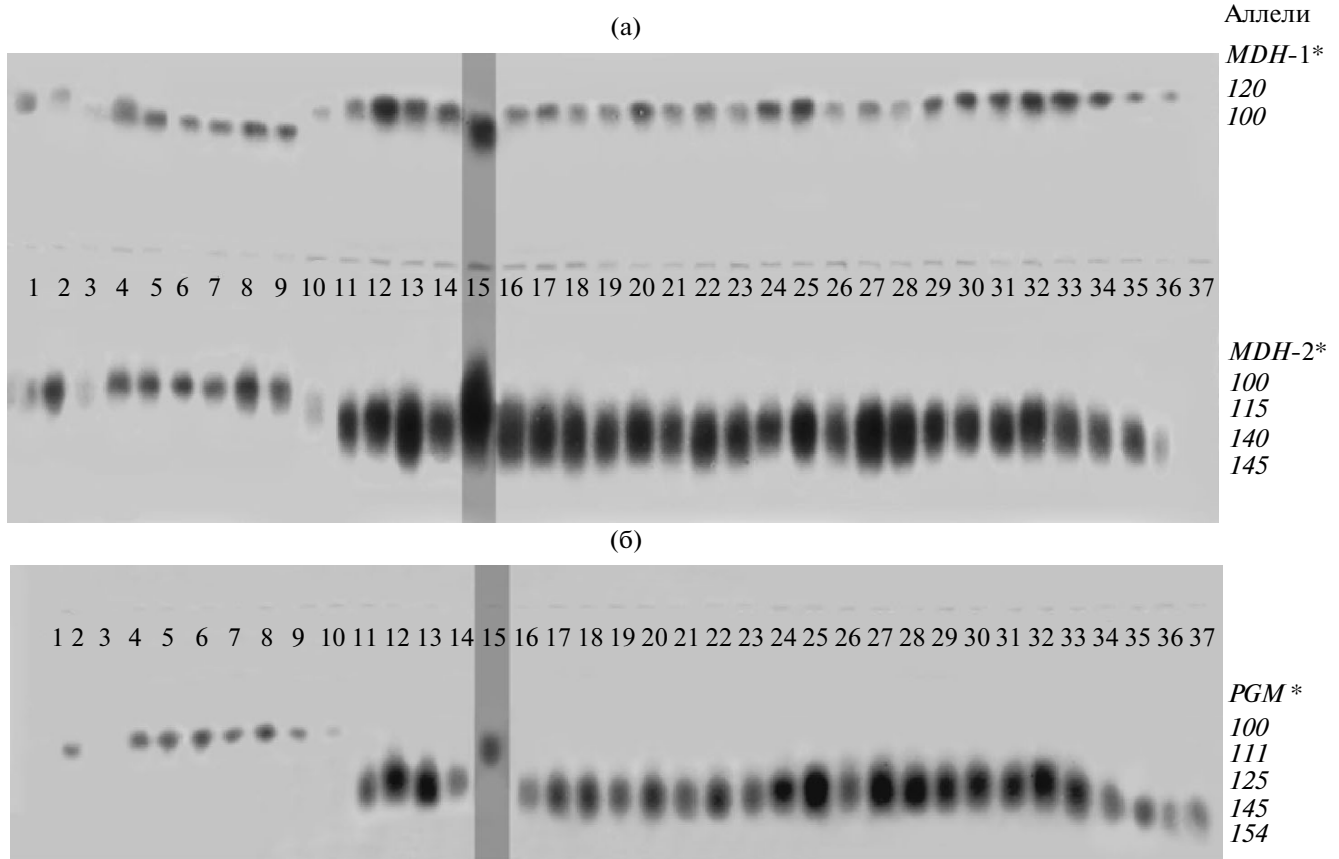


Рис. 2. Аллели аллозимных локусов малатдегидрогеназы (*MDH-1**, *MDH-2**) (а) и фосфоглюкомутазы (*PGM**) (б) в популяциях *D. polymorpha* (1–10 дорожки), *D. bugensis* (27–37 дорожки) и их предполагаемых гибридов (11–26 дорожки).

тотальной клеточной ДНК (содержание ДНК оценивали спектрофотометрически), по 10 пмоль каждого праймера, по 200 нмоль каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов и 0.5–1 ед. Таq-полимеразы (Бионем, Москва). Программа амплификации включала в себя этап первоначальной денатурации ДНК – 4 мин., 95°C; 35 циклов синтеза ДНК: 95°C – 50 с., 56°C – 50 с., 72°C – 1 мин, а также этап конечной элонгации: 72°C, 10 мин.

Рестрикцию полученного фрагмента проводили в буферах, рекомендованных производителем рестриктаз (Promega, США). Продукты рестрикции анализировали в 2%-ном агарозном геле с использованием *трис*-ацетатного буфера (40 ммоль *трис*-ацетат; 2 ммоль ЭДТА, pH 8). В качестве эталонных образцов длин фрагментов ДНК использовали двунитевые маркеры с шагом 50 п.н. в диапазоне от 50 до 800 п.н. с дополнительным фрагментом длиной 1800 п.н. (50 bp DNA Step Ladder, Promega). Гели окрашивали бромистым этидием (0.5 мкг/мл) и фотографировали в ультрафиолете ($\lambda = 312$ нм) цифровой камерой “Kodak” (DC 290 Zoom Digital Camera, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все проанализированные аллозимные локусы были полиморфны хотя бы у одного вида дрейссен. В то же время видоспецифичные аллели обнаружены только по локусам *MDH-2** и *PGM**, что позволяет использовать их для идентификации гибридов. *D. polymorpha* мономорфна по локусу, который представлен аллельным вариантом *MDH-2*100*, а у *D. bugensis* этот локус включает три аллеля: *MDH-2*115*, *MDH-2*140*, *MDH-2*145*. По локусу *PGM** оба вида имеют различные аллели: *D. polymorpha* – *PGM*100*, *PGM*111*, *D. bugensis* – *PGM*125*, *PGM*145*.

Среди предполагаемых гибридов лишь у одной особи были найдены сочетания аллелей аллозимных локусов, подтверждающие ее гибридное происхождение. Она оказалась гетерозиготой по локусам *MDH-2*100/115* и *PGM*100/125* (рис. 2). Остальные локусы оказались неинформативными для выявления гибридов в популяциях дрейссен Рыбинского водохранилища, однако данные по ним не противоречили сделанному выводу. В остальных 15 образцах предполагаемых гибридов

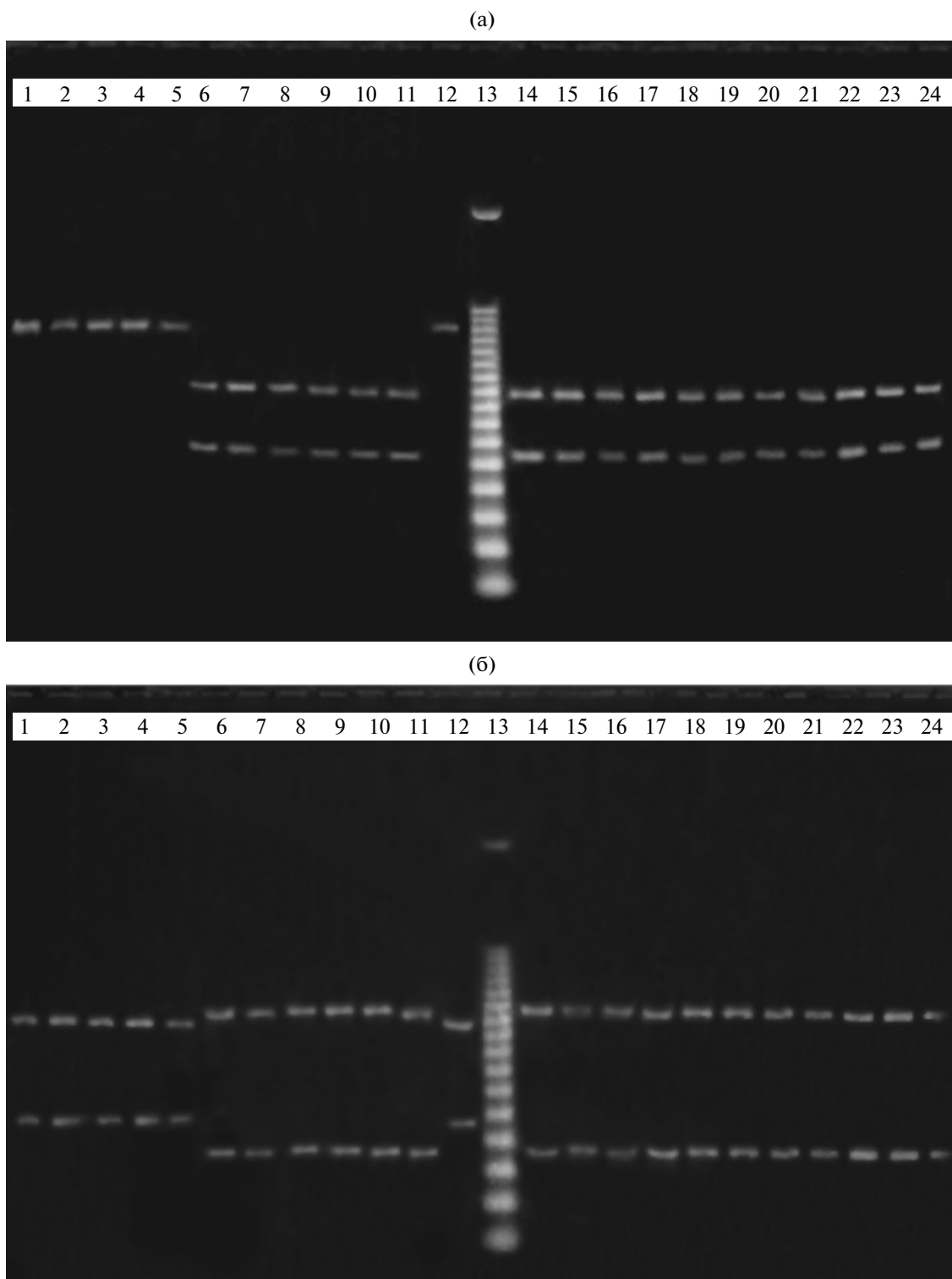


Рис. 3. Рестрикция продуктов полимеразной цепной реакции с использованием эндонуклеаз: а – *Dra I*, б – *Rsa I*. *D. polymorpha* (1–5 дорожки), предполагаемые гибриды *D. polymorpha* × *D. bugensis* (6–12, 14–19), *D. bugensis* (20–24), маркер (Fermentas) с шагом 50 пар нуклеотидов (13).

зарегистрированы только аллельные варианты, характерные для *D. bugensis* или общие для двух видов дрейссен (рис. 2).

ПДРФ анализ фрагмента гена COI мтДНК позволил установить, что материнским видом для особи, идентифицированной методами аллозим-

ного анализа как гибрид, была *D. polymorpha*. Анализ мтДНК остальных особей из выборки предполагаемых гибридов подтвердил их принадлежность к *D. bugensis* (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаружение особи, несомненно, гибридной природы в выборке из совместного поселения двух видов дрейссен служит прямым доказательством не только возможности гибридизации *D. polymorpha* и *D. bugensis* в естественных условиях, но и жизнеспособности гибридов. Вместе с тем, морфологические критерии определения гибридных особей оказались не вполне состоятельными, поскольку из 16 особей с отчетливо промежуточной формой створки раковины только одна оказалась настоящим гибридом. Данное обстоятельство вполне может быть следствием недостаточной изученности внутривидовой морфологической изменчивости, в особенности для *D. bugensis*.

Ранее было выявлено, что в совместных поселениях двух видов моллюсков аллели локусов *6-PGD** и *6-EST-2**, широко представленные у *D. bugensis*, встречались у особей *D. polymorpha* значительно чаще, чем в моновидовых поселениях этого вида. Кроме того, для *D. bugensis* был выявлен полиморфизм по локусу *6-EST-2**, сходный с полиморфизмом *D. polymorpha* (Андреева и др., 2001). Эти данные в сочетании с приводимыми нами доказательствами существования естественных межвидовых гибридов дают веские основания предполагать, что одним из последствий гибридизации бугской и полиморфной дрейссен является интрогрессия генов одного вида в геном другого.

Как гибридизация в первом поколении, так и ее интрогрессивные последствия ведут, как правило, к возрастанию не только генетической, но и морфологической изменчивости (Майр, 1968; Verspoor, Hammar, 1991). Известно, что при интрогрессивной гибридизации может происходить снижение численности одного из видов или замещение родительских форм гибридами в том случае, когда жизнеспособность гибридных особей не уступает жизнеспособности родительских видов (Rhymer, Simberloff, 1996). Поскольку гибриды могут обладать как меньшей, так и большей приспособленностью к локальным условиям по сравнению с родительскими таксонами (Burke, Arnold, 2001), существует вероятность того, что постепенное вытеснение *D. polymorpha* из смешанных популяций может быть связано не только с конкурентным преимуществом *D. bugensis*, но и с вытеснением одного вида другим путем гибридизации.

Авторы признательны В.Н. Яковлеву (ИБВВ РАН, пос. Борок) за ценные советы и замечания

при обсуждении материалов статьи, М.И. Орловой (ЗИН РАН, С.-Петербург) за обсуждение проблемы гибридизации дрейссенид и консультации по морфологической изменчивости, Г.Х. Щербине и Е.Г. Прянишниковой (ИБВВ РАН) за предоставленный материал, а также за первичную идентификацию видов и промежуточных форм.

Работа выполнена при поддержке программ фундаментальных исследований Президиума РАН “Биологическое разнообразие” (подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”) и “Биоразнообразие: инвентаризация, функции, сохранение” (проекты 2.3.1 и 2.3-П), а также программы ОБН РАН “Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами” и гранта РФФИ 10-04-00753-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева А. М., Орлова М.И., Слынько Ю.В. Популяционно — генетический анализ *Dreissena polymorpha* (Pallas) и *Dreissena bugensis* (Andr.) в водохранилищах Верхней Волги, дельте Волги и в западной части Финского залива Балтийского моря // Матер. Амер.-росс. симп. по инвазионным видам. Борок, 27–31 августа 2001 г. Борок: ИБВВ РАН; ИПЭЭ РАН, 2003. С. 9–11.
- Антонов П.И. О проникновении двустворчатого моллюска *Dreissena bugensis* (Andr.) в Волжские водохранилища // Экологические проблемы бассейнов крупных рек: Тез. докл. Междунар. конф. Тольятти: ИЭВБ РАН, 1993. С. 52–53.
- Антонов П.И. Эколого-физиологическая и эколого-морфологическая характеристика двустворчатого моллюска *Dreissena polymorpha* (Pallas) Волжских водоемов: Автореф. дис. канд. биол. наук. Н. Новгород: Нижегород. гос. ун-т, 1997. 23 с.
- Журавель П.А. О расселении дрейссены бугской в искусственных водоемах // Гидробиол. журн. 1967. Т. 3. № 2. С. 87–90.
- Карпевич А.Ф. Некоторые данные о формообразовании у двустворчатых моллюсков // Зоол. журн. 1955. Т. 34. № 1. С. 46–67.
- Майр Э. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир, 1968. 597с.
- Харченко Т.А. Дрейссена: ареал, экология, биопомехи // Гидробиол. журн. 1995. Т. 31. № 3. С. 3–21.
- Aebersold P.B., Winans G.A., Teel D.J. et al. Manual for Starch Gel Electrophoresis: A Method for the Detection of Genetic Variation // NOAA Technical Report NMFS. 1987. V. 61. P. 1–19.
- Baldwin B.S., Black M., Sanjurjo O. et al. A diagnostic molecular marker for zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and potentially co-occurring bivalves: Mitochondrial COI // Mol. Mar. Biol. Biotech. 1996. V. 5. P. 9–14.
- Burke J.M., Arnold M.L. Genetics and the fitness of hybrids // Annu. Rev. Genet. 2001. V. 35. P. 31–52.
- Clayton J.W., Tretiak D.N. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis // J. Fish. Res. Board Canada. 1972. V. 29. P. 1169–1172.

- Folmer O.M., Black W., Hoeh R. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. P. 294–299.
- May B., Marsden J.E. Genetic identification and implications of another invasive species of dreissenid mussel in the Great Lakes // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1992. V. 49. P. 1501–1506.
- Nichols S.J., Black M.G. Identification of larvae: the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*), and Asian clam (*Corbicula fluminea*) // Can. J. Zool. 1994. V. 72. P. 406–417.
- Orlova M.I., Antonov P.I., Shcherbina G.Kh., Therriault T.W. *Dreissena bugensis*: evolutionary underpinning for invasion success based on its range extension in Europe // Инвазии чужеродных видов в Голарктике: Матер. Амер.-росс. симп. по инвазионным видам. Борок, 27–31 августа 2001 г. Борок: ИБВВ РАН; ИПЭЭ РАН, 2003. С. 452–466.
- Orlova M.I., Muirhead J., Antonov P.I. et al. Range expansion of quagga mussels *Dreissena rostriformis bugensis* in the Volga River and Caspian Sea basin // Aquat. Ecol. 2004. V. 38. P. 561–573.
- Peacock A.C., Bunting S.L., Quenn K.G. Serum protein electrophoresis in acrilamide gel: patterns from normal human subjects // Science. 1965. V. 147. P. 1451–1452.
- Rhymer J.M., Simberloff D. Extinction by hybridization and introgression // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1996. V. 27. P. 83–109.
- Rosenberg G., Ludyanskiy M.L. A nomenclatural review of *Dreissena* (Bivalvia: Dreissenidae), with identification of the quagga mussel as *Dreissena bugensis* // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1994. V. 51. P. 1474–1484.
- Spidle A.P., Marsden J.E., May B. Identification of the Great Lakes quagga mussel as *Dreissena bugensis* from the Dnieper River, Ukraine, on the basis of allozyme variation // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1994. V. 51. P. 1485–1489.
- Spidle A.P., Marsden J.E., May B. Absence of naturally occurring hybridization between the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*D. polymorpha*) in the lower Great Lakes // Can. J. Zool. 1995. V. 73. P. 400–403.
- Stepien C.A., Hubers A.N., Skidmore J.L. Diagnostic genetic markers and evolutionary relationships among invasive dreissenoid and corbiculoid bivalves in North America: phylogenetic signal from mitochondrial 16S rDNA // Mol. Phyl. Evol. 1999. V. 13. P. 31–49.
- Verspoor E., Hammar J. Introgressive hybridization in fishes: the biochemical evidence // J. Fish Biol. 1991. V. 39. P. 309–334.

A Natural Hybridization of Two Mussel Species *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) and *Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897)

I. S. Voroshilova^a, V. S. Artamonova^b, A. A. Makhrov^b, and Yu. V. Slyn'ko^a

^a Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouz raion, Yaroslavl oblast, 152742 Russia

^b Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia
e-mail: issergeeva@yandex.ru, makhrov12@mail.ru

Received April 6, 2009

Abstracts—Dreissenids display a high diversity of shell morphology, and it is frequently difficult to ascribe some individuals from mixed populations to one of the two species, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) or *D. bugensis* (Andrusov, 1897). Presumably, such individuals may be interspecific hybrids. We have analyzed species-specific allozyme loci of the typical representatives of these two mussel species and putative interspecific hybrids. A natural interspecific hybrid between *D. polymorpha* and *D. bugensis* was discovered for the first time by genetic methods. It has been demonstrated that *D. bugensis* was a maternal parent.