

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА РІЗНИХ ПОСЛІДОВНИХ ГЕНЕРАЦІЙ СТАТЕВОЗРІЛИХ ОСОБИН РАПАНИ З ОДНОГО БІОТОПУ

В.А. ТОПТИКОВ^{1,1}, Т.Г. АЛЕКСЄЄВА^{2,2}, О.О. КОВТУН³, В.М. ТОЦЬКИЙ¹

¹ Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Біотехнологічний науково-навчальний центр,

² Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології,

³ Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, кафедра гідробіології та загальної екології, гідробіологічна станція ОНУ

E-mail: v.a.toptikov@gmail.com¹, t.alieksieieva@onu.edu.ua², hydrobiostation@gmail.com³, v.totsky@onu.edu.ua⁴

За допомогою алозимного аналізу порівнювали генетичну структуру двох різновікових вибірок рапани з одного біотопу (Одеська затока). Тестування генотипів проводили по 19 локусам дев'яти ензимів. Загальною особливістю генофонду обраних вибірок рапани є генетична нерівноважність та підвищений рівень наявної гетерозиготності за досліджуваними поліморфними локусами (в середньому 16–18 %). Різні статевозрілі покоління моллюска з одного біотопу мали порівняно менший рівень спорідненості, ніж вибірки моллюска з різних акваторій Чорного моря. Але у всіх випадках генетична відстань між досліджуваними сукупностями рапани була на рівні локальних популяцій. Аналіз ролі еволюційних факторів показав провідну роль міграцій у формуванні генофонду рапани північної частини Чорного моря.

Ключові слова: *Rapana venosa*, популяція, генетична структура, ізолими

Вступ. В даний час рапана (*Rapana venosa* Vallenciennes, 1846) як дуже небезпечний інвазійний об'єкт привертає до себе увагу дослідників не тільки в країнах басейну Чорного моря. Є дані про поселення цього моллюска в багатьох акваторіях Світового океану: біля Італії, Великобританії, Голландії, США, країнах Південної Америки, Нової Зеландії [1], що свідчить про великі пристосувальні здатності рапани. На цей час добре вивчені різноманітні аспекти адаптивних властивостей рапани як виду в цілому [2–9]. Однак засади значної пристосовуваності рапани, зокрема генетичні, вивчені недостатньо.

З'ясування генетичної організації поселень рапани у Чорному морі та механізми її формування є необхідним для прогнозування поширення рапани у цьому регіоні, впливу на існуючі біоценози, можливостей промислу її та інших видів і обґрунтуванні природоохоронних

заходів. На нашу думку, високі адаптивні здатності чорноморської рапани можуть бути обумовлені, крім морфо-фізіологічних та онтогенетичних особливостей, її значною генетичною поліморфністю. Механізми, що забезпечують високий рівень внутрішньої генетичної різноманітності *R. venosa*, є практично не з'ясованими. Раніше нами було зроблено припущення, що значна генетична гетерогенність та нерівноважність (відповідно до рівняння Харді-Вайнберга) поселень рапани у північно-західній частині Чорного моря пов'язана з високою інтенсивністю міграційних процесів [10]. Зазначене припущення ґрунтується на дослідженні невивіркових сукупностей особин моллюска, які перекриваються за віком, але відрізняються за місцем існування. В даній роботі проаналізовано групи статевозрілих моллюсків, що мешкають в одному біотопі, але різняться за віком, складаючи таким чином сукупності, які не перекриваються. У зв'язку з цим метою даної роботи було шляхом аналізу різних поколінь моллюска з одного біотопу визначити роль факторів динаміки популяцій, зокрема міграційних процесів, у формуванні генетичної структури угруповань рапани. Робоча гіпотеза полягає у наступному: у випадку наявності значного потоку генів і/або природного добору різні покоління рапани мають певним чином відрізнятися, незважаючи на те, що мешкають на одній території.

Матеріали та методи. Моллюсків збирали в серпні 2015 р. вручну невивірковим способом в районі Малого Фонтану в Одеській затоці в 50 м від берега на глибині 5–7 м. Зібраних моллюсків поділяли на дві вікові групи, одразу заморожували до -28°C і в такому стані зберігали до аналізу. Всього було проведено індивідуальний аналіз 26 особин дворічного віку і 26 моллюсків 4–5 річного віку.

Морфометричні та вікові параметри оцінювали за [11]. Отримання гомогенатів та розділення білків здійснювали, як описано у роботі [12]. В якості джерела ензимів використовували нефридій і лейбленівську залозу. В екстракті нефридія визначали естерази (КФ 3.1.1.-) – EST та DT-діафори (КФ 1.6.99.2) – DT, в лейбленівській залозі – кислі і лужні фосфатази (КФ 3.1.3.-) – ACP і ALP відповідно, НАДН-оксидази (КФ 1.6.99.3) – Nox, алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.1.1) – ADG, α -амілази (КФ 3.2.1.1) – Ami, АТФ-ази (КФ 3.6.1.-) – ATPase та глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) – Grx. Докладний опис виявлення естераз, фосфатаз та амілаз наведено в роботі [12]. Оксидоредуктази (DT-діафори, НАДН-оксидази, алкогольдегідрогенази та глутатіонпероксидази) виявляли за відновлення нітросинього тетразолію при окисленні відповідних субстратів (менадіону, НАДН·Н, етанолу та глутатіону відновленого відповідно) [13]. АТФази виявляли за методом Г. Гоморі, що ґрунтується на осадженні і візуалізації фосфату після гідролізу АТФ за допомогою сульфідів свинцю та кобальту [14].

Аналіз генетичної структури досліджуваних сукупностей рапани проводили за загальноприйнятими підходами та формулами [15–24]. Розраховували частоту алелів та їх похибку, ефективне число алелів n_e , наявну гетерозиготність за окремим локусом H_o , середню наявну гетерозиготність за всіма досліджуваними локусами H_o^{av} та її стандартну похибку, очікувану гетерозиготність за кожним окремим локусом H_e , середню очікувану гетерозиготність за досліджуваними локусами H_e^{av} та її стандартну похибку, дефіцит (або надлишок) гетерозиготності за кожним окремим локусом (D_H) та середній дефіцит (надлишок) за всіма досліджуваними локусами (D_H^{av}), їх похибку та вірогідність. Відповідність фактичних частот генотипів теоретично очікуваним згідно рівнянню Харді-Вайнберга оцінювали за допомогою критерію χ^2 при 5 % рівні значущості.

Коефіцієнт інбридингу F сукупності угруповань в цілому розраховували через варіансу Валунда; величину генного потоку між популяціями Nm обчислювали за рівняннями, наведеними у монографії Ю.П. Алтухова [17].

Коефіцієнт інбридингу в окремій досліджуваній сукупності F' розраховували через відношення наявної та спостережуваної гетерозиготності:

$$F' = 1 - H_o / H_e,$$

де H_o та H_e – наявна та очікувана гетерозиготність в окремій групі.

Кількісну оцінку ступеня близькосторідного схрещування здійснювали за допомогою коефіцієнтів інбридингу Райта: F_{IS} (коефіцієнт інбридингу особини відносно конкретного угруповання, до якого вона відноситься, показник дефіциту гетерозиготності у кожному угрупованні або гетерогенність в межах окремого поселення молюска), F_{IT} (коефіцієнт інбридингу особини відносно всієї популяції, показник дефіциту гетерозиготності у групі угруповань або гетерогенність у цілому в межах всіх досліджуваних поселень рапани) та F_{ST} (коефіцієнт інбридингу угруповання відносно всієї популяції, показник диференціації між досліджуваними угрупованнями).

Внесок окремих різновікових сукупностей молюсків у міжгрупову та внутрішньопопуляційну різноманітність оцінювали шляхом вилучення однієї із сукупностей за розрахунку генетичної різноманітності [25].

Ступінь генетичної подібності I та віддаленості D розраховували за H_{eem} та за індексом генетичної подібності Джеффріса-Матусіті (GSI).

Для розрахунку генетичної дистанції DH_{XY} між досліджуваними групами рапани використовували також метод, що базується на обчислюванні гетерозиготності [26]:

$$DH_{XY} = \frac{1 - \sum_{j=1}^{m_i} p_{xij} \times p_{yij}}{r},$$

де p_{xij} , p_{yij} – очікувана частота гомозиготних генотипів по кожному локусу двох порівнюваних груп (x та y), r – кількість локусів.

Інтенсивність дрейфу генів розраховували непрямым способом за двома формулами:

$$\delta = \sqrt{\frac{p \cdot q}{N_e}},$$

$$V_{\delta q} = q \times (1 - q) / 2N_e,$$

де δ , $V_{\delta q}$ – показники дрейфу генів, p, q – частоти альтернативних алелів, N_e – генетично ефективна чисельність популяції (вибірки).

Генетично ефективну чисельність популяції (вибірки) розраховували з використанням коефіцієнту інбридингу в окремій досліджуваній сукупності F' :

$$N_e = N/1 + F',$$

де N – загальна чисельність вибірки, F' – модуль значення коефіцієнту інбридингу.

Інтенсивність і спрямованість природного добору оцінювали за порівняння наявних та очікуваних вибіркових варіанс досліджуваних груп молюсків [17].

Всі розрахунки здійснювали на підставі матриць, створених у пакеті Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Морфометричні параметри досліджуваних груп рапани представлені в табл. 1. Як очікувалось, досліджувані вибірки суттєво різняться не тільки по лінійно-масовим параметрам, але й за статевою структурою. Останнє відповідає відомим спостереженням про переважання самців у старших вікових категоріях рапани [11, 27].

Для дослідження популяційно-генетичних показників було обрано такі ензимні системи,

які дозволили найбільш однозначно трактувати з генетичних позицій їх електрофоретичний розподіл. У відповідності з метою роботи, спрямованою на з'ясування внутрішньовидової гетерогенності, враховували лише поліморфні локуси. Всього для тестування генотипів обрано 19 локусів дев'яти ензимів (табл. 2).

Основні показники генетичної структури різновікових вибірок рапани наведено в табл. 2–4. Як видно, принципових якісних розбіжностей (наявність певних алелів і генотипів) у порівнюваних сукупностях молюска не спостерігається. За всіма досліджуваними поліморфними локусами в цілому статистично достовірної різниці у частотах алелів між досліджуваними групами молюску не виявлено: $p > 0,05$. Лише по локусу *Est-4* спостерігалась неоднакова зустрічальність альтернативних алелів у різних сукупностях молюска (табл. 2). Більш суттєва різниця між різними генераціями статевозрілих молюсків з одного біотопу відмічена щодо зустрічальності різних генотипів по досліджуваних поліморфних локусах. Вірогідно різняться частоти генотипів *Est-4Aa*, *Est-4aa*,

Таблиця 1. Середні значення морфометричних показників досліджуваних груп рапани

Статистичні показники	Морфометричні показники								
	Висота черепашки, Н, мм	Ширина черепашки, W, мм	Загальна маса, Σ, г	Маса черепашки, M _с , г	Маса м'якого тіла, M _б , г	W/H	M _б /Σ	Масивність черепашки, M _с /H, %	Коефіцієнт вгодваності, %
<i>Група молодих особин (n= 26) (♂=13, ♀=13)</i>									
Середнє та її стандартна похибка	66,51 ± 0,69	49,65 ± 0,56	47,24 ± 1,47	25,75 ± 0,76	21,48 ± 0,82	0,75 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,39 ± 0,01	32,14 ± 1,02
Коефіцієнт варіації, %	5,67	6,13	17,00	16,19	20,96	3,69	8,42	7,48	17,44
<i>Група літніх особин (n= 26) (♂=19, ♀=7)</i>									
Середнє та її стандартна похибка	83,46 ± 0,80	67,04 ± 0,68	109,00 ± 2,87	62,32 ± 1,76	46,68 ± 1,40	0,80 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,75 ± 0,02	55,70 ± 1,31
Коефіцієнт варіації, %	5,23	5,55	14,41	15,45	16,48	3,95	8,42	13,63	12,90
Достовірність різниці значень показників між групами, p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001

Примітка. p – рівень достовірності нульової гіпотези.

ACP-2Aa, ACP-2aa, Ami-3aa, Nox-1AA, Adgaa і Dt-aa (табл. 3). Виявлені також певні особливості, властиві обом досліджуваним угрупованням рапани. Не знайдено гомозигот «AA» по локусах *Ami-3*, *Adg* і *Est-6*, гомозигот «aa» локусу *gpx*, гетерозигот «ac» локусу *ATPase*. З незначною частотою зустрічаються генотипи «AA» локусу *Ami-2* та генотипи «ac» локусу *ATPase* (табл. 3).

Таблиця 2. Досліджувані поліморфні локуси та частота алелів у різних групах рапани

Локус (передбачувана структура білка)	Rf алозиму	Символ алозиму	n _e		Частоти алелів та їх стандартна похибка		
			Молоді особини	Літні особини	Молоді особини	Літні особини	Узагальнене угруповання*
<i>EST-2</i> (мономер)	0,35 0,30	A a	2,00	1,99	0,519 ± 0,069 0,481 ± 0,069	0,538 ± 0,069 0,462 ± 0,069	0,529 ± 0,049 0,471 ± 0,049
<i>EST-3</i> (мономер)	0,24 0,20	A a	1,90	1,86	0,385 ± 0,067 0,615 ± 0,067	0,365 ± 0,067 0,635 ± 0,067	0,375 ± 0,047 0,625 ± 0,047
<i>EST-4</i> (мономер)	0,10 0,08	A a	2,00	1,60	0,500 ± 0,069 0,500 ± 0,069	0,250 ± 0,060 0,750 ± 0,060	0,375 ± 0,047 0,625 ± 0,047
<i>EST-5</i> (мономер)	0,06 0,04	A a	1,93	1,97	0,596 ± 0,068 0,404 ± 0,068	0,558 ± 0,069 0,442 ± 0,069	0,577 ± 0,048 0,423 ± 0,048
<i>EST-6</i> (мономер)	0,03 0,02	A a	1,90	1,99	0,385 ± 0,067 0,615 ± 0,067	0,462 ± 0,069 0,538 ± 0,069	0,423 ± 0,048 0,577 ± 0,048
<i>ALP-1</i> (мономер)	0,26 0,23	A a	1,97	1,95	0,558 ± 0,069 0,442 ± 0,069	0,577 ± 0,069 0,423 ± 0,069	0,567 ± 0,049 0,433 ± 0,049
<i>ALP-2</i> (мономер)	0,14 0,12	A a	1,97	1,99	0,558 ± 0,069 0,442 ± 0,069	0,462 ± 0,069 0,538 ± 0,069	0,510 ± 0,049 0,490 ± 0,049
<i>ACP-1</i> (мономер)	0,22 0,20	A a	1,83	1,97	0,654 ± 0,066 0,346 ± 0,066	0,558 ± 0,069 0,442 ± 0,069	0,606 ± 0,048 0,394 ± 0,048
<i>ACP-2</i> (мономер)	0,07 0,04	A a	1,95	2,00	0,577 ± 0,069 0,423 ± 0,069	0,519 ± 0,069 0,481 ± 0,069	0,548 ± 0,049 0,452 ± 0,049
<i>AMI-1</i> (мономер)	0,37 0,33	A a	1,93	1,93	0,594 ± 0,068 0,406 ± 0,068	0,406 ± 0,068 0,594 ± 0,068	0,500 ± 0,049 0,500 ± 0,049
<i>AMI-2</i> (мономер)	0,19 0,15	A a	1,88	1,99	0,375 ± 0,067 0,425 ± 0,067	0,469 ± 0,069 0,531 ± 0,069	0,422 ± 0,048 0,578 ± 0,048
<i>AMI-3</i> (мономер)	0,05 0,02	A a	1,99	1,88	0,469 ± 0,069 0,531 ± 0,069	0,375 ± 0,067 0,625 ± 0,067	0,422 ± 0,048 0,578 ± 0,048
<i>NOX-1</i> (мономер)	0,13 0,11	A a	1,97	1,79	0,442 ± 0,069 0,558 ± 0,069	0,327 ± 0,065 0,673 ± 0,065	0,385 ± 0,048 0,615 ± 0,048
<i>NOX-2</i> (мономер)	0,05 0,04	A a	1,93	1,90	0,596 ± 0,068 0,404 ± 0,068	0,615 ± 0,067 0,385 ± 0,067	0,606 ± 0,048 0,394 ± 0,048
<i>ATPase</i> (мономер)	0,36 0,29 0,21	a b c	2,73	2,21	0,250 ± 0,060 0,481 ± 0,069 0,269 ± 0,062	0,192 ± 0,055 0,616 ± 0,067 0,192 ± 0,055	0,221 ± 0,041 0,548 ± 0,049 0,231 ± 0,041
<i>ADG</i> (димер)	0,08 0,03	A a	2,00	1,90	0,481 ± 0,069 0,519 ± 0,069	0,615 ± 0,067 0,385 ± 0,067	0,548 ± 0,049 0,452 ± 0,049
<i>DT-1</i> (мономер)	0,12 0,10	A a	1,95	2,00	0,423 ± 0,069 0,577 ± 0,069	0,481 ± 0,069 0,519 ± 0,069	0,452 ± 0,049 0,548 ± 0,049
<i>DT-2</i> (мономер)	0,05 0,03	A a	2,00	1,86	0,519 ± 0,069 0,481 ± 0,069	0,635 ± 0,067 0,365 ± 0,067	0,577 ± 0,048 0,423 ± 0,048
<i>GPX</i> (мономер)	0,46 0,36	A a	1,45	1,40	0,808 ± 0,055 0,192 ± 0,055	0,827 ± 0,052 0,173 ± 0,052	0,750 ± 0,042 0,250 ± 0,042

Різниця частот алелів у вибірках за критерієм χ^2

11,68 < p0,05 = 27,59

Примітка. Rf – відносна електрофоретична рухливість молекулярної форми ензимів, n_e – ефективне число алелів, * – розрахунки здійснювали по особинам обох вибірок.

З чим пов'язана вищезазначена різниця у зустрічальності альтернативних алелів та генотипів, припустити важко. Це може бути результатом ефекту «шийки пляшки» внаслідок переселення в Чорне море певної частини особин рапани з первісного ареалу. Не можна виключити також адаптивне значення визначених алозимів та збереження відповідних алелів в результаті природного добору. З'ясування цього питання потребує додаткових досліджень.

По деяких локусах в обох вибірках спостерігається нерівноважність частот деяких генотипів, що проявляється відхиленням від теоретично-можливих частот згідно з формулою Харді-Вайнберга (табл. 3). Як відомо, порушення генетичної рівноваги може відбуватися

за багатьох умов. Серед об'єктивних причин такого порушення можна назвати міграції, вплив відбору, не випадкове схрещування та ін. Враховуючи особливості біології рапани (суворо амфіміктичне розмноження, надзвичайна плодючість та дуже тривала пелагічна личинкова стадія) і наявність у Чорному морі течій, які забезпечують перенесення личинок на дальні відстані, найбільш вагомим чинником порушення генетичної рівноваги можна вважати потік генів [10]. З точки зору гіпотези В.М. Тоцького [28] про адаптивні комплекси генів, одним з вірогідних механізмів виникнення зазначених відхилень у частотах деяких генотипів є нерівноважність за зчепленням алельних генів різних локусів, і відповідно, позитивний добір за гаметогенезу кращик коадаптованих

Таблиця 3. Розподіл генотипів у досліджуваних угрупованнях рапани

Локус	Фактичні частоти генотипів											χ^2		
	Молоді особини						Літні особини					Молоді особини	Літні особини	
	AA	Aa	aa	AA	Aa	aa	AA	Aa	aa	AB	BC			
EST-2	0,04	0,96	0,00	0,08	0,92	0,00	23,32	20,08						
EST-3	0,00	0,77	0,23	0,04	0,65	0,31	11,03	5,02						
EST-4	0,12	0,76	0,12	0,11	0,27	0,62	8,17	1,61						
EST-5	0,19	0,81	0,00	0,12	0,88	0,00	12,82	17,29						
EST-6	0,00	0,77	0,23	0,00	0,92	0,08	11,03	20,08						
ALP-1	0,35	0,42	0,23	0,31	0,54	0,15	0,48	0,49						
ALP-2	0,15	0,81	0,04	0,08	0,77	0,15	11,33	8,46						
ACP-1	0,50	0,31	0,19	0,31	0,50	0,19	2,34	0,12						
ACP-2	0,27	0,62	0,11	0,08	0,88	0,04	2,15	16,36						
AMI-1	0,31	0,56	0,13	0,13	0,56	0,31	0,80	0,80						
AMI-2	0,06	0,63	0,31	0,06	0,81	0,13	2,38	7,18						
AMI-3	0,00	0,94	0,06	0,00	0,75	0,25	13,51	6,70						
NOX-1	0,15	0,58	0,27	0,04	0,58	0,38	1,02	3,13						
NOX-2	0,19	0,81	0,00	0,27	0,69	0,04	12,82	6,24						
ADG	0,19	0,58	0,23	0,31	0,62	0,07	0,88	2,82						
DT-1	0,08	0,69	0,23	0,19	0,58	0,23	5,11	0,88						
DT-2	0,19	0,66	0,15	0,27	0,73	0,00	2,90	9,49						
GPX	0,62	0,38	0,00	0,65	0,35	0,00	2,60	2,34						
ATPase	aa	bb	cc	ab	ac	bc	aa	bb	cc	ab	ac	bc	5,72	8,75
	0,12	0,18	0,12	0,27	0,00	0,31	0,00	0,27	0,04	0,38	0,00	0,31		

Примітка. χ^2 – значення коефіцієнту, напівжирним шрифтом помічені достовірні відхилення від рівняння Харді-Вайнберга, напівжирним курсивом відмічені частоти генотипів, що достовірно різняться в різних групах.

алелів, а також відхилення природнім добром менш пристосованих генотипів за їх розвитку.

Крім генетичної нерівноважності, досліджуваному генофонду рапани притаманний підвищений рівень наявної гетерозиготності (табл. 4). Середній надлишок гетерозиготних генотипів по поліморфних локусах знаходився в межах 16–18 %. За рівнем гетерозиготності поселення рапани у північній частині Чорного моря значно відрізняються від популяції рапани у Жовтому морі, де виявлено дефіцит гетерозигот [29, 30].

Як відомо, значна генетична варіабельність спостерігається за нестабільних умов довкілля і потенційно забезпечує високий рівень генетичної пристосованості [31–33]. Саме північ-

на частина Чорного моря, особливо північно-західна акваторія, характеризується суттєвими сезонними коливаннями температурного та сольового режиму. Можливо, що в таких умовах висока гетерозиготність чорноморської рапани визначає її значні пристосувальні можливості та забезпечує саме цій формі молюска можливість розповсюдитися в океанах земної кулі. Так, молекулярно-генетичним аналізом встановлено, що всі популяції у вторинних ареалах мають походження від чорноморської рапани, а не з первісного ареалу [34]. За думкою А.Б. Холіної та співавторів [35], однією з причин високого рівню гетерозиготності може бути відносно значна тривалість життя, що призводить до присутності поколінь, які перекрива-

Таблиця 4. Гетерозиготність груп рапани за досліджуваними поліморфними локусами

Локус	Досліджувані вибірки					
	Молоді особини			Літні особини		
	H _o	H _E	D	H _o	H _E	D
<i>EST-2</i>	0,962	0,519	-0,442	0,923	0,517	-0,406
<i>EST-3</i>	0,769	0,473	-0,277	0,654	0,482	-0,172
<i>EST-4</i>	0,769	0,500	-0,249	0,269	0,390	0,121
<i>EST-5</i>	0,808	0,482	-0,307	0,885	0,513	-0,372
<i>EST-6</i>	0,769	0,473	-0,277	0,923	0,517	-0,406
<i>ALP-1</i>	0,423	0,493	0,090	0,538	0,508	-0,031
<i>ALP-2</i>	0,808	0,493	-0,295	0,769	0,517	-0,252
<i>ACP-1</i>	0,308	0,471	0,163	0,500	0,513	0,013
<i>ACP-2</i>	0,615	0,508	-0,108	0,885	0,519	-0,365
<i>AMI-1</i>	0,563	0,515	-0,048	0,563	0,515	-0,048
<i>AMI-2</i>	0,625	0,500	-0,125	0,813	0,531	-0,281
<i>AMI-3</i>	0,938	0,531	-0,406	0,750	0,500	-0,250
<i>NOX-1</i>	0,577	0,513	-0,064	0,577	0,458	-0,119
<i>NOX-2</i>	0,808	0,501	-0,307	0,692	0,492	-0,200
<i>ADG</i>	0,577	0,519	-0,058	0,615	0,492	-0,123
<i>DT-1</i>	0,692	0,508	-0,185	0,577	0,519	-0,058
<i>DT-2</i>	0,654	0,519	-0,135	0,731	0,482	-0,248
<i>GPX</i>	0,385	0,323	-0,062	0,346	0,298	-0,048
<i>ATPase</i>	0,577	0,639	0,062	0,692	0,552	-0,140
Середні значення та стандартна похибка	0,664 ± 0,040	0,505 ± 0,013	-0,159	0,669 ± 0,042	0,490 ± 0,013	-0,178
<i>F</i>	0,003					

Примітка. H_o, H_E – гетерозиготність наявна і очікувана відповідно; D – дефіцит (надлишок) гетерозиготності; *F* – коефіцієнт інбридингу узагальненої сукупності вибірок, напівжирним курсивом відмічені достовірні значення надлишку гетерозигот.

ються, та збільшує ефективну генетичну чисельність популяцій. Зазначений механізм підвищення гетерозиготності може функціонувати також для чорноморського варіанту виду *R. venosa*.

Високий рівень гетерозиготності узгоджується із крайньою незначною вірогідністю інбридингу (негативні значення відповідних коефіцієнтів F' , F_{IS}) і невеликою розбіжністю між ефективною та прогнозованою кількістю алелів (табл. 5, табл. 2). Як видно з представлених даних (табл. 5), значення показників F_{IS} і F_{IT} значно більші, ніж рівень F_{ST} . Це свідчить про перевагу індивідуальної та внутрішньогрупової мінливості над генетичною гетерогенністю рапани північної частини Чорного моря.

Враховуючи розбіжності досліджуваних груп рапани за статевою структурою та деякими генетичними показниками, необхідним було визначити взаємозв'язок між алельним складом генотипів особин рапани та їх віком і статтю. Такий зв'язок, слабкий але вірогідний, був виявлений для локусів *EST-4* ($r = 0,44$, $df = 17$), *EST-6* ($r = 0,30$) і *ACP-2* ($r = 0,35$). Зазначену кореляцію враховували за розрахунку генетичних дистанцій та ролі еволюційних чинників у формуванні генетичної структури угруповань молюска.

Таким чином, різновікові групи рапани з одного біотопу на тлі значної схожості мають

розбіжності за морфометричними параметрами та певну, хоча незначну, генну диференціацію за показниками індексів F_{ST} і G_{ST} (табл. 5). Наступним етапом аналізу різновікових груп молюску було визначення ступеню їх генетичної дивергенції.

Раніше нами було показано, що генетична дистанція між поселеннями рапани з однієї акваторії, досліджена в різні роки, виявляється більшою, ніж відстань між угрупованнями молюсків з різних місць його мешкання в один і той же рік [10]. На підставі отриманих даних про меншу спорідненість різних послідовних поколінь рапани з одного біотопу у порівнянні зі спорідненістю вибірок молюсків із різних акваторій (табл. 6) можна припустити, що у міжрічну різницю наявної генетичної структури поселень рапани суттєвий внесок здійснюють саме молоді, тобто нові щодо існуючої популяції статевозрілі особини молюсків. Внесок групи молодих особин у внутрішньопопуляційну різноманітність був дещо більший (на 1,7 %), ніж внесок старших молюсків. При цьому на підставі показника F_{IS} та аналізу міжвибіркової генетичної різноманітності D_{ST} можна зробити висновок, що сама по собі група старших молюсків більш гетерогенна. Можливо, ця гетерогенність старших рапан пов'язана зі статевим складом цієї групи, а саме – з переважанням самців. Відомо, що особинам чоловічої

Таблиця 5. Показники генетичної мінливості досліджуваних угруповань рапани

Досліджувані вибірки	Показники генної диференціації та ступеню інбридингу					
	F'	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}	D_{ST}
Молоді особини	-0,296 (-0,315)	-0,129* (-0,141)	-0,124* (-0,187)	0,004* (-0,041*)		
Літні особини	-0,347 (-0,364)	-0,159* (-0,175)	-0,124* (-0,187)	0,028* (-0,010*)		
Сукупність вибірок	-0,124 (-0,187)	-0,318 (-0,344)	-0,308 (-0,331)	0,009 (0,011)	0,023 (0,029)	0,018 (0,015)

Примітка. F' – коефіцієнт інбридингу окремої вибірки, F_{IS} – міра відхилення фактичних і очікуваних частот генотипів усередині окремих вибірок, F_{IT} – міра відхилення фактичних і очікуваних частот генотипів окремої вибірки у порівнянні з узагальноною сукупністю вибірок, F_{ST} – міра генної диференціації досліджуваних вибірок, G_{ST} – відносна генна диференціація між досліджуваними вибірками (генна різноманітність сукупної вибірки); D_{ST} – міжвибіркова генетична різноманітність; напівжирним шрифтом вказані результати розрахунків без локусів, які корелюють із віком та статтю; у дужках – результати за всіма локусами; * – розраховано для окремої вибірки відносно узагальноної сукупності вибірок.

статі притаманний більш високий рівень генетичної дисперсії, тобто гетерогенності [36].

Постає питання, яка роль основних еволюційних факторів у формуванні особливостей генофонду рапани? Ми добре усвідомлюємо складність рішення поставленої задачі. З одного боку, з'ясування проблеми лімітує недостатня база існуючих польових спостережень. З іншого боку, застосування рівнянь популяційної генетики має свої обмеження і

потребує дотримання визначених умов. Тим не менш, зроблена нами спроба дозволить попередньо оцінити вплив того чи іншого фактору на формування генетичної структури північно-західних поселень рапани.

Як видно (табл. 7), досліджувані сукупності рапани властиве високе значення ефективної чисельності N_e . Велике значення N_e , незначний рівень генетичної диференціації досліджуваних сукупностей молюсків непрямо

Таблиця 6. Генетична спорідненість досліджуваних вибірок рапани північної частини Чорного моря (за поліморфними локусами)

Порівнювані групи рапани (вік та місця і рік збору)	Показники					Джерело
	спорідненості		генетичної дивергенції			
	J	GSI	F _{ST}	D	DH _{XY}	
Молоді та літні особини	0,923 (0,975)	0,958 (0,956)	0,009 (0,011)	0,080 (0,025)	-0,083 (-0,105)	Дана робота
Одеса і Тарханкут (2012 р.)	0,984	0,951	0,009	0,017	-0,005	Toptikov et al., 2017.
Одеса і Карадаг (2012 р.)	0,983	0,961	0,009	0,017	-0,093	
Одеса і Тарханкут (2013 р.)	0,991	0,960	0,005	0,009	-0,013	Дана робота
Одеса і о. Зміїний (2013 р.)	0,998	0,962	0,006	0,012	-0,008	
Одеса (2012 р.) і Одеса (2013 р.)	0,968	0,931	0,015	0,032	+0,039	
Тарханкут (2013 р.) і Тарханкут (2013 р.)	0,984	0,930	0,016	0,016	+0,003	

Примітка. J – індекс генетичної схожості за Неєм, GSI – індекс генетичної подібності Джеффриса-Матусіти, F_{ST} – ступінь диференціації генів між популяціями за частотами алелів, D – індекс генетичної відстані за Неєм, DH_{XY} – генетична дистанція за Вольфом та ін.; напівжирним шрифтом вказані результати розрахунків без локусів, які корелюють із віком та статтю; у дужках – результати за всіма локусами.

Таблиця 7. Значення деяких еволюційно значущих показників

Вибірки	Показники				
	N _e /N	N _m	δ	V _{dq}	f _o -f _e
Група молодих особин	0,769 (0,758)	55,622 (-6,40)	0,048 (0,041)	0,001 (0,005)	-0,007 (-0,067)
Група літніх особин	0,741 (0,735)	8,792 (-25,01)	0,049 (0,042)	0,001 (0,005)	-0,009 (-0,008)
Вся сукупність	0,890 (0,840)	29,040 (22,087)	0,031 (0,026)	0,000 (0,002)	-0,021 (-0,018)
Максимальне можливе значення показника	>1*	→∞	0,353	0,125	→1

Примітка. N_e/N – відношення ефективної чисельності групи до загальної, * – значення показника може бути значно більшим одиниці у випадку наявності поколінь, що перетинаються; δ, V_{dq} – показники дрейфу генів, f_o-f_e – різниця між фактичною (наявною) та очікуваною варіансами, напівжирним шрифтом вказані результати розрахунків без локусів, які корелюють із віком та статтю; у дужках – результати за всіма локусами.

свідчать про низький рівень генетичного дрейфу. Цей висновок підтверджується розрахунками показників дрейфу (табл. 7).

Оцінка ролі природного добору представляється найбільш складною. Генетична гетерогенність досліджуваних угруповань рапани може віддзеркалювати існування добору. В якості попереднього рішення цієї задачі ми використали підхід, що ґрунтується на порівнянні вибіркового варіансу, запропонований в роботах Ю.П. Алтухова [17]. В середньому та в більшості випадків аналізу по окремих локусах величина очікуваної варіанси (f_e) була незначно більша за фактичну (f_o). Якщо $f_o < f_e$, то спостерігається дія стабілізуючого добору [17]. Найбільш помітна роль цього типу добору була виявлена стосовно всіх локусів амілаз (значення $f_o - f_e$ коливалось для різних вибірок і локусів від $-0,018$ до $-0,048$) та локусу NOX-2 ($f_o - f_e = -0,034$). Зазначені гени мають пряме відношення до енергетичного обміну, необхідного для підтримання життєдіяльності всіх живих істот. Амілази необхідні для утилізації головного джерела енергії у рапани – глікогену [37], а НАДН-оксидаза – є ключовим ферментом електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях. Вірогідно, стабілізуючий добір зберігає оптимальну композицію алелів і значну гетерозиготність цих локусів (табл. 3).

Обчислення показника N_m показало великий його значення. Для всього досліджуваного поселення рапани він мав значення 29,040. Згідно з С. Райтом [38] при $N_m > 0,5$ спостерігається суттєва перевага потоку генів над дрейфом. За розрахунками М. Кімури і Т. Маруяма [39], якщо показник міграції перебільшує 4, то популяція виявляє себе як єдина панміктична структура. Велике значення міграції у визначенні гнучкої генетичної структури угруповань рапани можна пояснити двома головними факторами: наявністю особливих різноманітних течій у Чорному морі [40, 41] та тривалою пелагічною личинковою стадією молюска [2]. Це, у поєднанні з великою плодючістю рапани забезпечує винесення значної кількості тварин у відкрите море, перенесення їх на дальні відстані та схрещування з місцевими особинами.

Таким чином, аналіз генетичної структури різновікових груп рапани з одного біотопу надав додаткові підтвердження зробленого

нами припущення про провідну роль міграцій у формуванні генофонду рапани північної частини Чорного моря. Отримані результати також свідчать про вірогідне значення стабілізуючого добору у підтриманні високого рівня гетерозиготності особин цього молюска.

THE GENETIC STRUCTURE OF DIFFERENT SEQUENTIAL GENERATIONS OF MATURE VEINED RAPA WHELK FROM ONE BIOTOPE

V.A. Toptikov, V.M. Totsky,
T.G. Aliksieieva, O.O. Kovtun

Odessa I. I. Mechnikov National University,
Biotechnological Scientific Educational Center
Odessa I. I. Mechnikov National University,
Department of Genetics and Molecular Biology
Odessa I. I. Mechnikov National University,
Department of Hydrobiology and General Ecology,
Hydrobiological Station

E-mail: v.a.toptikov@gmail.com,
t.aliksieieva@onu.edu.ua,
hydrobiostation@gmail.com, v.totsky@onu.edu.ua

Allozyme analysis was used for comparison the genetic structure of two different ages veined rapa whelk communities from one biotope (Odessa Bay). Testing of genotypes was performed at 19 loci of nine enzymes. A common feature of the gene pool of *Rapana* selected samples is a significant genetic disequilibrium and an elevated level of available heterozygosity of polymorphic loci studied (an average of 16–18 %). Different sexually mature generations of mollusks from a single biotope had a relatively lower level of kinship than groups of *Rapana venosa* individuals from different areas of the Black Sea. It is characteristic that genetic distance between the investigated *Rapana* populations was at the level of local populations in all cases. The leading role of migrations in the rapa whelks gene pool formation at the waters of Black Sea northern part have been demonstrated by the analysis of the role of evolutionary factors.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА РАЗНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ГЕНЕРАЦИЙ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ ОСОБЕЙ РАПАНЫ ИЗ ОДНОГО БИОТОПА

В.А. Топтиков, В.М. Тоцкий,
Т.Г. Алексеева, О.А. Ковтун

С помощью аллозимного анализа сравнивали генетическую структуру двух выборок рапаны разного возраста из одного биотопа (Одесский залив). Тестирование генотипов проводили по 19 локусам девяти ферментов. Общей особенностью генофонда

избранных выборок рапаны является значительная генетическая неравновесность и повышенный уровень имеющейся гетерозиготности по исследуемым полиморфным локусам (в среднем 16–18 %). Разные половозрелые поколения моллюска из одного биотопа имели сравнительно меньший уровень родства, чем группы особей этого моллюска из разных акваторий Черного моря. Характерно, что во всех случаях генетическое расстояние между исследуемыми совокупностями рапаны было на уровне локальных популяций. Анализ роли эволюционных факторов продемонстрировал ведущую роль миграций в формировании генофонда рапаны северной части Черного моря.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Mann, R., Occhipinti, A., and Harding, J.M., International Council for the Exploration of the Sea, no. 264, Alien Species Alert: *Rapana venosa* (veined whelk), *ICES Cooperative Res. Rep.*, 2004, 14 p.
- Chukhchin, V.D., *Functional morphology of Rapana*, Kyiv, Naukova Dumka, 1970.
- Chukhchin, V.D., *The ecology of gastropods of the Black Sea*, Kyiv, Naukova Dumka, 1984.
- Gaevskaya, A.V., *Parasites, diseases and pests of mussels (Mytilus, Mytilidae). II. Mollusks*, Sevastopol, ECOSY-Hydrophysics, 2006.
- Shadrin, N.V., Afanasyev, T.A., Nutrition and the distribution of *Rapana venosa* (Vallenciennes, 1846) in the waters of Opuksy Reserve (Eastern Crimea, the Black Sea), *Marine Ecol. J.*, 2009, vol. 8, no. 2, pp. 24.
- Zaika, V., Sergeeva, N., and Kolesnikova, E., Alien species in bottom macrofauna of the Black Sea: their distribution and influence on benthic communities, *Marine Ecol. J.*, 2010, vol. 9, no. 1, pp. 5–7.
- Zolotarev, V., The Black Sea ecosystem changes related to the introduction of new mollusk species, *Marine Ecol.*, 1996, vol. 17, no. 1–3, pp. 227–36.
- Mann, R., Harding, J.M., Salinity tolerance of larval *Rapana venosa*: implications for dispersal and establishment of an invading predatory gastropod on the North American Atlantic coast, *Biol. Bull.*, 2003, vol. 204, no. 1, pp. 96–103. doi: 10.2307/1543499.
- Savini, D., Occhipinti-Ambrogi, A., Consumption rates and prey preference of the invasive gastropod *Rapana venosa* in the Northern Adriatic Sea, *Helgol. Mar. Res.*, 2006, vol. 60, pp. 153–9. doi: 10.1007/s10152-006-0029-4.
- Toptikov, V.A., Totsky, V.N., Alyeksyeyeva, T.G., and Kovtun, O.A., Population genetic structure of veined Rapa whelk communities in the Northwestern Black sea, *Cytol. Genet.*, 2017, vol.51, no. 4, pp. 253–62. doi: 10.3103/S0095452717040107.
- Kovtun, O.O., Toptikov, V.A., and Totsky, V.M., Comparative morphological characteristic of *Rapana venosa* (Gastropoda: Muricidae, Rapaninae) from different water areas of the northern part of the Black sea, *ONU Herald. Biology*, 2014, vol. 19, no1, pp. 68–80. doi: 10.18524/2077-1746.2014.1(34).39991.
- Toptikov, V.A., Totsky, V.N., Alieksieieva, T.G., and Kovtun, O.A., Hydrolytic enzymes expressivity in different parts of the *Rapana* digestive system, *Ukr. Biochem. J.*, 2016, vol. 88, no 3, pp. 5–17. doi: 10.15407/ubj88.03.005.
- Manchenko, G.P., *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*, CRC Press, 2003.
- Burstone, M.S., *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms*, Academic Press: New York–London, 1962.
- Ayala, F. J., *Population and evolutionary genetics: a primer*, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, 1982.
- Ayala, F.J., and Kiger, J. A., *Modern Genetics*, 2nd Edition, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, 1984.
- Altukhov, Yu.P., *Genetic processes in populations*, Moscow, Akademkniga, 2003.
- Kartavtsev, Yu.F., *Molecular evolution and population genetics*, FEFU Publishing house, Vladivostok, 2008.
- Li, Ch.Ch., *First course in population genetics*, Pacific Grove, California, 1976.
- Physiological and biochemical and genetic studies of fish fauna of the Azov-Black Sea pool: Methodological Guide, Everest, Rostov-on-Don, 2005.
- Wright, S., The genetical structure of populations, *Ann. Eugen*, 1951, vol. 15, no. 4, pp. 323–54.
- Wright, S., *Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations*, Univ. Chicago Press, 1984.
- Nei, M., Genetic distance between populations, *Amer. Naturalist*, 1972, vol. 106, no. 949, pp. 283–92. doi: 10.1086/282771.
- Slatkin, M., Gene flow in natural populations, *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 1985, vol. 16, pp. 393–430. doi: 10.1146/annurev.es.16.110185.002141.
- De Vicente, M. C., Lypez, C., Fulton, T., *Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module*, International Plant Genetic Resources Institute (Ipgr), Rome, 2004.
- Wolf, J., Dietl, G., Peškovičová, D. and Langhammer, M., Heterozygosity between populations – a possible alternative to measures of genetic distance, *Arch. Tierz.*, 2001, vol. 44, no. 2, pp. 231–6. doi: 10.5194/aab-44-231-2001.
- Bondarev I.P., Dynamics of *Rapana venosa* (VALLENCIENNES, 1846) (Gastropoda: Muricidae) population in the Black sea, *Internatiol Journal of Ma-*

- rine Science*, 2014, vol. 4, no 03, pp. 42–56. doi: 10.5376/ijms.2014.04.0003.
28. Totskiy, V.N., Khaustova, N.D., Alshibli, N.M., and Sechnyak, A.L., Genetic and Biochemical Mechanisms of Ontogenetic and Phylogenetic Adaptation, *Cytology and Genetics*, 2002, vol. 36, no. 3, pp. 69–75.
 29. Yang, J., Li, Q., Kong, L., Zheng, X. and Wang, R., Genetic structure of the veined rapa whelk (*Rapana venosa*) populations along the coast of China, *Biochem. Genet.*, 2008, vol. 46, no. 9–10, pp. 539–48. doi: 10.1007/s10528-008-9168-4.
 30. An, J., Yu, H., Yu, R., Kong, L. and Li, Q., Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the veined rapa whelk (*Rapana venosa*), *Conservation Genet. Resour.*, 2013, vol 5, pp. 1049–51. doi: 10.1007/s12686-013-9967-8.
 31. Ayala, F.J., Hedgecock, G.S., and Zumwalt, J.M. V., Genetic variation in *Tridacna maxima*, an ecological analog of some unsuccessful evolutionary lineages, *Evolution*, 1973, vol. 27, pp. 177–91. doi: 10.2307/2406959.
 32. Johnson, G.B., Enzyme polymorphisms and metabolism, *Science*, 1971, vol. 184, pp. 28–37. doi: 10.1126/science.184.4132.28.
 33. Leclair, L.L., Phelps, S.R. Genetic characteristics and relationships of five razor clam (*Siliqua parula* Dixon) populations along the Pacific coast of North America, *J. Shellfish. Res.*, 1994, vol. 13, pp. 207–16.
 34. Chandler, E.A., McDowell, J.R., and Graver, J.E., Genetically monomorphic invasive populations of the rapa whelk, *Rapana venosa*, *Mol. Ecol.*, 2008, vol. 17, no. 18, pp. 4079–91. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03897.x.
 35. Kholina, A.B., Koren, O.G., and Zhuravlev, Yu.N., High level of polymorphism and autotetraploid origin of the rare endemic species *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) inferred from allozyme data, *Russian J. Genet.*, 2004, vol. 40, no 4, pp. 497–505.
 36. Geodakyan, V.A., *Further development of the genetic and ecological theory of sex differentiation*, Mathematical Methods in Biology, Kiev, Naukova Dumka, 1982, pp. 46-60.
 37. Sayenko, E.M., Dynamics of biochemical indicators of *Rapana* (*Rapana thomasiana*) tissues at different periods of the annual cycle, *Problems of fisheries*, 2008, vol. 36, no 4, pp. 788–96.
 38. Wright, S., Evolution in mendelian populations, *Genetics*, 1931, vol. 16, no. 2, pp. 97–159.
 39. Kimura, M., Maruyama, T., Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population, *Genet. Res*, 1971, vol. 18, pp. 125–31. doi: org/10.1017/S0016672300012520
 40. Ivanov, V.A., Belokopytov V.N, *Oceanography of the Black Sea*, ECOSY-Hydrophysics, Sevastopol, 2011. Belevich, R.R., Skipa, M.I., and Sryberko, A.V., Quantitative evaluation of mass transfer Black Sea water flows on climate data, *Ecol. Safety Coastal Shelf Zones Sea*, 2013, vol. 27, pp. 221–5.

Надійшла 23.11.17