

УДК 57.063.7:594.1

## СРАВНЕНИЕ ВИДОВ *Sinanodonta amurensis* Moskvicheva, 1973 И *Sinanodonta primorjensis* Bogatov et Zatravkin, 1988 (Bivalvia: Unionidae: Anodontinae) НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗМЕНЧИВОСТИ *cox1* ГЕНА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И КОНХОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

© 2017 г. Е. М. Саенко\*, @, М. Сорока\*\*, С. К. Холин\*

\*Биолого-почвенный институт ДВО РАН, 690022 Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

\*\*Щецинский университет, биологический ф-т, каф. генетики, Felczaka 3с, 71-412 Щецин, Польша

@E-mail: sayenko@ibss.dvo.ru

Поступила в редакцию 10.03.2016 г.

Впервые проведено сравнение митохондриальных гаплотипов и конхологических признаков раковин двух видов пресноводных двустворчатых моллюсков (беззубок) из азиатского рода *Sinanodonta* (*S. amurensis* и *S. primorjensis*), которое подтвердило сходство обоих таксонов. На основе статистического анализа показано, что обсуждаемые виды не различаются между собой ни по конхологическим, ни по молекулярно-генетическим признакам, а выявленные различия относятся к внутривидовой генетической и географической изменчивости.

DOI: 10.7868/S0002332917030080

Систематика пресноводных двустворчатых моллюсков, особенно беззубок (подсем. Anodontinae Rafinesque, 1820 и Pseudanodontinae Jaekel, 1962 из сем. Unionidae Fleming, 1828), чаще всего основывается на морфологических отличиях раковин взрослых моллюсков, не имеющих выраженных видоспецифичных признаков. Среди беззубок подсем. Anodontinae наиболее проблематичен таксономический статус рода *Sinanodonta* Modell, 1945. Первоначально род *Sinanodonta* был разделен на три подрода: *Sinanodonta* s.l., *Anemina* Naas, 1969 и *Cristariopsis* Moskvicheva, 1973 (Москвичева, 1973). Однако позже *Anemina* выделили в отдельный род (Затравкин, Богатов, 1987). Ряд зарубежных малакологов рассматривают и *Sinanodonta*, и *Anemina* в качестве подродов в составе рода *Anodonta* Lamarck, 1799 (Higo, Goto, 1993).

Основу описания новых видов и ревизий пресноводных двустворчатых моллюсков, включая представителей рода *Sinanodonta*, составляют конхологические признаки. Среди таких признаков в российской малакологической школе используют сравнение максимально выпуклых сечений раковин (кривые фронтального сечения створок). Такой метод называется компараторным (КМ) (Логвиненко, Старобогатов, 1971; Скарлато и др., 1990), а выделенные на основе данного признака виды в зарубежной литературе нередко называют компараторными (Graf, 2007). Согласно последней ревизии представителей рода *Sinanodonta*, проведенной с применением КМ

(Богатов, 2007), на территории российского Дальнего Востока обитают семь видов; состав рода с того времени не менялся (Старобогатов и др., 2004; Kantor *et al.*, 2010). Два вида синанодонт, *S. amurensis* Moskvicheva, 1973 из бассейна Амура (типовое местонахождение — протока Малые Чепчики в окрест. Хабаровска) и *S. primorjensis* Bogatov et Zatravkin, 1988 из водоемов Южного Приморья (типовое местонахождение — оз. Солдатское в районе Уссурийска, бассейн р. Раздольной), характеризуются одинаковыми конхологическими признаками, используемыми для идентификации видов, и в определителях различаются только по принадлежности к разным водным бассейнам (Старобогатов и др., 2004), а также разной кривизной фронтального сечения контуров раковин (Богатов, 2007). Кроме данных двух видов в состав рода *Sinanodonta* входят еще пять видов, встречающихся на территории российского Дальнего Востока: *S. schrencki* Moskvicheva, 1973 из бассейна Амура (возможно, исключая его верхнюю часть), *S. likharevi* Moskvicheva, 1973 из бассейнов Амура, Уссури и оз. Ханка, а также характерные для юга Приморского края виды *S. fukudai* Modell, 1947, *S. crassitesa* Moskvicheva, 1973 и *S. manchurica* Bogatov et Starobogatov, 1996 (Старобогатов и др., 2004).

В зарубежной литературе представителей рода *Sinanodonta*, в том числе компараторные виды *S. amurensis* и *S. primorjensis*, объединяют в один общий вид *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834, He,

**Таблица 1.** Последовательности ДНК моллюсков (*cox I*) из базы данных GenBank, используемые в работе (рис. 3)

Таксон	Страна	Номер в GenBank
<i>Sinanodonta woodiana</i>	Польша	KJ125078
То же	Венгрия	KJ125079
»	Италия	KF731775
»	Украина	JQ253893
»	»	JQ253894
»	Китай	KJ434483
»	»	KM272949
»	Япония	AB040832
»	»	AB055627
<i>Anodonta woodiana woodiana</i>	Польша	EF440349
То же	Южная Корея	GQ451867
»	То же	GQ451868
<i>Anemina arcaeformis</i>	»	GQ451869
То же	»	GQ451870
<i>Anodonta beringiana</i>	Канада	DQ272370

Примечание. Данные о собственных полученных последовательностях в таблицу не включены.

Zhuang, 2013) либо в эту же группу еще включают виды рода *Anemina*, рассматривая всех обсуждаемых беззубок как *Anodonta woodiana* (Graf, 2007). В последнем случае такое объединение аргументируют большой фенотипической изменчивостью моллюсков.

Проблему с таксономическим статусом синанодонт усугубляет широкая интродукция азиатских представителей вначале в европейские страны и далее по всему миру. Поэтому для неазиатских популяций принято использовать видовое название *S. woodiana* в широком смысле.

До настоящего времени все работы, касающиеся ревизии видового состава рода *Sinanodonta*, основывались исключительно на конхологических признаках раковин, однако изменчивость морфологических характеристик с помощью статистических методов не оценивалась. Исследования с применением генетических методов относятся в основном к интродуцированным в страны Европы представителям рода, молекулярно-генетический анализ обитающих на территории российского Дальнего Востока синанодонт не проводили.

Цель работы — установить изменчивость морфологических характеристик *S. amurensis* и *S. primorjensis* на основе анализа всех применяемых для видового определения раковин мерных признаков, а также возможных вариантов индексов; рассчитать дивергенцию этих таксонов по данным секвенирования последовательности ДНК участка первой субъединицы митохондриального гена

цитохромоксидаза (*cox I*) у образцов, собранных по возможности близко к типовому месту обитания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моллюски *S. amurensis* и *S. primorjensis* были взяты из коллекции лаборатории пресноводной гидробиологии БПИ ДВО РАН (Владивосток). Виды были определены на основе мерных признаков, используемых в определительных таблицах (Старобогатов и др., 2004), включая кривизну фронтального сечения створок (Богатов, 2007). После этого проводили сравнение и анализ последовательностей ДНК митохондриального гена *cox I* с привлечением нуклеотидных последовательностей гена *cox I* из базы данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) видов *Anodonta woodiana woodiana* и *Sinanodonta woodiana* из Китая, Южной Кореи, Японии и ряда европейских стран, *Anemina arcaeformis* Heude, 1877 из Южной Кореи и в качестве внешней группы *Anodonta beringiana* Middendorff, 1851 из Канады (табл. 1). Взяв за основу систему семейства по Старобогатову с соавт. (2004), *S. woodiana* и *A. w. woodiana* принимаем за один вид из рода *Sinanodonta*, а *A. beringiana* рассматриваем в составе рода *Beringiana* Starobogatov in Zatravkin, 1983.

Тотальную ДНК выделяли из фрагментов мантии и/или ноги семи моллюсков *S. amurensis*, собранных в бассейнах Амура (3 экз. из Хинганского заповедника) и оз. Ханки (3 экз. из озера у пос. Астраханка, у Восточного кордона и у Лузановой сопки, 1 экз. из р. Нестеровки), и двух мол-

люсков *S. primorjensis* из р. Раздольной. Анализировали только митотипы самок.

Применили стандартный метод экстракции фенолхлороформом (Skibinski *et al.*, 1994). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) участка митохондриального гена *cox1* проводили с использованием стандартных праймеров (Folmer *et al.*, 1994) LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') и HCO2198 (5'-TAACACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'). ПЦР проводили по следующему протоколу (Soroka, 2010): 2 мин первоначальной денатурации при 95°C, далее 30 с – 95°C, 1 мин – 45°C, 1.5 мин – 72°C (5 циклов), 30 с – 95°C, 45 с – 55°C, 1 мин – 72°C (28 циклов), окончательная достройка цепей – 7 мин при 72°C. Итоговый объем реакционной смеси каждой ПЦР составил 10 мкл. Концентрацию и размер продуктов, полученных в процессе амплификации (длина фрагментов ~710 пар нуклеотидов (п. н.)), оценивали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Анализ и сохранение данных электрофореза осуществляли с помощью Vision Works®LS Analysis Software (UVP, Великобритания).

Очистку продуктов ПЦР осуществляли с помощью колонок Clean-up (A&A Biotechnology, Польша), а циклическое секвенирование продуктов амплификации проводили в компании “Macrogen” (Южная Корея, <http://dna.macrogen.com/eng/>). Обе нити ДНК были собраны в консенсусную последовательность с помощью программы DNAMAN 5.2.9 (Lynnon Corp., Канада). Размер полученных последовательностей составлял 630–693, а средняя длина – 670 п. н.

Выравнивание последовательностей гена *cox1* осуществляли с помощью алгоритма ClustalW, являющегося частью пакета программ MEGA ver. 4 (Tamura *et al.*, 2007). Пакет программ MEGA ver. 4 также использовали для построения филогенетического дерева методом присоединения ближайшего соседа. Генетические дистанции между изученными последовательностями и образцами оценивали с применением двухпараметрической модели Кимуры (K2P distance, *K*) (Kimura, 1980), где дистанция выражается как число замен на сайт. Доля (%) бутстрепных деревьев, в которых родственные таксоны кластеризовались вместе, показана рядом с ветвями дерева (используя 2000 реплик бутстрепа). Бутстрепные значения ниже 50 не показаны.

В базу данных GenBank были депонированы гаплотипы гена *cox1* образцов изученных видов, их номера доступа: KU853266, KU853267, KU853268, KU853269.

Для оценки изменчивости раковин взрослых моллюсков были сделаны промеры 64-х моллюсков из трех водных бассейнов российского Дальнего Востока (рис. 1): 13 раковин *S. amurensis* из

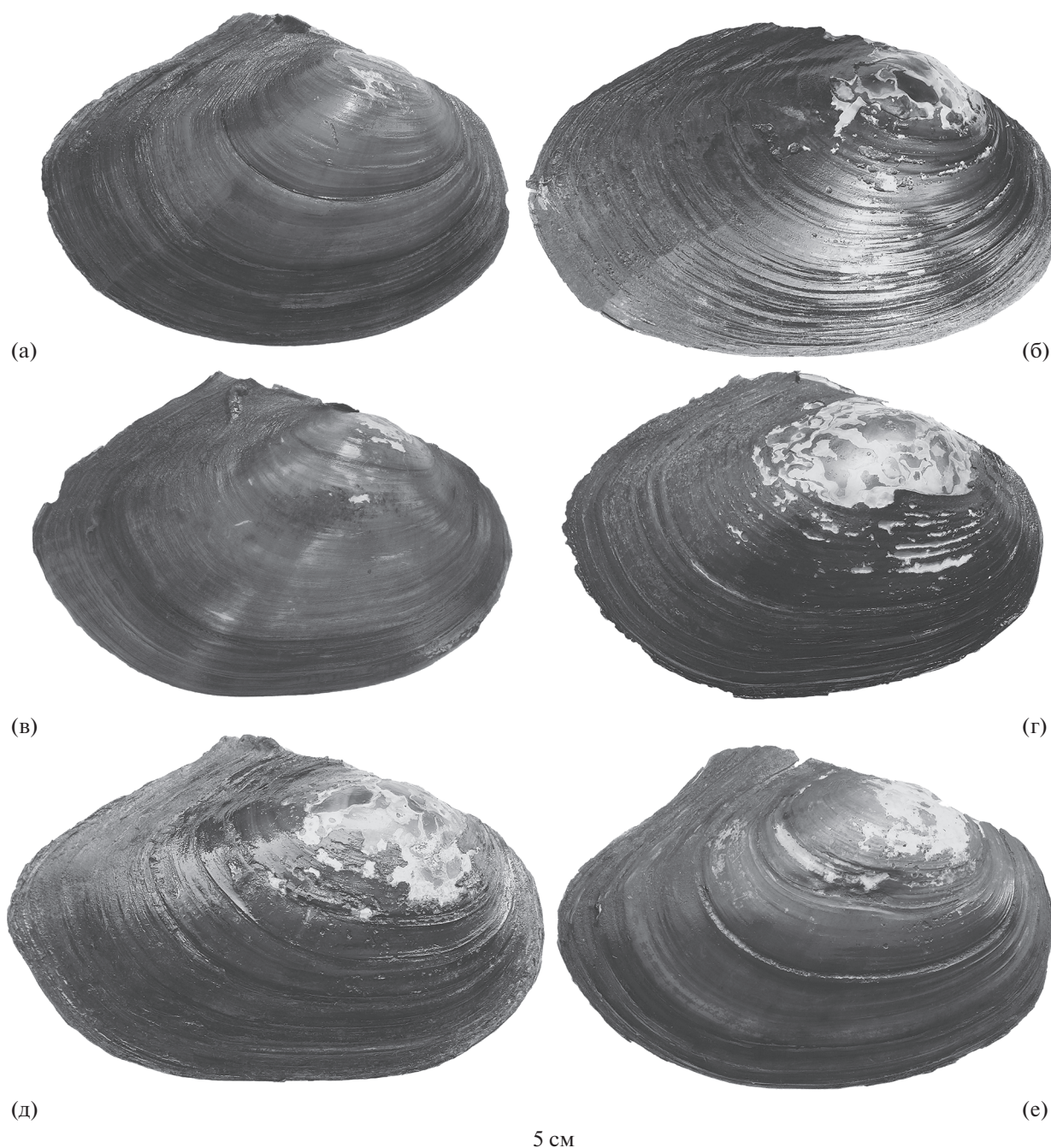
бассейна оз. Ханка (из них 1 экз. из оз. Ханка у кордона Восточный и 4 экз. у пос. Астраханка, 8 экз. из нижнего течения р. Мельгуновки), 34 раковины *S. amurensis* из бассейна Амура (9 экз. из р. Сита у пос. Князе-Волконское, 25 экз. из р. Архара в Хинганском заповеднике), 14 раковин *S. primorjensis* из бассейна р. Раздольной (5 экз. из р. Раздольной, 6 экз. из р. Кипарисовки, 2 экз. из р. Раковки, 1 экз. из р. Славянки).

Были измерены следующие основные признаки раковин (рис. 2): длина (*L*), высота ( $H_{\max}$  – максимальная высота раковины,  $H_u$  – высота у макушки) и выпуклость раковины (*B*). При отсутствии одной из створок использовалось двойное значение выпуклости имеющейся створки. Для оценки степени вздутости максимально выпуклого сечения раковины *Sinanodonta* были введены три дополнительные мерные характеристики (Москвичева, 1973; Богатов, 2007; Старобогатов и др., 2004):  $L_{a-u}$  – расстояние от переднего края створки до макушки, измеряемое параллельно брюшному краю створки;  $H_{m-cs}$  – расстояние от макушки по линии максимально выпуклого сечения (так называемая косая высота);  $L_{u-mc}$  – расстояние между макушкой и максимально выступающей точкой на боковой поверхности створки, т.е. наиболее удаленной от комиссуральной плоскости створки. Чтобы оценить скорость роста раковины, был введен еще один признак (Богатов, 2007) –  $L_{u-n}$  (расстояние от макушки до конца нимфы, измеренное параллельно брюшному краю створки). Кроме указанных 8 мерных признаков в статистическом анализе использовали 14 индексов, основная часть которых была взята из определительных таблиц (Жадин, 1952; Москвичева, 1973; Старобогатов, 1977; Затравкин, Богатов, 1987; Старобогатов и др., 2004; Богатов, 2007).

Различия по морфологическим признакам между популяциями оценивали с помощью дисперсионного анализа ANOVA, а также канонического и дискриминантного анализов. Для расчетов использовали пакет программ STATISTICA ver. 8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Молекулярные исследования.** Анализ девяти последовательностей гена *cox1* со средней длиной 670 п. н. у видов *S. amurensis* и *S. primorjensis* показал присутствие двух почти идентичных гаплотипов с небольшим различием, составившим 0.1% между полученными гаплотипами. Различие касалось одного полиморфного сайта (A/G) с замещением в третьей позиции кодона (GGA или GGG), не изменяющим кодируемую аминокислоту глицин. Все три образца *S. amurensis* из бассейна Амура обладали одинаковыми митохон-

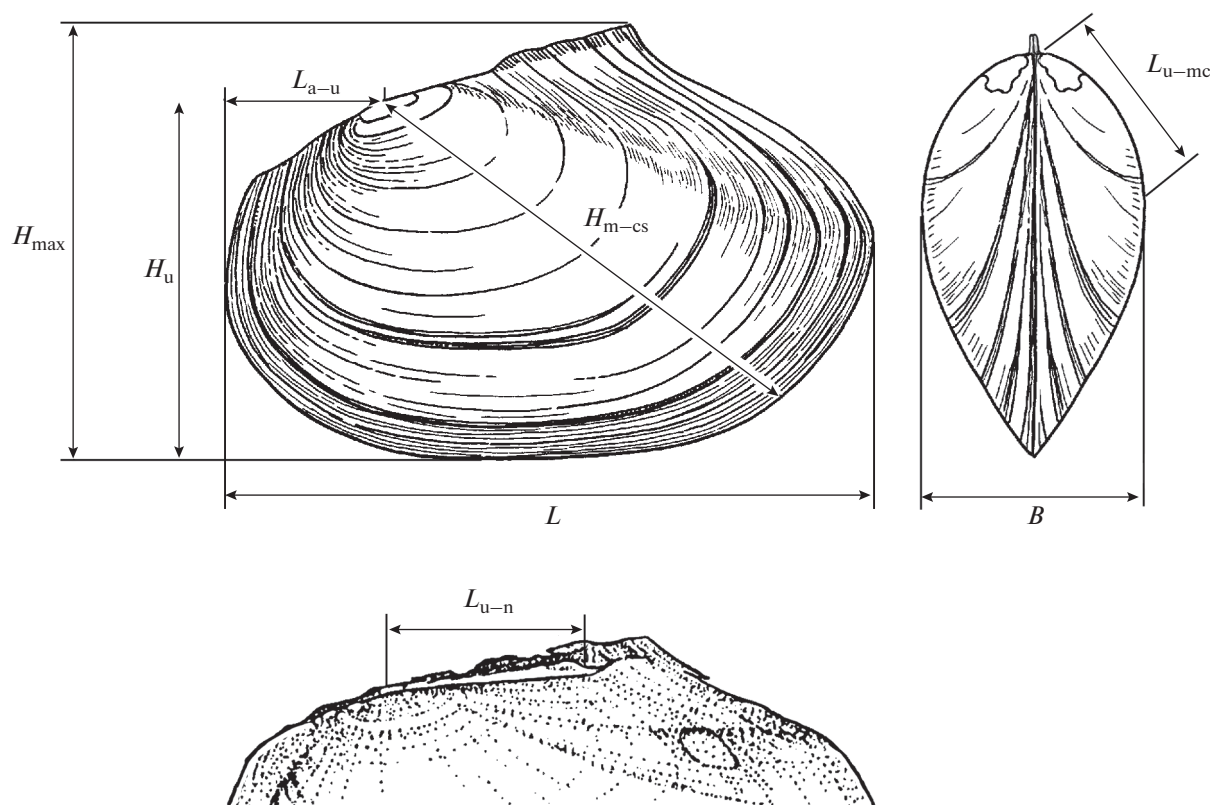


**Рис. 1.** Раковины *Sinanodonta*: *S. amurensis* из оз. Ханка у с. Астраханка (а) и у кордона Восточный (б), из р. Мельгуновка, бассейна оз. Ханка (в), из р. Архара в Хинганском природном заповеднике, бассейна Амура (г); *S. primorjensis* из рек Кипарисовка (д) и Славянка (е), бассейна р. Раздольной.

дринальными гаплотипами с кодоном GGA, в то время как у четырех образцов из бассейна оз. Ханка были отмечены оба гаплотипа (с кодонами GGA либо GGG), с преобладанием кодона GGG. Последовательность гена *cox1* двух образцов *S. primorjensis* из р. Раздольной была с кодоном GGG.

Сравнение полученных гаплотипов участка гена *cox1* с данными из GenBank показало 99% сходства с *S. woodiana* из Южной Кореи (GQ 451867, GQ451868), но только 92% сходства с *S. woodiana* из Китая (KJ 434483) и Европы (KJ 125079, KF 731775, EF 440349). По данным секвенирования гена *cox1* филогенетические связи между исследуемыми





**Рис. 2.** Схема промеров раковины.  $L$  — длина раковины,  $H_{\max}$  — максимальная высота раковины,  $H_u$  — высота раковины у макушки,  $B$  — выпуклость раковины,  $L_{a-u}$  — расстояние от переднего края створки до макушки,  $L_{u-n}$  — расстояние от макушки до конца нимфы,  $L_{u-mc}$  — расстояние между макушкой и максимально выступающей точкой на боковой поверхности створки,  $H_{m-cs}$  — расстояние от макушки по линии максимально выпуклого сечения (косая высота).

дованными нами видами, азиатскими и европейскими *Sinanodonta* (= *Anodonta*) *woodiana* (которые мы рассматриваем как синонимы) и другими видами из GenBank представлены на рис. 3. На основе внутри- и межвидовых дистанций выделяются три основные клады, соответствующие трем разным видам (табл. 2). Все шесть последовательностей гена *cox1* азиатских моллюсков, определенных как *Sinanodonta* (= *Anodonta*) *woodiana*, демонстрируют существенную генетическую гетерогенность (>6%) в каждой из клад, показывая, что они не могут принадлежать к одному виду (рис. 3). Пред-

ставленные в табл. 2 данные свидетельствуют о наличии трех отдельных видов (*S. woodiana*, *S. amurensis* и *A. arcaeformis*), т.е. опять возникает вопрос о существовании проблемы таксономической идентификации азиатских моллюсков из рода *Sinanodonta*.

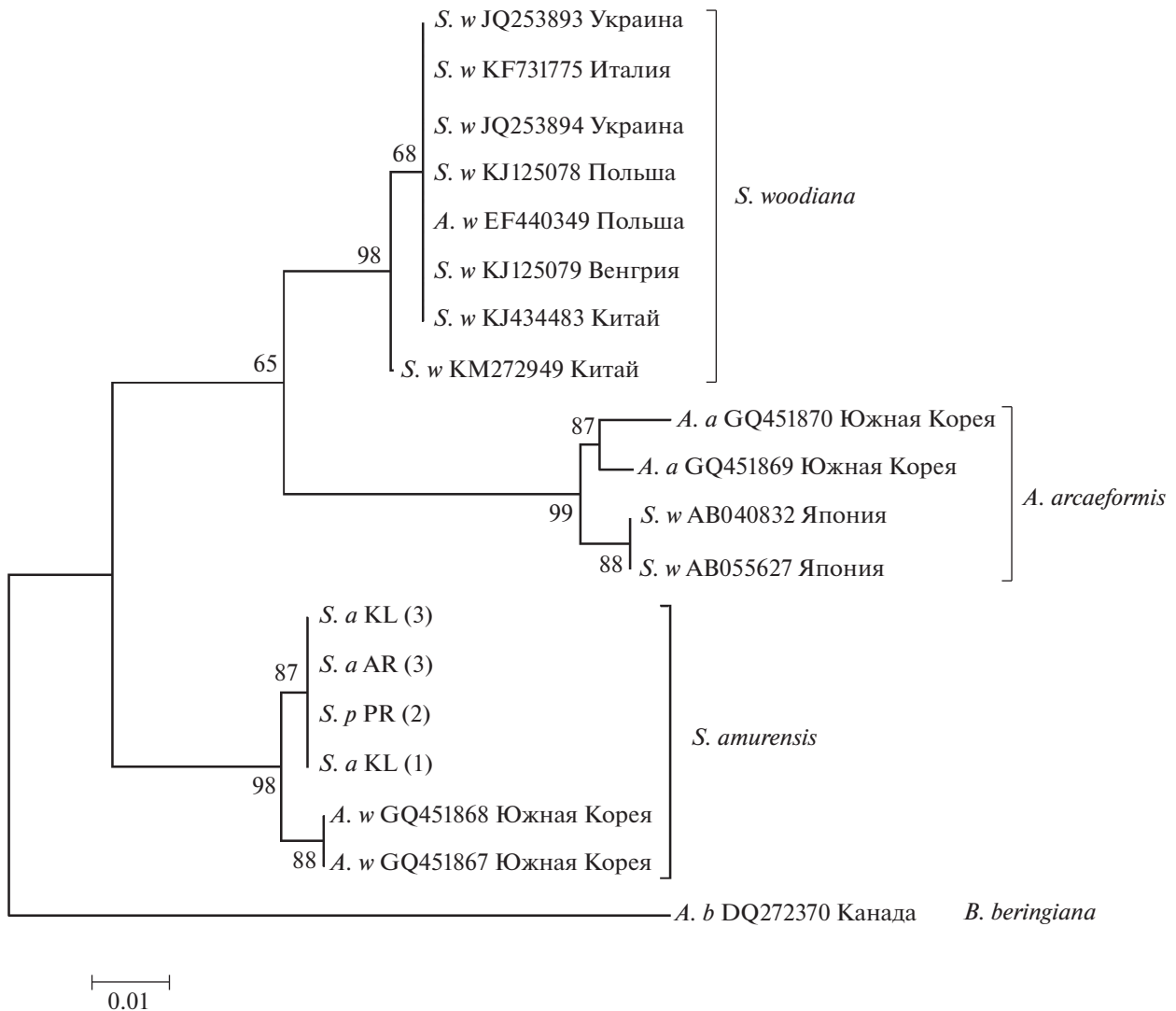
**Морфометрические признаки раковин.** Результаты анализа морфометрических признаков раковин с помощью ANOVA показали, что данные признаки обоих обсуждаемых видов статистически значимо однородны для исследуемых водных бассейнов (табл. 3), т.е. с помощью морфометри-

**Таблица 2.** Средние значения параметра K2P между и внутри видов для гена *cox1*

	<i>S. woodiana</i>	<i>S. amurensis</i>	<i>A. arcaeformis</i>
<i>Sinanodonta woodiana</i> (8)	0.001*		
<i>Sinanodonta amurensis</i> (11)	0.062	0.005*	
<i>Anemina arcaeformis</i> (4)	0.064	0.12	0.013*

Примечание. В скобках после видовых названий указаны числа последовательностей, формирующих каждую из трех основных клад на рис. 3.

\* Внутри видов.



**Рис. 3.** Филогенетическое древо, построенное методом присоединения ближайшего соседа, реконструированное на основе последовательностей гена *cox I*. Числа над линиями – уровень статистической поддержки, в скобках – числа анализируемых последовательностей. *A.w* – *Sinanodonta* (= *Anodonta*) *woodiana*, *S.w* – *Sinanodonta woodiana*, *S.a* – *Sinanodonta amurensis*, *S.p* – *Sinanodonta primoriensis*, *A.a* – *Anemina arcaeformis*; KL, AR, RR – бассейны оз. Ханка, рек Амура и Раздольной. Вид *Beringiana* (= *Anodonta*) *beringiana* (*A.b*) используется как внешняя группа.

ческих признаков невозможно определить из какого водного бассейна был собран тот или иной моллюск. В то же время у большинства индексов отмечена большая вариабельность (табл. 4), что свидетельствует о существующей географической изменчивости среди моллюсков из разных сравниваемых водных бассейнов. Канонический анализ на основе индексов показал, что 82% изменчивости между выборками из трех разных водных бассейнов представлены на первой канонической переменной (табл. 5). Наибольший вклад в первую каноническую переменную вносят индексы, основанные на измерении  $L_{a-u}$ , тогда как индексы, основанные на измерениях  $H_{max}$  и  $L_{u-mc}$ , вносят наибольший вклад во вторую каноническую переменную (табл. 5). Каждая выборка об-

разует отдельную группу в пространстве координат и имеет изолированное положение, соответствующее географическому положению водного бассейна (рис. 4). Дискриминантный анализ на основе выбранного набора индексов выявил достаточно четкие различия между выборками из рассматриваемых водных бассейнов. Суммарная точность классификации, т.е. вероятность отнесения того или иного экземпляра в свою выборку, составила 89.7%.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Методика описания новых видов двустворчатых моллюсков с помощью КМ, когда сравниваются кривые фронтального сечения створок ра-

**Таблица 3.** Значения морфометрических признаков раковин двух обсуждаемых видов *Sinanodonta* и результаты дисперсионного анализа (ANOVA)

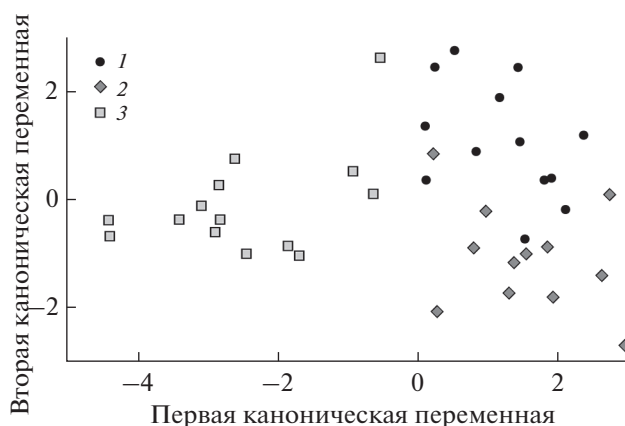
Признак	Бассейны			ANOVA	
	оз. Ханка ( <i>N</i> = 13)	Амура ( <i>N</i> = 34)	р. Раздольной ( <i>N</i> = 14)	<i>F</i> , <i>df</i> = 2	<i>p</i>
<i>L</i>	6.6–17 11.79 ± 0.92	6.7–18.2 11.58 ± 0.75	8.2–15.1 11.48 ± 0.57	0.043	0.958
<i>H</i> <sub>max</sub>	5–11 8.25 ± 0.55	5.5–11.8 8.43 ± 0.47	6–9.4 7.73 ± 0.34	0.588	0.561
<i>H</i> <sub>u</sub>	4–9.8 6.85 ± 0.5	4.4–9.4 6.6 ± 0.35	4.7–8.2 6.51 ± 0.3	0.201	0.819
<i>B</i>	2.5–6 4.29 ± 0.33	2.7–6.6 4.31 ± 0.26	2.8–5.5 4.14 ± 0.23	0.108	0.898
<i>L</i> <sub>a–u</sub>	1.8–4.5 3.05 ± 0.22	1.6–3.6 2.58 ± 0.14	1.7–4.2 3.07 ± 0.2	2.218	0.124
<i>L</i> <sub>u–n</sub>	2.1–6.5 3.95 ± 0.38	3–6.2 4.02 ± 0.24	3–5.2 3.92 ± 0.18	0.032	0.969
<i>L</i> <sub>u–mc</sub>	2–5.8 4.02 ± 0.29	2.3–5 3.49 ± 0.19	2.4–4.9 3.34 ± 0.21	2.305	0.114
<i>H</i> <sub>m–cs</sub>	5–13.2 8.68 ± 0.65	5.6–15 9.01 ± 0.62	6.5–10.8 8.42 ± 0.35	0.277	0.759

Примечание. *L* — длина раковины, *H*<sub>max</sub> — максимальная высота раковины, *H*<sub>u</sub> — высота раковины у макушки, *B* — выпуклость раковины, *L*<sub>a–u</sub> — расстояние от переднего края створки до макушки, *L*<sub>u–n</sub> — расстояние от макушки до конца нимфы, *L*<sub>u–mc</sub> — расстояние между макушкой и максимально выступающей точкой на боковой поверхности створки, *H*<sub>m–cs</sub> — расстояние от макушки по линии максимально выпуклого сечения (косая высота). Над чертой — min–max каждого признака, под чертой — среднее ± ошибка среднего, *N* — число использованных в анализе раковин; для табл. 3, 4.

ковин (Логвиненко, Старобогатов, 1971), постоянно критикуется (Graf, 2007; Болотов и др., 2013; Ворошилова, 2013). Богатов (2007), проводя ревизию *Sinanodonta* на основе КМ, подчеркивал, что неверно прорисованный контур створки приводит к неверному видовому определению либо к неоправданному описанию нового вида. Все малакологи, независимо от того используют ли они КМ или критикуют его, согласны, что для проведения таксономической ревизии необходимо использовать комплекс различных методов. Среди таких методов часто называют сведения о макушечной скульптуре раковин и данные о морфологии личиночных раковин (глохидиев), однако для анодонтин эти признаки малоинформативны, так как не работают на межвидовом уровне.

Все представители рода *Sinanodonta* характеризуются макушечной скульптурой, состоящей из выгнутых валиков, не доходящих до килевого перегиба, в отличие, например, от беззубок *Anemina*, у которых выгнутые валики макушечной скульптуры заканчиваются на килевом перегибе (Богатов, Саенко, 2002) (рис. 5). Исследования морфологии личиночных раковин *Sinanodonta*

показали, что зрелые глохидии *S. woodiana* из Японии и Польши схожи между собой, но при этом отличаются по ряду признаков от глохидиев *S. amurensis* из р. Раздольной и *S. likharevi* из бас-

**Рис. 4.** Распределение изученных экземпляров *Sinanodonta amurensis* и *S. primorjensis* из бассейнов оз. Ханка (1), рек Амура (2) и Раздольной (3) в пространстве двух канонических переменных.

**Таблица 4.** Значения индексов морфометрических признаков раковин двух обсуждаемых видов *Sinanodonta* и результаты дисперсионного анализа (ANOVA)

Индекс	Бассейны			ANOVA	
	оз. Ханка ( <i>N</i> = 13)	Амура ( <i>N</i> = 34)	р. Раздольной ( <i>N</i> = 14)	<i>F</i> , <i>df</i> = 2	<i>p</i>
$L_{u-n}/H_{max}$	$\frac{0.372-0.591}{0.47 \pm 0.018}$	$\frac{0.39-0.557}{0.466 \pm 0.013}$	$\frac{0.407-0.567}{0.51 \pm 0.013}$	2.611	0.087
$L_{u-mc}/H_{max}$	$\frac{0.364-0.574}{0.487 \pm 0.014}$	$\frac{0.316-0.556}{0.476 \pm 0.016}$	$\frac{0.346-0.538}{0.431 \pm 0.014}$	3.831	0.031*
$H_{max}/H_{m-cs}$	$\frac{0.833-1.019}{0.959 \pm 0.014}$	$\frac{0.779-0.952}{0.89 \pm 0.014}$	$\frac{0.847-0.976}{0.917 \pm 0.012}$	6.936	0.003*
$B/H_{m-cs}$	$\frac{0.438-0.566}{0.495 \pm 0.01}$	$\frac{0.440-0.578}{0.502 \pm 0.011}$	$\frac{0.431-0.543}{0.489 \pm 0.01}$	0.427	0.656
$L_{u-mc}/B$	$\frac{0.733-1.143}{0.947 \pm 0.033}$	$\frac{0.625-1.06}{0.859 \pm 0.031}$	$\frac{0.636-0.964}{0.810 \pm 0.028}$	4.757	0.015*
$H_{max}/L$	$\frac{0.644-0.771}{0.708 \pm 0.011}$	$\frac{0.648-0.821}{0.734 \pm 0.012}$	$\frac{0.623-0.74}{0.676 \pm 0.011}$	6.321	0.004*
$H_u/L$	$\frac{0.552-0.614}{0.585 \pm 0.006}$	$\frac{0.512-0.657}{0.577 \pm 0.011}$	$\frac{0.527-0.618}{0.569 \pm 0.009}$	0.724	0.492
$H_{max}/H_u$	$\frac{1.122-1.3}{1.211 \pm 0.015}$	$\frac{1.188-1.402}{1.275 \pm 0.018}$	$\frac{1.109-1.286}{1.189 \pm 0.018}$	6.811	0.003*
$B/L$	$\frac{0.34-0.4}{0.365 \pm 0.005}$	$\frac{0.333-0.417}{0.374 \pm 0.006}$	$\frac{0.341-0.415}{0.36 \pm 0.006}$	1.791	0.181
$B/H_{max}$	$\frac{0.467-0.583}{0.517 \pm 0.01}$	$\frac{0.417-0.571}{0.512 \pm 0.011}$	$\frac{0.467-0.585}{0.533 \pm 0.009}$	1.206	0.311
$B/H_u$	$\frac{0.565-0.667}{0.625 \pm 0.009}$	$\frac{0.585-0.754}{0.651 \pm 0.014}$	$\frac{0.564-0.671}{0.633 \pm 0.01}$	1.423	0.254
$L_{a-u}/L$	$\frac{0.225-0.311}{0.261 \pm 0.007}$	$\frac{0.189-0.29}{0.225 \pm 0.007}$	$\frac{0.207-0.308}{0.265 \pm 0.008}$	9.917	<0.0005*
$L_{a-u}/H_{max}$	$\frac{0.326-0.427}{0.37 \pm 0.01}$	$\frac{0.264-0.377}{0.307 \pm 0.008}$	$\frac{0.283-0.481}{0.394 \pm 0.015}$	17.052	<0.0001*
$L_{a-u}/H_u$	$\frac{0.39-0.535}{0.447 \pm 0.011}$	$\frac{0.333-0.468}{0.390 \pm 0.009}$	$\frac{0.362-0.536}{0.467 \pm 0.014}$	12.369	<0.0001*

\* Статистически значимые различия между выборками.

сейна оз. Ханка (Саенко, Сорока, 2013; Саенко, 2014).

В настоящее время для решения таксономических и филогенетических проблем на внутри- и межвидовом уровнях широко применяются параметры генетической изменчивости гена *coxI* митохондриальной ДНК (Falniowski, Wilke, 2001; Källersjö *et al.*, 2005; Razowski *et al.*, 2013; Pieńkowska *et al.*, 2015). Участок гена *coxI* длиной 648 п. н.

хорошо изучен с помощью молекулярного маркера, способного разделить даже близкородственные виды, и в настоящее время используется как универсальный ДНК-баркод (Hebert *et al.*, 2003a, b) и успешно применяется для видового определения как позвоночных животных, например рыб (Ward *et al.*, 2005) и птиц (Hebert *et al.*, 2004a), так и беспозвоночных, например бабочек (Hebert *et al.*, 2004b; Razowski *et al.*, 2013) и брюхоногих мол-



люсков (Soroka *et al.*, 2009; Pieńkowska *et al.*, 2015). Возможность получить достоверные различия с помощью последовательностей гена *cox1* показана для >95% протестированных видов из различных групп животных (Hebert *et al.*, 2003a, 2004a; Ward *et al.*, 2005).

Интересна работа японских специалистов, которые провели анализ десяти белковых локусов у моллюсков *A. woodiana* из нескольких речных бассейнов Японии и показали наличие двух отдельных видов, различающихся по пяти локусам (Tabe *et al.*, 1994).

Изменчивость между различными последовательностями проанализированных митохондриальных генов у видов *S. amurensis* и *S. primorjensis* составила 0.5% (табл. 2), что характерно для внутривидовой изменчивости гена *cox1* у животных, в том числе пресноводных двустворчатых моллюсков (Hebert *et al.*, 2003a, b; Hebert *et al.*, 2004a, b). Так, изменчивость данного гена у пресноводного двустворчатого моллюска *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 не превысила 1.1% (Therriault *et al.*, 2004). Межвидовая изменчивость гаплотипов гена *cox1* для моллюсков сем. Unionidae составляет 11–16% (Källersjö *et al.*, 2005), в том числе для унионид Польши 11–17% (Soroka, 2010). Схожее значение межвидовой изменчивости гена *cox1* отмечено для представителей австралийского рода *Hyridella* Swainson, 1840 из сем. Hyriidae Swainson, 1840 (14%), такое же среднее значение различий отмечено для унионид из триб Pleurobemini Hannibal, 1912 и Lampsilini von Ihering, 1901 (Graf, Ó Foighil, 2000).

Генетические дистанции K2P между видами *S. amurensis* и *S. woodiana* для гена *cox1* составили 6–7%. Для близких видов *Stagnicola palustris* (O.F. Müller, 1774) и *S. turricula* (Held, 1836) отмечены более низкие значения межвидовой изменчивости (от 2.2 до 3.3%), предполагающие их недавнюю дивергенцию (Pieńkowska *et al.*, 2015).

Дискриминантный анализ применяется в том случае, когда группы известны априори. В нашем случае это двустворчатые моллюски, принадлежащие к трем разным водным бассейнам. Нашей задачей было установить, какие из признаков (исходные измерения или индексы) наиболее эффективны при определении принадлежности того или иного экземпляра моллюска к водному бассейну. Канонический дискриминантный анализ используется для разделения (“дискриминации”) раковин между анализируемыми видами. В обоих случаях, и при определении признаков для разделения раковин между водными бассейнами, и при разделии между обоими видами, объем выборки был достаточным и репрезентативным.

Недавно было показано, что толщина раковины — наиболее определяющий признак по сравнению с другими параметрами для выделения ви-

**Таблица 5.** Факторная структура изменчивости индексов мерных признаков при каноническом анализе двух обсуждаемых видов рода *Sinanodonta*

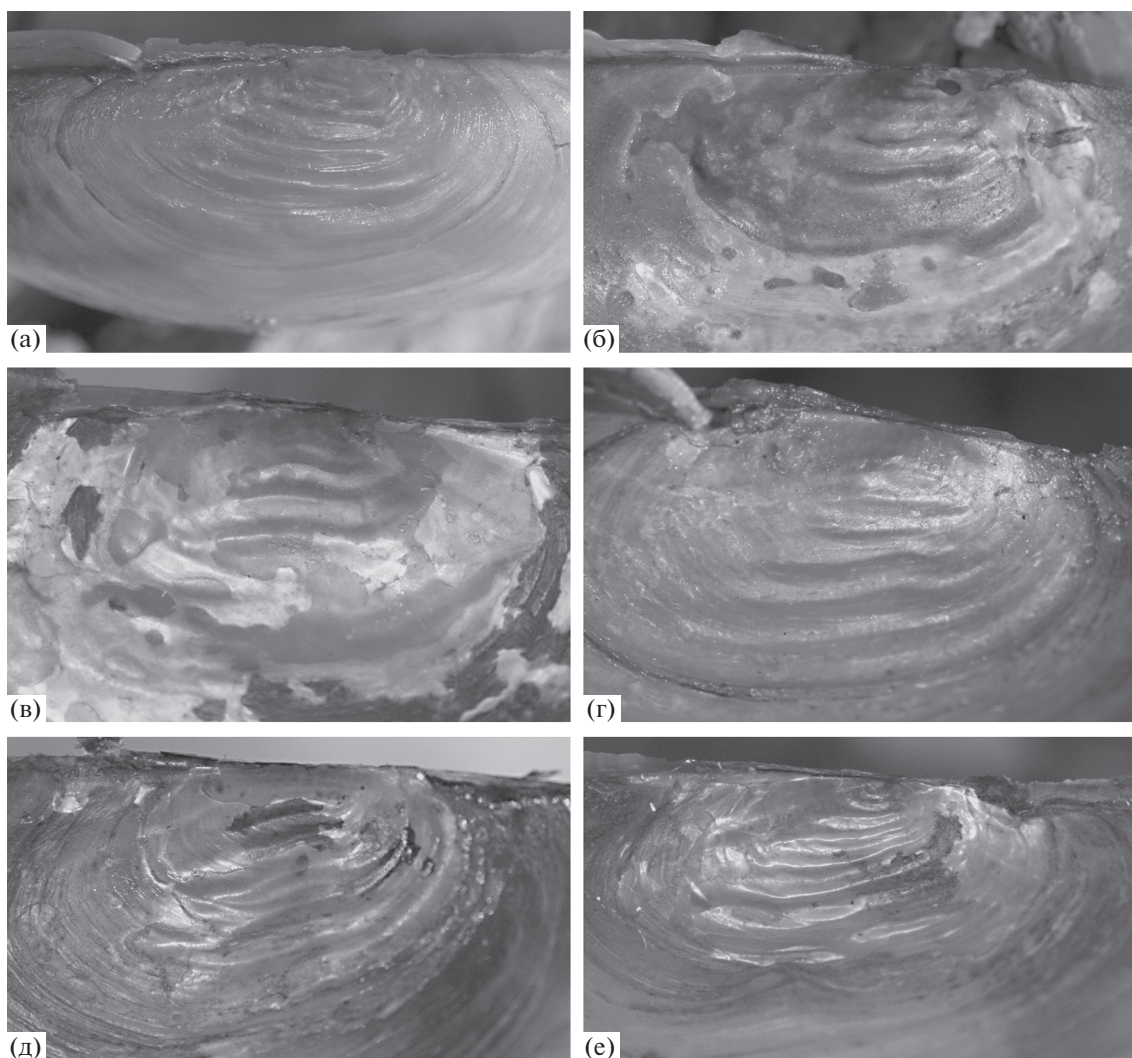
Индекс	Канонические переменные	
	1-я	2-я
$L_{u-n}/H_{max}$	0.123	–0.33*
$L_{u-mc}/H_{max}$	–0.093	0.469*
$H_{max}/H_{m-cs}$	0.247	0.441*
$B/H_{m-cs}$	–0.073	0.068
$L_{u-mc}/B$	0.03	0.563*
$H_{max}/L$	–0.271	0.313*
$H_u/L$	–0.008	0.221
$H_{max}/H_u$	–0.316	0.112
$B/L$	–0.157	0.1
$B/H_{max}$	0.102	–0.187
$B/H_u$	–0.137	–0.111
$L_{a-u}/L$	0.386*	–0.011
$L_{a-u}/H_{max}$	0.497*	–0.205
$L_{a-u}/H_u$	0.425*	–0.154
Доля объяснимой факторной дисперсии, %	81.8	18.2

Примечание. Вклады признаков в канонические переменные даны в виде объединенных внутригрупповых коэффициентов корреляций.

\*Наиболее высокие коэффициенты.

дов *Sinanodonta* (Саенко и др., 2014). КМ основан на разнице в выпуклости раковины. Как было отмечено раньше, виды *S. amurensis* и *S. primorjensis* по выпуклости раковин не различаются между собой, а их кривые фронтального сечения створок совпадают. Следовательно, ни один из конхологических признаков (ни индексы, ни кривые фронтального сечения) не может быть использован для того, чтобы разделить раковины между обоими видами. Мы полагаем, что данные о митохондриальной ДНК даже двух экземпляров *S. primorjensis* дают достоверные сведения, которые также подкреплены результатами анализа конхологических признаков.

Полученные последовательности ДНК митохондриального гена *cox1* и морфологическое сходство раковин позволяют сделать вывод о принадлежности проанализированных экземпляров *S. amurensis* и *S. primorjensis* к одному виду. Выявленные морфологические различия отно-



**Рис. 5.** Макушечная скульптура раковин (правые створки). а — *Anemina shadini* (Южное Приморье, озеро у пос. Хороль); б — *Anemina buldowskii* (р. Нестеровка, бассейн оз. Ханка); в — *Sinanodonta primorjensis* (р. Раздольная); г — *S. amurensis* (оз. Ханка у пос. Астраханка); д, е — *S. amurensis* (р. Сита, бассейн Амура).

сятся только к параметрам, связанным с длиной (первая переменная) и выпуклостью раковин (вторая переменная) (рис. 4, табл. 5). С учетом почти идентичного генетического профиля обнаруженная изменчивость может быть объяснена только проявлением внутривидовой географической изменчивости.

Таким образом, на основе комплекса признаков заключаем, что вид *S. primorjensis* Bogatov et Zatravkin, 1988 — младший синоним вида *S. amurensis* Moskvicheva, 1973.

Авторы благодарны И.В. Балан (Хинганский заповедник, Амурская обл.) за помощь в сборах моллюсков.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ДВО РАН (грант № 15-I-6-069; руководитель гранта В.В. Богатов).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богатов В.В. Беззубки рода *Sinanodonta* (Bivalvia, Anodontinae) бассейна Амура и Приморья // Зоол. журн. 2007. Т. 86. № 2. С. 147–153.
- Богатов В.В., Саенко Е.М. История изучения Anodontinae и Pseudanodontinae российского Дальнего Востока // Бюл. ДВМО. 2002. Вып. 6. С. 102–114.
- Болотов И.Н., Махров А.А., Беспалая Ю.В., Вихрев И.В., Аксенова О.В., Аспхольм П.Э., Гофаров М.Ю., Островский А.Н., Попов И.Ю., Пальцер И.С., Рудзитис М., Рудзитис М., Ворошилова И.С., Соколова С.Е. Итоги тестирования компараторного метода: кривизна фронтального сечения створки раковины не может служить систематическим признаком у пресноводных жемчужниц рода *Margaritifera* // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 2. С. 245–256.
- Ворошилова И.С. Видоспецифичны ли контуры фронтального сечения створок раковин у двустворчатых моллюсков? // Зоол. журн. 2014. Т. 93. № 1. С. 102–114.

- тых моллюсков? // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 3. С. 324–331.
- Жадин В.И. Моллюски пресных и солоноватых вод СССР. Определители по фауне СССР, издаваемые Зоол. ин-том АН СССР. Т. 46. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1952. 376 с.
- Затравкин М.Н., Богатов В.В. Крупные двустворчатые моллюски пресных вод Дальнего Востока СССР. Владивосток: Изд-во ДВО АН СССР, 1987. 153 с.
- Логвиненко Б.М., Старобогатов Я.И. Кривизна фронтального сечения створки как систематический признак у двустворчатых моллюсков // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки. 1971. № 5. С. 7–10.
- Москвичева И.М. Моллюски подсемейства Anodontinae (Bivalvia, Unionidae) бассейна Амура и Приморья // Зоол. журн. 1973. Т. 52. № 6. С. 822–834.
- Саенко Е.М. Данные о микроскульптуре личиночных раковин беззубок (Bivalvia: Unionidae: Anodontinae) // Чтения памяти проф. В.Я. Леванидова. Вып. 6. Владивосток: Дальнаука, 2014. С. 585–593.
- Саенко Е.М., Сорока М. Морфология глохидиев беззубок *Sinanodonta woodiana* (Bivalvia, Unionidae) Польши // Бюл. ДВМО. 2013. Вып. 17. С. 214–223.
- Саенко Е.М., Холин С.К., Балан И.В. Оценка морфологической изменчивости раковин *Sinanodonta* (Bivalvia, Unionidae, Anodontinae) // Чтения памяти проф. В.Я. Леванидова. Вып. 6. Владивосток: Дальнаука, 2014. С. 594–599.
- Скарлато О.А., Старобогатов Я.И., Антонов Н.И. Морфология раковины и микроанатомия // Методы изучения двустворчатых моллюсков: Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л.: Наука, 1990. Т. 219. С. 4–31.
- Старобогатов Я.И. Класс двустворчатые моллюски Bivalvia // Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР (планктон и бентос). Л.: Гидрометеиздат, 1977. С. 123–151.
- Старобогатов Я.И., Прозорова Л.А., Богатов В.В., Саенко Е.М. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Т. 6. Моллюски, полихеты, немертины / Под ред. Богатова В.В., Цалолихина С.Я. СПб.: Наука, 2004. С. 9–491.
- Falniowski A., Wilke T. The genus *Marstoniopsis* (Gastropoda: Rissooidea): intra- and intergeneric phylogenetic relationships // J. Mollus. Stud. 2001. V. 67. P. 483–488.
- 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 // Mol. Mar. Biol. Biotech. 1994. V. 3. P. 294–299.
- Graf D.L. Palearctic freshwater mussel (Mollusca: Bivalvia: Unionoidea) diversity and the Comparative Method as a species concept // Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. 2007. V. 156. P. 71–88.
- Graf D.L., Ó Foighil D. Molecular phylogenetic analysis of 28S rDNA supports a gondwanan origin for australasian Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionoidea) // Vie Milieu. 2000. V. 50. P. 245–254.
- He J., Zhuang Z. The freshwater bivalves of China. Harxheim: ConchBooks, 2013. 198 p.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // Proc. R. Soc. B – Biol. Sci. 2003a. V. 270 (Suppl. 1). P. 596–599.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. R. Soc. B – Biol. Sci. 2003b. V. 270. № 1512. P. 313–321.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M. Identification of birds through DNA barcodes // PLoS Biol. 2004a. V. 2. P. 1657–1663.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *As-traptes fulgerator* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004b. V. 101. № 41. P. 14812–14817.
- Higo S., Goto Y. A systematic list of molluscan shells from the Japanese Is. and the adjacent areas. Osaka: Kairu shuppansha, 1993. 148 p.
- Källersjö M., von Proschwitz T., Lundberg S., Eldenäs P., Erséus Ch. Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies in freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe // Zool. Scr. 2005. V. 34. № 4. P. 415–424.
- Kantor Yu.I., Vinarski M.V., Shileyko A.A., Sysoev A.V. Catalogue of the continental mollusks of Russia and adjacent territories. Ver. 2.3.1. 2010. 330 p.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. P. 111–120.
- Pieńkowska J.R., Rybska E., Banasiak J., Wesolowska M., Lesicki A. Taxonomic status of *Stagnicola palustris* (O. F. Müller, 1774) and *S. turricula* (Held, 1836) (Gastropoda: Pulmonata: Lymnaeidae) in view of new molecular and chorological data // Folia Malacol. 2015. V. 23. P. 3–18.
- Razowski J., Tracz S., Wojtusik J., Pelz V. Reassessment of the systematic position of *Orthocomotis* Dognin (Lepidoptera: Tortricidae) based on molecular data with description of new species of Eulini // Folia Biol. – Krakow. 2013. V. 61. № 1–2. P. 125–134.
- Skibinski D.O.F., Gallagher C., Beynon C.M. Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis* // Genetics. 1994. V. 138. P. 801–809.
- Soroka M. Characteristics of mitochondrial DNA of unionid bivalves (Mollusca: Bivalvia: Unionidae). I. Detection and characteristic of double uniparental inheritance (DUI) of unionid mitochondrial DNA // Folia Malacol. 2010. V. 18. № 4. P. 147–188.
- Soroka M., Kozłowski J., Wiktor A., Kałuski T. Distribution and genetic diversity of the terrestrial slugs *Arion lusitanicus* Mabille, 1868 and *Arion rufus* (Linnaeus, 1758) in Poland based on mitochondrial DNA // Folia Biol. – Krakow. 2009. V. 57. № 1–2. P. 71–81.
- Tabé M., Fukuhara Sh., Nagata Y. Genetic differentiation between two types of swan mussel, *Anodonta woodiana*, in Japan // Venus (Jap. Jour. Malac.). 1994. V. 53. № 1. P. 29–35.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software

- Version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. № 8. P. 1596–1599.
- Therriault T.W., Docker M.F., Orlova M.I., Heath D.D., Macisaac H.J. Molecular resolution of the family Dreissenidae (Mollusca: Bivalvia) with emphasis on Ponto-Caspian species, including first report of *Mytilopsis leu-*
- cophaeata* in the Black Sea basin // Mol. Phylogenet. Evol. 2004. V. 30. P. 479–489.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species // Philos. Trans. R. Soc. B – Biol. Sci. 2005. V. 360. № 1462. P. 1847–1857.

**Comparison of the Species *Sinanodonta amurensis* Moskvicheva, 1973  
and *Sinanodonta primorjensis* Bogatov et Zatravkin, 1988  
(Bivalvia: Unionidae: Anodontinae) in View of Variability  
of the Mitochondrial DNA *cox1* Gene and Conchological Features**

**E. M. Sayenko<sup>a,\*</sup>, M. Soroka<sup>b</sup>, and S. K. Kholin<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,  
prosp. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

<sup>b</sup>*Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Szczecin, Szczecin, Felczaka 3c, 71-412 Poland*

*\*e-mail: sayenko@ibss.dvo.ru*

A comparison of the mitochondrial haplotypes and conchological characteristics of shells made for the first time for two species of anodontin freshwater bivalves from the Asian genus *Sinanodonta* (*S. amurensis* and *S. primorjensis*) has confirmed a similarity of these two taxa. It was shown on the basis of statistical analysis that the discussed taxa possess similar shells and similar genetic haplotypes, and the observed differences in DNA sequences of *cox1* and shells relate to intraspecific genetic and geographical variation.