

УДК 577.2:575:574.3:594.124

І.Ю. ЧУБИК, аспірантка,
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна
e-mail: i.chubyk@onu.edu.ua
ORCID 0000-0002-1443-7778

С.В. ЧЕБОТАР, д. б. н., проф., член-кор. НААН України,
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна
e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua
ORCID 0000-0002-9130-7272

МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ МІДІЙ ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОГО РЕГІОНУ ЧОРНОГО МОРЯ

За допомогою чотирьох мікросателітних маркерів ДНК (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) було проаналізовано генетичне різноманіття та структуру популяції для трьох угруповань мідій з північно-західного регіону Чорного моря, в якості зовнішніх груп досліджено мідій з Балтійського та Північного морів. Всього за досліджуваними мікросателітними локусами визначено 59 алелів (діапазон: від 3 до 13) в п'яти угрупованнях мідій ($n = 118$). Спостережувана гетерозиготність (H_o варіює від 0,083 до 0,538) була нижчою, ніж очікувана (H_e варіює від 0,344 до 0,858). Усі угруповання мідій продемонстрували дефіцити гетерозигот, що свідчить про імовірність присутності явища інбридингу. Встановлено слабку (F_{ST} варіює від 0,036 до 0,048) та середню (F_{ST} варіює від 0,054 до 0,127) генетичну диференціацію між досліджуваними угрупованнями мідій. Розраховано генетичні дистанції між угрупованнями мідій з різних локацій, які варіювали від 0,211 до 1,130. Отримані дані підтверджено за допомогою кластерного та координатного аналізів, проведених за використання генетичних дистанцій між локаціями, що встановлені за розподілом частот алелів мікросателітних локусів.

Ключові слова: генетичне різноманіття, структура популяцій, поліморфізм, мікросателітні локуси, мідії.

Родина *Mytilidae* — різноманітна група двостулкових молюсків, широко поширених у морському середовищі. Серед цієї групи молюски р. *Mytilus* є предметом дослідження як космополітичні мешканці високоширотних прибережних морських екосистем у Північній і Південній півкулях [23]. Вони служать чутливими біоіндикаторами забруднення з великою корисністю в екотоксикології [33]. Це робить їх привабливими мо-

Ц и т у в а н н я: Чубик І.Ю., Чеботар С.В. Мікросателітний аналіз генетичного різноманіття мідій північно-західного регіону Чорного моря. *Гідробіол. журн.* 2023. Т. 59. № 5. С. 59—75.

делями для генетичних, еволюційних та екологічних досліджень. Крім того, мідії є комерційно важливими моллюсками: у 2019 р. світове виробництво моллюсків в аквакультурі досягло 17,6 млн тонн [9]. В Європі широко поширені два комерційні види мідій — *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) і *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), які схрещуються з *Mytilus trossulus* (Gould, 1850), де їхнє географічне поширення збігається [17, 30], утворюючи європейський видовий комплекс *Mytilus* [38].

Відомо [34], що мідії р. *Mytilus* мають $2n = 28$ хромосом і морфологічно консервативні каріотиби. Завдяки науковому та комерційному інтересу до мідій у біології та аквакультурі, на сьогоднішній день для р. *Mytilus* секвеновано чотири геноми та проведено анотацію генів: першим був секвенований геном *M. galloprovincialis* [26], а потім вдосконалений [15], і нещодавно були секвеновані геноми *M. coruscus* (Gould, 1861) [24, 40], *M. edulis* [6] та *M. chilensis* (Hupé, 1854) [11]. Відзначається [15], що для виду *M. galloprovincialis* було виявлено складну пангеномну архітектуру з основним набором із 45 000 генів плюс вражаюче велика кількість незамінних генів (20 000), які залежать від феномену варіацій присутності-відсутності гена (PAV) та можуть бути повністю відсутні в деяких мідій. Отримані результати надають цінну інформацію для подальших еволюційних, популяційно-генетичних та природоохоронних досліджень, а також є важливими для розуміння філогеографії живих ресурсів, забезпечення збереження їхнього біорізноманіття, стійкої експлуатації та відстеження.

На сьогоднішній день для вивчення структури популяції та генетичного різноманіття багатьох видів аквакультури широко використовується молекулярний аналіз [25]. Було показано [32], що мікросателітні (МС) маркери є придатними інструментами для оцінки генетичного різноманіття через їхні генетичні характеристики, включаючи високий рівень поліморфізму, специфічність та кодомінантне успадкування. МС широко використовуються для моніторингу генетичної варіації вирощуваних тварин, визначення батьківства та досліджень структури популяції [12, 14, 41], а також для порівняння генетичного різноманіття між дикими та культивованими популяціями морських видів мідій [16, 18, 22].

За морфологічним [2] та молекулярно-генетичним [4] аналізом чорноморську мідію класифікують як вид *M. galloprovincialis*. Проте інформації про генетичне різноманіття та структуру популяцій мідій у Чорному морі наразі недостатньо. Тому метою нашої роботи було вивчення генетичного різноманіття та популяційної структури угруповань мідії в північно-західному регіоні Чорного моря за допомогою мікросателітного аналізу.

Матеріал і методика досліджень

Генетичну різноманітність досліджували в трьох природних угрупованнях мідій (63 особини) з північно-західного регіону Чорного моря: 26 індивідуальних особин мідій з Одеської затоки (у локації А за географічними координатами N: 46°26'28" / E: 30°46'20"), 19 особин з району Ме-

моріалу 411-ї батареї (локація В — N: 46°22'2" / E: 30°43'45") та 18 особин, виловлених біля о. Зміїний (локація С — N: 45°15'18" / E: 30°12'15"). В якості зовнішніх груп було проаналізовано 37 особин мідій, виловлених в Балтійському морі біля м. Росток (у локації G — N: 54°10'55" / E: 12°5'18") та 18 особин — в Північному морі біля бельгійського узбережжя (у локації Н — N: 51°8'23" / E: 2°39'58")¹. Досліджуваних молюсків з Чорного моря до проведення мікросателітного аналізу зберігали при температурі -20°C, а молюсків з Балтійського та Північного морів — в 96%-му етанолі.

Виділення геномної ДНК з тканин (ктенідій та мантиї) індивідуальних особин мідій проводили за допомогою модифікованого методу з використанням СТАВ-буферу [39] та комерційного набору реагентів SureFood® PREP Basic за запатентованою методикою компанії-виробника (CONGEN Biotechnologie GmbH, Німеччина).

Генотипування досліджуваних особин мідій проводили за допомогою мікросателітного аналізу. Для визначення алельних характеристик за МС-локусами геному мідій було обрано чотири пари праймерів, які наведено в таблиці 1.

ПЛР-аналіз МС-локусів геному мідій проводили на ампліфікаторі Flex Cycler (Analytik Jena, Німеччина). До складу реакційної суміші входили такі компоненти: 2 мкл 10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific), 2,5 мкл буферу для ПЛР 10 Ч Dream Taq Green Buffer (Thermo Scientific), по 1 мкл прямого та зворотнього олігонуклеотидних праймерів (Metabion, Німеччина), 0,5 U полімерази Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific), 50—100 нг ДНК-матриці та стерильна деіонізована вода (до загального об'єму 25 мкл). Ампліфікацію з праймерами до МС-локусів проводили згідно рекомендацій авторів [13, 27] з внесеними модифікаціями (табл. 2).

Продукти, отримані під час реакції ампліфікації ДНК, фракціонували методом вертикального електрофорезу в 7%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) розмірами 200×200×0,75 мм. Електрофорез проходив при напрузі 300 В, протягом 2,0—2,5 год. Візуалізацію продуктів ампліфікації в ПААГ проводили шляхом фарбування гелю нітратом срібла (AgNO₃) відповідно до [29]. Для визначення розмірів продуктів ампліфікації використовували комп'ютерну програму GelAnalyzer 19.1 ([<http://www.gelanalyzer.com>] by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc), в якості маркеру молекулярної маси застосовували *pUC 19/Msp I* (Thermo Scientific).

Статистичну обробку результатів мікросателітного аналізу проводили за допомогою комп'ютерної програми GenAlEx [28]. Для всіх досліджуваних особин мідій ($n = 118$) за кожним МС-локусом було розраховано частоти алелів. Також для кожного досліджуваного локусу було роз-

¹ Автори висловлюють подяку завідувачу Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, к.б.н., доц. Ковтуну О.О., к.б.н., с.н.с. Снігірьову С.М. (Регіональний міжвідомчий центр інтегрованого моніторингу і екологічних досліджень Одеського національного університету імені І.І. Мечникова), с.н.с., д.б.н. Квачу Ю.В. (Інститут морської біології НАН України), д.природ.н. Біку А. (Ростоцький університет, Німеччина) за збір матеріалу для проведення молекулярно-генетичних досліджень.

Таблиця 1

Послідовності праймерів до мікросателітних локусів мідій р. *Mytilus*

Локус	Мотив послідовності, що повтворюється	Послідовність праймерів (5'—3')	Джерело послідовності	Сиквенс МС в GenBank	Літературне джерело
<i>Mch 5</i>	(CTGT) ₆	F: CTG TTG CTC AAT CCT TGC AG R: GCG AAA AAT AGG AAA AGA TAA GCA	<i>M. chilensis</i>	JF894127	[27]
<i>Mch 8</i>	(CA) ₆	F: AAA CCT AAG TGC TGT TCA T R: CAT TTA TTC GTC TGT CAC A		JF894130	
<i>MT 203</i>	(CA) ₈	F: GTT TTC CGA ATG GCG AGA TA R: ACA ACC AGT TCA ATA GCG ACA	<i>M. trossulus</i>	BV725482	[13]
<i>MT 282</i>	(GT) ₉	F: TGC CAC ATT GTT TTC AAG GA R: TTC ACG ACA GCG ACT ATG AAA		BV725484	

Таблиця 2

Умови проведення ПЦР

Назва праймера	Початкова денатурація	Денатурація	Відпалювання	Елонгація	Заклучна елонгація	Кількість циклів
<i>Mch 5</i>	95°C — 5 хв	94°C — 1 хв	55°C — 40 с	72°C — 1 хв	72°C — 10 хв	35
<i>Mch 8</i>	95°C — 5 хв	94°C — 1 хв	51°C — 40 с	72°C — 1 хв	72°C — 10 хв	35
<i>MT 203</i>	95°C — 5 хв	95°C — 30 сек	50°C — 45 с	72°C — 1 хв	72°C — 10 хв	35
<i>MT 282</i>	95°C — 5 хв	95°C — 30 сек	50°C — 45 с	72°C — 1 хв	72°C — 10 хв	35

раховано такі популяційно-генетичні параметри: кількість алелів на локус (N_a), спостережувану (H_o) та очікувану (H_e) гетерозиготність, індекс фіксації (F) згідно з [20]; ефективну кількість алелів (N_e) та інформаційний індекс (індекс різноманіття Шеннона) (I) згідно з [3]. Коефіцієнт генетичної диференціації (F_{ST}) між досліджуваними угрупованнями мідій розраховували за формулою [20]: $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$, де H_T — реальна очікувана гетерозиготність; H_S — середня гетерозиготність в межах популяції. Індeksi генетичної подібності (I) між угрупованнями мідій та відповідні їм величини генетичних дистанцій (D) розраховували за Неєм [21].

На основі розрахованих частот алелів МС-локусів із застосуванням програми PAST [19] побудували дендрограму подібності досліджуваних угруповань мідій за методом UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) [31] та графік розподілу цих угруповань в двофакторному просторі методом PCoA (Principal Coordinates Analysis) [42].

Результати досліджень та їх обговорення

Загалом за результатами мікросателітного аналізу з використанням чотирьох МС-локусів (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) було визначено 59 алелів в п'яти досліджуваних вибірках мідій ($n = 118$). Для локацій А, В і С ($n = 63$) з північно-західного регіону Чорного моря за досліджуваними локусами визначено 38 алелів, для локації G ($n = 37$) з Балтійського моря — 39 алелів, для локації Н ($n = 18$) з Північного моря — 35 алелів. Серед визначених алелів МС-локусів, які відрізнялися за частотами, були присутні як спільні алелі для всіх досліджуваних угруповань мідій, так і алелі, характерні тільки для зразків з окремих угруповань мідій (табл. 3).

За МС-локусом *Mch 5* було визначено 13 алелів, розміри алелів варіювали від 229 п.н. до 287 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі з розміром фрагментів ампліфікації 241 п.н. у локаціях А, В, С з частотою 0,646; 243 п.н. у локації Н — 0,429; 245 п.н. у локації G — 0,340. За МС-локусом *Mch 8* — 17 алелів, розміри яких варіювали від 185 п.н. до 245 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі — 213 п.н. з різною частотою у локаціях А (0,385), В (0,600), С (0,792), G (0,188); 215 п.н. — у локації G з частотою 0,188; 223 п.н. — у локації Н з частотою 0,286. За МС-локусом *MT 203* — 16 алелів, розміри яких варіювали від 175 п.н. до 243 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі — 179 п.н. (0,426) у локації G; 185 п.н. (0,280) у локації А; 187 п.н. (0,375) у локації С; 189 п.н. з різною частотою у локаціях В (0,292) і Н (0,324). За МС-локусом *MT 282* — 13 алелів, розміри яких варіювали від 332 п.н. до 372 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі — 332 п.н. у локації А з частотою 0,295; 334 п.н. з різною частотою у локаціях А (0,273), В (0,531), С (0,192), G (0,371); 336 п.н. і 340 п.н. у локації С — 0,192; 344 п.н. у локації Н — 0,294.

Для досліджуваних угруповань молюсків за допомогою ПЛР-аналізу МС-локусів геному мідій було детектовано 11 спільних алелів різних розмірів: 241 п.н. за локусом *Mch 5*; 209 п.н. — *Mch 8*; 179 п.н., 185 п.н., 187 п.н., 189 п.н., 191 п.н. і 215 п.н. — *MT 203*; 334 п.н., 338 п.н. і 344 п.н. — *MT 282*. Для локацій (А, В і С) Чорного моря було виявлено 15 спільних

Таблиця 3

Частоти алелів мікросателітних локусів і розмір вибірки за досліджуваними угрупованнями мідій

Локус	Розмір але- ля в п.н.	Частоти алелів у локації				
		А	В	С	G	Н
<i>Mch 5</i>	$N_A = 13$	$n = 24$	$n = 14$	$n = 11$	$n = 25$	$n = 14$
	229	0,000	0,000	0,091	0,060	0,000
	233	0,000	0,143	0,000	0,060	0,000
	237	0,271	0,214	0,136	0,180	0,000
	239	0,021	0,286	0,000	0,000	0,071
	241	0,646	0,357	0,682	0,120	0,143
	243	0,042	0,000	0,091	0,000	0,429
	245	0,000	0,000	0,000	0,340	0,107
	249	0,000	0,000	0,000	0,140	0,071
	253	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000
	257	0,021	0,000	0,000	0,000	0,036
	261	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000
	265	0,000	0,000	0,000	0,040	0,107
	287	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036
<i>Mch 8</i>	$N_A = 17$	$n = 26$	$n = 15$	$n = 12$	$n = 28$	$n = 16$
	185	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000
	193	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031
	195	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000
	197	0,000	0,000	0,000	0,089	0,000
	203	0,000	0,000	0,000	0,161	0,000
	207	0,000	0,033	0,042	0,000	0,000
	209	0,154	0,133	0,167	0,018	0,063
	211	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000
	213	0,385	0,600	0,792	0,000	0,188
	215	0,096	0,033	0,000	0,089	0,188
	217	0,269	0,200	0,000	0,036	0,031
	223	0,000	0,000	0,000	0,286	0,156
	225	0,000	0,000	0,000	0,089	0,156
	227	0,000	0,000	0,000	0,089	0,000
	229	0,058	0,000	0,000	0,089	0,031

Продовження табл. 3

Локус	Розмір алеля в п.н.	Частоти алелів у локації				
		A	B	C	G	H
	237	0,000	0,000	0,000	0,000	0,156
	245	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000
MT 203	$N_A = 16$	$n = 25$	$n = 12$	$n = 8$	$n = 34$	$n = 17$
	175	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000
	179	0,080	0,083	0,063	0,426	0,206
	181	0,080	0,167	0,000	0,059	0,059
	183	0,040	0,000	0,125	0,059	0,000
	185	0,280	0,167	0,125	0,132	0,147
	187	0,160	0,125	0,375	0,088	0,059
	189	0,100	0,292	0,063	0,044	0,324
	191	0,060	0,125	0,188	0,074	0,059
	195	0,080	0,000	0,000	0,059	0,029
	203	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
	211	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000
	215	0,020	0,042	0,063	0,015	0,088
	217	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029
	229	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
	237	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
	243	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
MT 282	$N_A = 13$	$n = 22$	$n = 16$	$n = 13$	$n = 31$	$n = 17$
	332	0,295	0,125	0,038	0,000	0,059
	334	0,273	0,531	0,192	0,371	0,118
	336	0,091	0,031	0,192	0,194	0,000
	338	0,023	0,156	0,154	0,081	0,176
	340	0,045	0,000	0,192	0,048	0,147
	342	0,068	0,000	0,038	0,097	0,000
	344	0,091	0,063	0,038	0,161	0,294
	348	0,068	0,000	0,154	0,000	0,000
	350	0,023	0,063	0,000	0,000	0,088
	354	0,000	0,031	0,000	0,048	0,029
	364	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000

Продовження табл. 3

Локус	Розмір алей в п.н.	Частоти алелів у локації				
		А	В	С	G	Н
	368	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059
	372	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029

П р и м і т к а. n — розмір вибірки (кількість особин); N_A — кількість алелів; жирним шрифтом в таблиці відмічено частоти алелів, які зустрічаються найчастіше в досліджуваних локаціях (А — Одеська затока (Гідробіологічна станція ОНУ); В — район Меморіалу 411-ї батареї; С — о. Зміїний; G — Балтійське море; Н — Північне море).

алелів за досліджуваними МС-локусами: 237 п.н. і 241 п.н. за локусом *Mch 5*; 209 п.н. і 213 п.н. — *Mch 8*; 179 п.н., 185 п.н., 187 п.н., 189 п.н., 191 п.н. і 215 п.н. — *MT 203*; 332 п.н., 334 п.н., 336 п.н., 338 п.н. і 344 п.н. — *MT 282*. Для локацій (G і Н) Балтійського і Північного морів виявлено 23 спільних алей: 241 п.н., 245 п.н., 249 п.н. і 265 п.н. за локусом *Mch 5*; 209 п.н., 215 п.н., 217 п.н., 223 п.н., 225 п.н. і 229 п.н. — *Mch 8*; 179 п.н., 181 п.н., 185 п.н., 187 п.н., 189 п.н., 191 п.н., 195 п.н. і 215 п.н. — *MT 203*; 334 п.н., 338 п.н., 340 п.н., 344 п.н. і 354 п.н. — *MT 282*. Крім того, в угрупованнях мідій Чорного моря було виявлено 20 алелів, яких не виявлено в угрупованнях Балтійського та Північного морів, а також 20 інших алелів — спільних для трьох морів. За МС-локусом *Mch 5* мідії з локацій А, В і С відрізнялися від мідій з локації G наявністю алелів розміром: 239 п.н., 243 п.н., 257 п.н. та відсутністю алелів — 245 п.н., 249 п.н., 253 п.н., 261 п.н. і 265 п.н.; від локації Н наявністю алелів: 229 п.н., 233 п.н. і 237 п.н. та відсутністю — 245 п.н., 249 п.н., 265 п.н. і 287 п.н. За локусом *Mch 8* локації А, В і С відрізнялися від локацій G і Н наявністю алелів: 207 п.н. і 245 п.н., та алей 213 п.н. характерного для локації Н. За локусом *Mch 8* локації А, В і С відрізнялися від локацій G відсутністю алелів: 185 п.н., 195 п.н., 197 п.н., 203 п.н., 211 п.н., 223 п.н., 225 п.н. і 227 п.н.; від локації Н — 193 п.н., 223 п.н., 225 п.н. і 237 п.н. За локусом *MT 203* локації А, В і С відрізнялися від локацій G і Н наявністю алелів: 203 п.н., 229 п.н., 237 п.н. і 243 п.н., та алей 183 п.н. характерного для локації Н. За локусом *MT 203* локації А, В і С відрізнялися від локацій G і Н відсутністю алелів розміром 211 п.н. і 217 п.н., відповідно. За локусом *MT 282* локації А, В і С відрізнялися від локації G тільки наявністю алелів: 332 п.н., 348 п.н., 350 п.н. і 364 п.н.; від локації Н відрізнялися наявністю алелів: 336 п.н., 342 п.н., 348 п.н. і 364 п.н. та відсутністю — 368 п.н. і 372 п.н.

Отримані нами алейні характеристики за МС-локусами геному досліджуваних особин мідій виходили за межі розмірів алелів, що вказані розробниками праймерів [13, 27]. Такі розбіжності в зазначених межах алелів за мікросателітними локусами (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) були

продемонстровані при дослідженні популяцій або вибірок різних представників р. *Mytilus* (табл. 4). Відомо [1], що мікросателіти є однаковими у близьких видів, і це дозволяє використовувати однакові праймери для проведення мікросателітного аналізу.

Слід зазначити, що досліджувані угруповання мідій раніше нами були проаналізовані за допомогою молекулярного маркера *Me 15-16* (до неповторювальної області гена адгезивного білка ноги) з метою встановлення видової приналежності. Згідно результатів нашого дослідження [4, 5], всі особини мідій з локацій північно-західного регіону Чорного моря були ідентифіковані як вид *M. galloprovincialis* (171 особина), серед мідій з Балтійського моря були виявлені представники видів *M. trossulus* (одна особина), *M. edulis* (26 особин) та їхні гібриди (11 особин), серед мідій з Північного моря — *M. edulis* (18 особин), *M. galloprovincialis* (одна особина) та їхній гібрид.

Для визначення рівня генетичного різноманіття досліджуваних угруповань мідій, за кількістю ідентифікованих алелів для кожного з МС-локусів і визначених частот алелів було розраховано основні генетичні характеристики (табл. 5).

За даними, наведеними в таблиці 5, найбільшу кількість детектованих алелів та найвище значення ефективної кількості алелів на локус у досліджуваних угрупованнях мідій спостерігали у локації А за МС-локусом *MT 203* (13 алелів, $N_E = 7,062$), локації G за МС-локусом *Mch 8* (12 алелів, $N_E = 6,672$). Найменшу кількість детектованих алелів та найменше значення ефективної кількості алелів на локус спостерігали у локації С за МС-локусом *Mch 8* (3 алеля, $N_E = 1,524$). Найбільш різноманітними угрупованнями мідій за інформаційним індексом є локації А за МС-локусом *MT 203* ($I = 2,225$) та G за МС-локусом *Mch 8* ($I = 2,137$). Найменших значень цей індекс сягає у локації С за МС-локусом *Mch 8* ($I = 0,616$). Спостережувальна гетерозиготність варіювала в діапазоні від 0,083 (локація С, *Mch 8*) до 0,538 (локація С, *MT 282*). Отримані значення очікуваної гетерозиготності були значно вищими спостережуваної гетерозиготності і варіювали в діапазоні від 0,344 (локація С, *Mch 8*) до 0,858 (локація А, *MT 203*). Індекс фіксації варіював від 0,088 (локація G, *MT 282*) до 0,818 (локація С, *Mch 5*) і характеризувався позитивними значеннями, що свідчить про дефіцит гетерозиготних генотипів в досліджуваних угрупованнях мідій. Можемо припустити, що виявлений дефіцит гетерозигот виник внаслідок схрещування близькоспоріднених організмів між собою — інбридинг.

Хартль Д.Л. і Кларк А.Г. [20] описують, що багато популяцій підрозділяються на групи всередині більших груп, свого роду структуру, яка називається ієрархічною структурою популяції. У великих популяціях географічний поділ популяції дозволяє виділяти субструктури, а види, які поширені на великій географічній території, поділяти на субпопуляції. Генетичні наслідки субструктури популяції є наслідком того, що частоти алелів можуть відрізнятися від однієї субпопуляції до іншої.

Таблиця 4

Алельна характеристика досліджуваних мікросателітних локусів,
розроблених для р. *Mytilus*

Локус	Вид	Регіони вилову мідій	Розмір алелів в п.п.	<i>n</i>	<i>N_A</i>	<i>H_O</i>	Літературне джерело
<i>Mch 5</i>	Mch	Регіон Чилое (Кайкаен, Чилі)	213—221	24	4	0,261	[27]
	Me	Орхус, Ронде, Данія	221—229	12	3	0,250	
	Mt	Екере, Фінляндія	—	12	—	—	
	Mg	Віго, Іспанія	205—227	12	8	0,545	
<i>Mch 8</i>	Mch	Регіон Лос-Лагос	215—353	20—53	9	—	[8]
	Mch	Регіон Чилое (Кайкаен, Чилі)	193—207	24	9	0,750	[27]
	Me	Орхус, Ронде, Данія	193—211	12	5	0,250	
	Mt	Екере, Фінляндія	184—202	12	3	0,083	
<i>MT 203</i>	Mg	Віго, Іспанія	191—203	12	6	0,500	
	Mch	Регіон Лос-Лагос	181—211	20—53	8	—	[8]
	Mt	Балтійське море, архіпелаг Борн-хольм (Б) і Троза (Т)	161—197	50	Б:8	0,38	[13]
					Т:13	0,46	
<i>MT 282</i>	Me	Північне море	174—206	16	8	0,56	
	Mg	Нова Зеландія	117—245	16-30	—	0,21—0,60	[37]
	Mt	Балтійське море, архіпелаг Борн-хольм (Б) і Троза (Т)	336—354	50	Б:7	0,25	[13]
					Т:6	0,18	
	Me	Північне море	336—354	16	9	0,50	
	Mg	Нова Зеландія	324—388	16-30	—	0,40—0,93	[37]

Примітка. *n* — розмір вибірки (кількість особин); *N_A* — кількість алелів; *H_O* — спостережувана гетерозиготність. Скорочене позначення виду: *M. galloprovincialis* — Mg; *M. trossulus* — Mt; *M. edulis* — Me; *M. chilensis* — Mch.

За допомогою генетичного коефіцієнту інбридингу субпопуляції відносно цілої популяції (*F_{ST}*), який використовується для вимірювання ге-

нетичної диференціації гена між популяціями щодо частот алеля, було виявлено генетичну мінливість між угрупованнями мідій з трьох локацій Чорного моря та між угрупованнями з різних морів: Чорного (локації А, В і С), Балтійського (локація G) і Північного (локація Н) (табл. 6).

За отриманими даними коефіцієнта F_{ST} , між угрупованням мідій з локацій Чорного моря було встановлено слабку (В і А, $F_{ST} = 0,036$; С і А, $F_{ST} = 0,048$) та середню (С і В, $F_{ST} = 0,061$) попарну генетичну диференціацію. Між угрупованнями мідій Чорного, Балтійського та Північного морів

Таблиця 5

Генетична характеристика угруповань мідій з різних локацій північно-західного регіону Чорного моря (А, В, С), Балтійського (G) і Північного (Н) морів за мікросателітними локусами

Назва локації	Локус	n	N_A	Діапазон розмірів алелів в п.н.	N_E	I	H_O	H_E	F
А	<i>Mch 5</i>	24	5	237—257	2,028	0,930	0,208	0,507	0,589
	<i>Mch 8</i>	26	6	203—245	3,874	1,524	0,423	0,742	0,430
	<i>MT 203</i>	25	13	179—243	7,062	2,225	0,360	0,858	0,581
	<i>MT 282</i>	22	10	332—364	5,232	1,915	0,500	0,809	0,382
В	<i>Mch 5</i>	14	4	233—241	3,630	1,334	0,143	0,724	0,803
	<i>Mch 8</i>	15	5	207—217	2,381	1,124	0,200	0,580	0,655
	<i>MT 203</i>	12	7	179—215	5,538	1,816	0,167	0,819	0,797
	<i>MT 282</i>	16	7	332—354	3,012	1,449	0,375	0,668	0,439
С	<i>Mch 5</i>	11	4	229—243	2,000	0,969	0,091	0,500	0,818
	<i>Mch 8</i>	12	3	207—213	1,524	0,616	0,083	0,344	0,758
	<i>MT 203</i>	8	7	179—215	4,571	1,721	0,500	0,781	0,360
	<i>MT 282</i>	13	8	332—348	6,145	1,903	0,538	0,837	0,357
G	<i>Mch 5</i>	25	9	229—265	5,187	1,879	0,200	0,807	0,752
	<i>Mch 8</i>	28	12	185—229	6,672	2,137	0,536	0,850	0,370
	<i>MT 203</i>	34	11	175—215	4,421	1,903	0,176	0,774	0,772
ht	<i>MT 282</i>	31	7	334—354	4,512	1,702	0,710	0,778	0,088
Н	<i>Mch 5</i>	14	8	239—287	4,170	1,735	0,357	0,760	0,530
	<i>Mch 8</i>	16	9	193—237	6,649	1,996	0,375	0,850	0,559
	<i>MT 203</i>	17	9	179—217	5,303	1,894	0,353	0,811	0,565
	<i>MT 282</i>	17	9	332—372	5,898	1,955	0,294	0,830	0,646

П р и м і т к а. n — розмір вибірки (кількість особин); N_A — кількість алелів; N_E — кількість ефективних алелів; I — інформаційний індекс; H_O — спостережувана гетерозиготність; H_E — очікувана гетерозиготність; F — індекс фіксації.

встановлено середню генетичну диференціацію, яка варіювала від 0,054 до 0,127.

За матеріалами розрахунків генетичних дистанцій за Неєм, отримані значення варіювали від 0,211 до 1,130 (табл. 7). Найбільш генетично віддаленими ($D = 1,130$) та найменш подібними ($I = 0,323$) одна від одної виявилися локації С і G. Це свідчить, що локації С і G представлені різними видами мідій і узгоджується з попередніми даними щодо видової приналежності [4]. Найменш генетично віддаленими і в той час найбільш подібними були угруповання мідій з локації північно-західного регіону Чорного моря: А і В ($D = 0,216$; $I = 0,806$), А і С ($D = 0,211$; $I = 0,809$), В і С ($D = 0,282$; $I = 0,754$).

Також потрібно зазначити, що виявлені в нашому дослідженні за допомогою мікросателітного аналізу гетерозиготні дефіцити та низькі рівні генетичної диференціації раніше були описані в літературі для популяцій різних видів мідій: *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791) з Нової Зеландії [35]; *M. edulis* (диких і вирощених на фермах) з Нью-Гемпшира, США [7], *M. galloprovincialis* вздовж східного узбережжя Адріатичного моря [18].

Узагальнювальну оцінку генетичної диференціації досліджуваних угруповань мідій з різних локацій за даними мікросателітного аналізу отримано шляхом проведення кластерного і координатного аналізу на основі генетичних відстаней між угрупованнями мідій з різних локацій за розподілом частот алелів МС-локусів (рис. 1, 2).

Таблиця 6

Попарна генетична диференціація серед п'яти досліджуваних угруповань мідій з різних локацій, оцінених за мікросателітними локусами

Локації	А	В	С	G	Н
А	0,000				
В	0,039	0,000			
С	0,048	0,061	0,000		
G	0,081	0,085	0,127	0,000	
Н	0,077	0,075	0,109	0,054	0,000

Таблиця 7

Генетичні дистанції (верхня діагональ) та генетична подібність (нижня діагональ) між угрупованнями мідій за результатами мікросателітного аналізу

Локації	А	В	С	G	Н
А	0,000	0,216	0,211	0,833	0,756
В	0,806	0,000	0,282	0,819	0,660
С	0,809	0,754	0,000	1,130	0,811
G	0,435	0,441	0,323	0,000	0,655
Н	0,470	0,517	0,445	0,520	0,000

За результатами кластерного аналізу досліджуваних угруповань мідій утворили два кластери: до першого кластеру увійшли угруповання мідій з регіону Чорного моря (локації А, В, С), до другого кластеру — локації G і Н. Отриманий розподіл локацій на дендрограмі свідчить про більшу генетичну подібність угруповань мідій Чорного моря і про їх меншу подібність з мідіями, вивченими в Балтійському і Північному морях.

Аналіз головних координат показав, що угруповання мідій з локації А і В знаходяться на мінімальній відстані одна від одної та на середній відстані від локації С. Локації G і Н (зовнішні групи) були максимально віддалені від угруповань мідій з локацій Чорного моря. Розміщення локацій на дендрограмі (метод UPGMA) було подібне до їхнього розміщення на графіку (метод РСоА). Отримані результати узгоджуються з даними літератури щодо еколого-географічного поширення видів мідій р. *Mytilus* [10, 36].

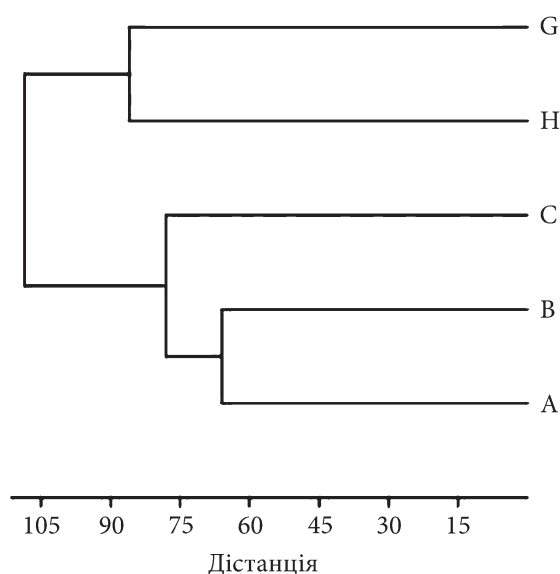


Рис. 1. Дендрограма генетичної подібності між угрупованнями мідій з п'яти локацій, побудована на основі генетичних відстаней між ними за розподілом частот алелів МС-локусів (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) з використанням методу UPGMA. Тут і на рис. 2 — досліджувані локації: А — Одеська затока (Гідробіологічна станція ОНУ); В — район Меморіалу 411-ї батареї; С — о. Зміїний; G — Балтійське море; Н — Північне море

Висновки

Таким чином, за допомогою мікросателітного аналізу було досліджено генетичне різноманіття та популяційну структуру угруповань мідій з локацій (А, В і С) північно-західного регіону Чорного моря, а також з локацій (G і Н) з Балтійського та Північного морів. За чотирма поліморфними МС-локусами (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) було ідентифіковано 59 алелів для п'яти досліджуваних угруповань мідій. Найбільшою кількістю детектованих алелів та найбільш різноманітним угрупованням моллюсків за індексом різноманіття Шеннона характеризується локація А (13 алелів, $I = 2,225$) за локусом *MT 203*, найменшою кількістю алелів та різноманіттям — локація С (3 алеля, $I = 0,616$) за локусом *Mch 8*.

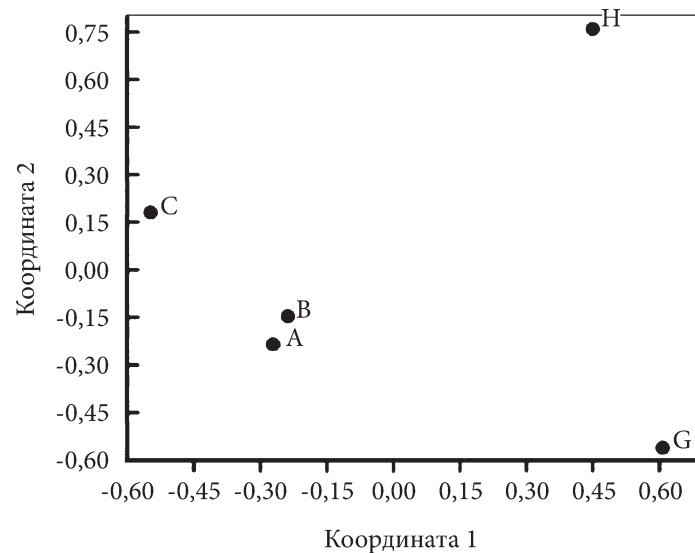


Рис. 2. Графік розподілу угруповань мідій з п'яти досліджуваних локацій на основі генетичних відстаней між ними за розподілом частот алелів МС-локусів (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) за допомогою методу РСоА

Дані спостережуваної та очікуваної гетерозиготності, а також індекси фіксації свідчили про дефіцит гетерозигот у досліджуваних угрупованнях мідій. За коефіцієнтом F_{ST} між угрупованнями мідій з Чорного моря встановлено слабку та середню генетичну диференціацію, а між угрупованнями мідій з Чорного і Балтійського та Північного морів — середню генетичну диференціацію.

Застосовані МС-маркери в п'яти досліджених вибірках мідій з різних локацій виявили 20 однакових алелів. Одночасно в чорноморських угрупованнях мідій зустрічались 20 алелів, які не спостерігались у досліджених угрупованнях мідій з Балтійського і Північного морів. Менші генетичні дистанції, тобто більша генетична подібність встановлена між угрупованнями мідій з Чорного моря. Однак, отримані результати генетичної диференціації виявилися достатніми для виділення внутрішньовидових генетичних груп в досліджуваних локаціях північно-західного регіону Чорного моря.

Показано, що за частотами алелів мікросателітних локусів досліджені угруповання Балтійського та Північного морів відрізняються від угруповань мідій з Чорного моря. За результатами кластерного і координатного аналізів, які проведено з урахуванням частот алелів мікросателітних локусів, наглядно доведено більшу спорідненість угруповань мідій Чорного моря, угруповання мідії з Балтійського та Північного морів більшою мірою дистанційовані від чорноморських мідій. Надалі перспективним є

дослідження більшої кількості угруповань мідій з різних локацій Чорного моря з використанням додаткових мікросателітних маркерів.

Список використаної літератури

1. Трофименко О.Л., Гиль М.І., Сметана О.Ю. Генетика популяцій: підручник / за ред. професора М.І. Гиль. Миколаїв (МНАУ) : Гельветика, 2018. 254 с.
2. Шурова Н.М. Структурно-функціональна організація популяцій мідій *Mytilus galloprovincialis* Чорного моря : монографія. Київ : Наук. думка, 2013. 208 с.
3. Brown A.H.D., Weir B.S. Measuring genetic variability in plant populations / *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Part A. Ed. by Tanksley S.D., Orton T.J. 1983. P. 219—239.
4. Chubyk I., Chebotar G., Bick A., Chebotar S. Species affiliation of the North-Western region of the Black Sea mussels based on the results of molecular-genetic analysis. *Hydrobiol. J.* 2022. Vol. 58, N 3. P. 68—75.
5. Chubyk I., Kvach Y., Chebotar S. Genetic composition of *Mytilus* species in mussel settlements from the North Sea. IV. International Agricultural, Biological & Life Science Conf. (Edirne, Turkey, 29—31 August 2022). Edirne. 2022. P. 115—116.
6. Corrochano-Fraile A., Davie A., Carboni S., Bekaert M. Evidence of multiple genome duplication events in *Mytilus* evolution. *BMC Genomics*. 2022. Vol. 23, N 1. P. 1—13.
7. Daniels E.Q., Litvaitis M.K. Does peripheral dislodgement contribute to heterozygote deficiencies in blue mussels? *Invertebr. Biol.* 2017. Vol. 136, N 3. P. 301—308.
8. Despio P.F.M. Evaluación genética del chorito *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854), en base a su distribución batimétrica en los bancos naturales del estuario Reloncaví, región de Los Lagos. PhD thesis, Instituto de Acuicultura, Puerto Montt Chile. 2016. 69 p.
9. Food and Agricultural Organization (FAO) FAO Yearbook of Fishery and Aquaculture Statistics 2019. Aquaculture Production. Rome : FAO, 2021. 110 p.
10. Gaitán-Espitia J.D., Quintero-Galvis J.F., Mesas A., D'Elia G. Mitogenomics of Southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Pteriomorpha): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. *Sci. Res.* 2016. Vol. 6. P. 1—10.
11. Gallardo-Escárate C., Valenzuela-Muñoz V., Nuñez-Acuña G. et al. Chromosome-Level Genome Assembly of the Blue Mussel *Mytilus chilensis* Reveals Molecular Signatures Facing the Marine Environment. *Genes*. 2023. Vol. 14, N 4. P. 1—27.
12. Gao X.G., Li H.J., Li Y.F. et al. Sixteen polymorphic simplesequence repeat markers from expressed sequence tags of the Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis*. *Int. J. Mol. Sci.* 2010. Vol. 11, N 8. P. 3035—3038.
13. Gardeström J., Pereyra R.T., André C. Characterization of six microsatellite loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis*. *Conserv. Genet.* 2008. Vol. 9. P. 1003—1005.
14. Geist J., Kuehn R. Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. *Mol. Ecol.* 2005. Vol. 14, N 2. P. 425—439.
15. Gerdol M., Moreira R., Cruz F. et al. Massive gene presence-absence variation shapes an open pan-genome in the Mediterranean mussel. *Genome Biol.* 2020. Vol. 21. P. 1—21.
16. Giantsis I., Mucci N., Randi E., Abatzopoulos T., Apostolidis A. Microsatellite variation of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in central and eastern Mediterranean: Genetic panmixia in the Aegean and the Ionian Seas. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.* 2014. Vol. 94, N 4. P. 797—809.
17. Gosling E.M. Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. *Dev. Aquac. Fish. Sci.* 1992. Vol. 25. P. 1—20.
18. Hamilton J.S., Piria M., Gavrilović A. et al. Limited population genetic variation but pronounced seascape genetic structuring in populations of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the eastern Adriatic Sea. *Ecol. Evol.* 2023. Vol. 13, N 1. P. 1—17.

19. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont. Electr.* 2001. Vol. 4. P. 1—9.
20. Hartl D.L., Clark A.G. Principles of Population Genetics. 3rd Ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc., 1997. 519 p.
21. Hedrick P.W. Genetics of Populations. 2nd Ed. Boston: Jones and Bartlett, 2000. 553 p.
22. Larraín M.A., Díaz N.F., Lamas C. et al. Heterologous microsatellite-based genetic diversity in blue mussel (*Mytilus chilensis*) and differentiation among localities in southern Chile. *LAJAR*. 2015. Vol. 43, N 5. P. 998—1010.
23. Larraín M.A., González P., Pérez C., Araneda C. Comparison between single and multi-locus approaches for specimen identification in *Mytilus* mussels. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, N 1. P. 1—13.
24. Li R., Zhang W., Lu J. et al. The whole-genome sequencing and hybrid assembly of *Mytilus coruscus*. *Front. Genet.* 2020. Vol. 11. P. 1—6.
25. Liu Z.J., Cordes J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. 2004. Vol. 238. P. 1—37.
26. Murgarella M., Puiu D., Novoa B. et al. A first insight into the genome of the filter-feeder mussel *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, N 3. P. 1—22.
27. Ouagajjou Y., Presa P., Astorga M., Perez M. Microsatellites of *Mytilus chilensis*: a genomic print of its taxonomic status within *Mytilus* sp. *J. Shellfish Res.* 2011. Vol. 30. P. 325—330.
28. Peakall R., Smouse P.E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. P. 2537—2539.
29. Promega Technical Manual. Gene Print. STR Systems. Printed in USA. Revised. 1999. 52 p.
30. Riginos C., Cunningham C.W. Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis*×*Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Mol. Ecol.* 2004. Vol. 14. P. 381—400.
31. Sneath P.H.A., Sokal R.R. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco : Freeman, 1973. 573 p.
32. Sun X.W., Zhang X.F., Zhao Y.Y. et al. Development and application of microsatellite markers in aquatic species. *JFSC*. 2008. Vol. 15, N 4. P. 689—703. (in Chinese).
33. Sureda A., Box A., Tejad S. et al. Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). *Aquat. Toxicol.* 2011. Vol. 101, N 3—4. P. 540—549.
34. Thiriot-Quiévreux C. Advances in cytogenetics of aquatic organisms / *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Ed. by Beaumont A.R. London : Chapman and Hall, 1994. P. 369—388.
35. Wei K.-J., Wood A.R., Gardner J.P.A. Population genetic variation in the New Zealand greenshell mussel: Locus-dependent conflicting signals of weak structure and high gene flow balanced against pronounced structure and high self-recruitment. *Mar. Biol.* 2013. Vol. 160. P. 931—949.
36. Wenne R., Zbawicka M., Bach L. et al. Trans-Atlantic Distribution and Introgression as Inferred from Single Nucleotide Polymorphism: Mussels *Mytilus* and Environmental Factors. *Genes (Basel)*. 2020. Vol. 11, N 5. P. 1—31.
37. Westfall K.M. Molecular ecology and systematics of blue mussels (genus *Mytilus*) (Mytilidae; Bivalvia; Mollusca) in the Southern hemisphere. PhD thesis, Victoria University of Wellington, New Zealand, 2011. 275 p.
38. Wilson J., Matejusova I., McIntosh R.E. et al. New diagnostic SNP molecular markers for the *Mytilus* species complex. *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13. P. 1—13.
39. Winnepenninckx B., Backeljau T., De Wachter R. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends. Genet.* 1993. Vol. 9, N 12. P. 407.

40. Yang J.-L., Feng D.-D., Liu J. et al. Chromosome-level genome assembly of the hard-shelled mussel *Mytilus coruscus*, a widely distributed species from the temperate areas of East Asia. *GigaScience*. 2021. Vol. 10, N 4. P. 1—13.
41. Zhan A.B., Hu J.J., Hu X.L. et al. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation? *Mar. Biotech.* 2009. Vol. 11, N 2. P. 223—235.
42. Zuur A.F., Ieno E.N., Smith G.M. *Analysing Ecological Data*. New York: Springer, 2007. 672 p.

Надійшла 4.05.2023

I.Yu. Chubyk, PhD student,
Odesa I.I. Mechnikov National University,
Dvoryanskaya str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
e-mail: i.chubyk@onu.edu.ua
ORCID 0000-0002-1443-7778

S.V. Chebotar, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Corresponding member of the NAAS of Ukraine,
Odesa I.I. Mechnikov National University,
Dvoryanskaya str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua
ORCID 0000-0002-9130-7272

MICROSATELLITE ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY OF MUSSELS FROM THE NORTH-WESTERN REGION OF THE BLACK SEA

Using four microsatellite DNA markers (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*), the genetic diversity and population structure of three groups of mussels from the North-Western region of the Black Sea were analyzed, and mussels from the Baltic and North Seas were studied as outgroups. A total of 59 alleles (range: 3 to 13) were determined by the studied microsatellite loci in five groups of mussels ($n = 118$). The observed heterozygosity (H_o ranges from 0.083 to 0.538) was lower than expected (H_e ranges from 0.344 to 0.858). All mussel groups showed heterozygous deficits, which suggests the possibility of inbreeding. Weak (F_{ST} ranges from 0.036 to 0.048) and medium (F_{ST} ranges from 0.054 to 0.127) genetic differentiation between the studied groups of mussels was established. Genetic distances between groups of mussels from different locations were calculated, which ranged from 0.211 to 1.130. The obtained data were confirmed by cluster and coordinate analyzes carried out using genetic distances between locations, which were established by the distribution of allele frequencies of microsatellite loci.

Keywords: genetic diversity, population structure, polymorphism, microsatellite loci, mussels.