«Тёмная лошадка» литорали

Сравнительная характеристика двух представителей *Arenicola* spp. на основе секвенирования митохондриальных (COI, 16S) и ядерных (18S, 28S) маркеров

Выдыш Мария
Холодкова Анастасия

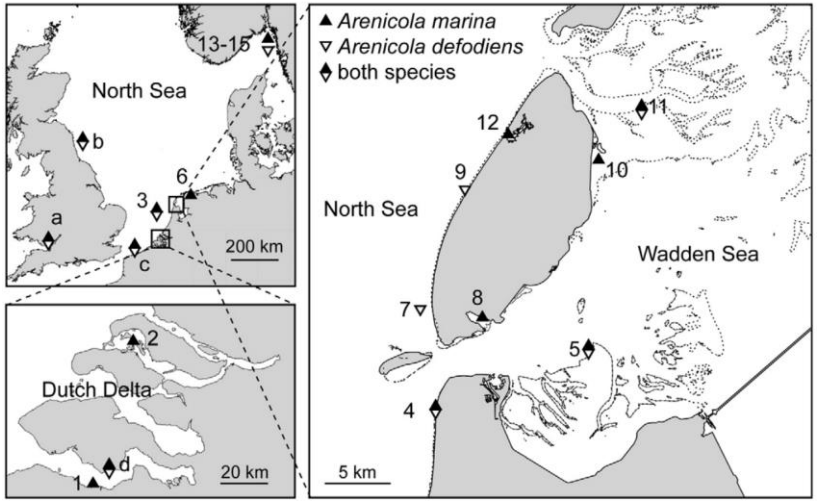
Arenicola marina vs *Arenicola defodiens*

Phylum Annelida
Class Polychaeta
Subclass Sedentaria
Infraclass Scolecida
Family Arenicolidae
Genus Arenicola

XZ8839, **XZ8842** — **f. ruber** (красная морфа)
XZ8840, **XZ8841** — **f. nigra** (чёрная морфа)

Все образцы были собраны в Чёрных Щелях
(пролив Великая Сальма, Кандалакшский залив).

Псевдокриптические виды: *A. marina* и *A. defodiens*

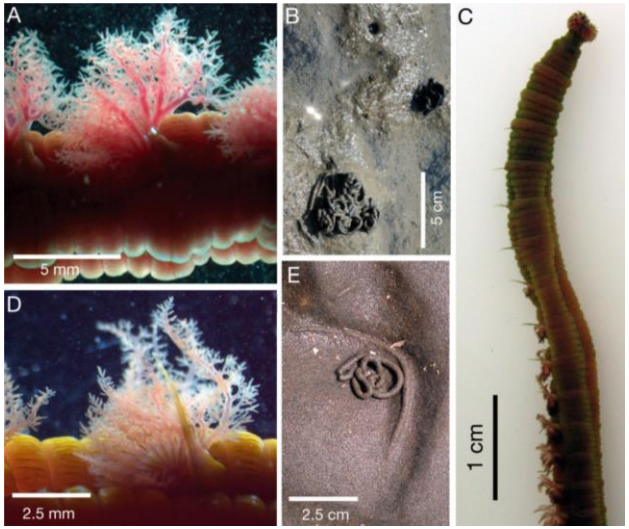


- Тонкие различия видов:
  - число подсегментов 2-го переднего сегмента (3 у *A. marina* vs 2 у *A. defodiens*);
  - размер ооцитов (173 µm vs 159 µm);
  - сроки нереста (у *A. defodiens* на 1–2 месяца позже);
  - предпочитаемые местообитания.
- **Генетическое расхождение по COI — 14%** (оценка дивергенции: 33–63 млн лет).
- Два пика нереста в Вадденском море первоначально связывали с двумя видами — но и морфология, и мтДНК показали, что **оба пика принадлежат *A. marina***.

Внешние различия (окраска, размер, сроки нереста) не являются надёжным критерием для разделения видов *Arenicola*. Только генетический анализ позволяет надёжно идентифицировать вид.

Источник: Luttikhuizen & Dekker (2010), *J. Sea Res.* 63: 17–23. https://doi.org/10.1016/j.seares.2009.09.001

Генетическая идентификация тёмноокрашенных особей *Arenicola*



- Впервые *A. defodiens* обнаружен на Иберийском полуострове.
- Комбинированный подход включал анализ морфологии и последовательностей фрагментов COI и 16S рДНК.
- Расхождение между видами: COI — **13,5%**, 16S — **5%**
- *A. defodiens* и *A. marina* — **близкородственные, но чётко различающиеся виды**.
- Показано, что виды могут **сосуществовать (симпатрия)**, но занимать разные экологические ниши, различающиеся по типу осадков, глубине, времени осушения.

Тёмноокрашенные особи, внешне напоминающие *A. defodiens*, генетически не отличаются от красных *A. marina*, что подтверждает, что окраска — не видовой признак, а внутривидовая изменчивость.

Источник: Pires et al. (2015) — *Marine Ecology Progress Series* 533: 177–190. https://doi.org/10.3354/meps11315

Цель

Видовая идентификация двух по-разному окрашенных морф *Arenicola* cf. *marina*

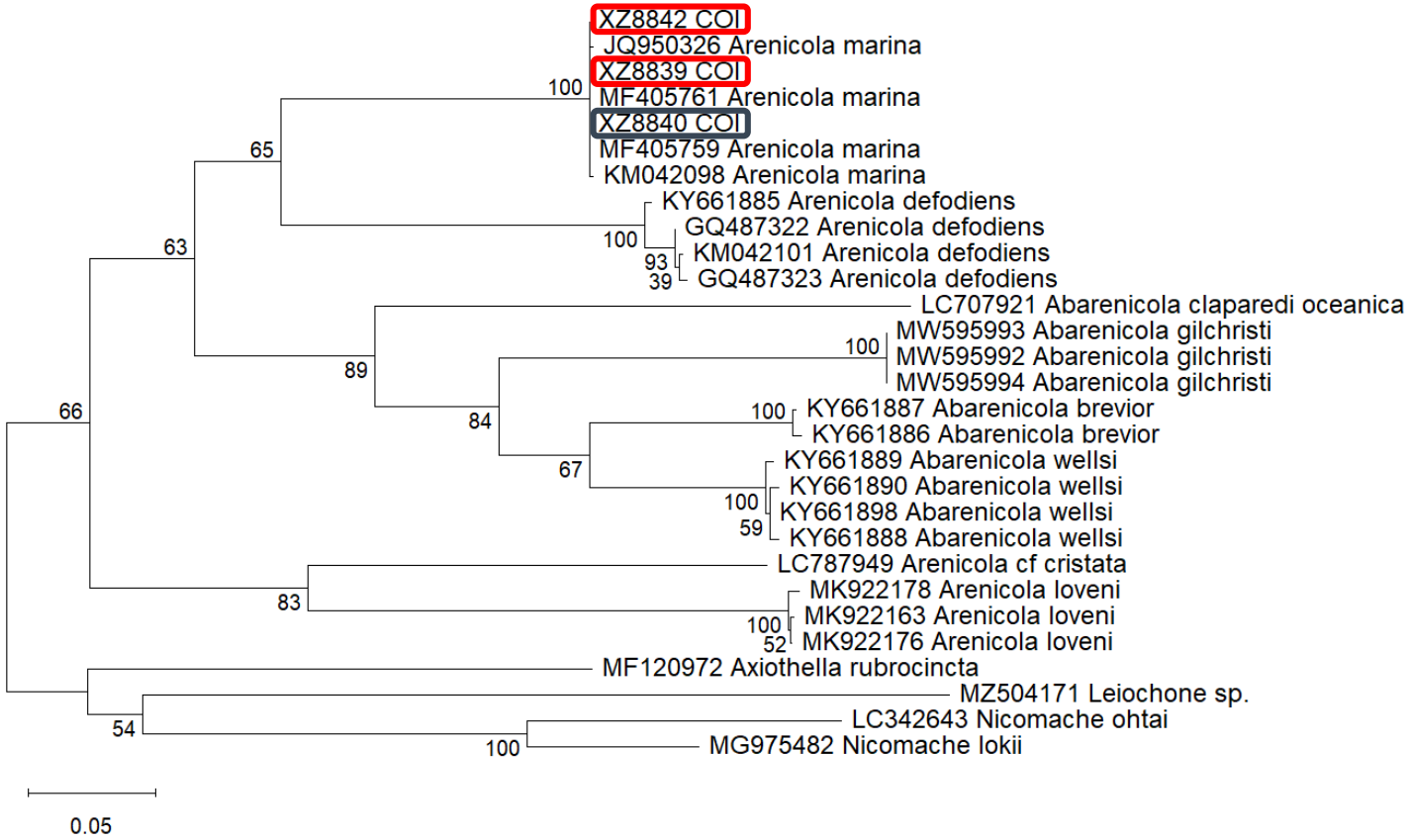
Задачи

1. Выделить геномную ДНК из образцов.
2. Провести ПЦР целевых фрагментов с универсальными праймерами и подготовить ампликоны к секвенированию по Сэнгеру.
3. Секвенировать, найти референсы в GenBank через BLAST, выполнить выравнивание и построить филогенетические деревья.
4. Установить систематическое положение образцов.
5. Проверить, образуют ли красный и тёмный морфотипы обособленные клады, и уточнить таксономический статус тёмных образцов.

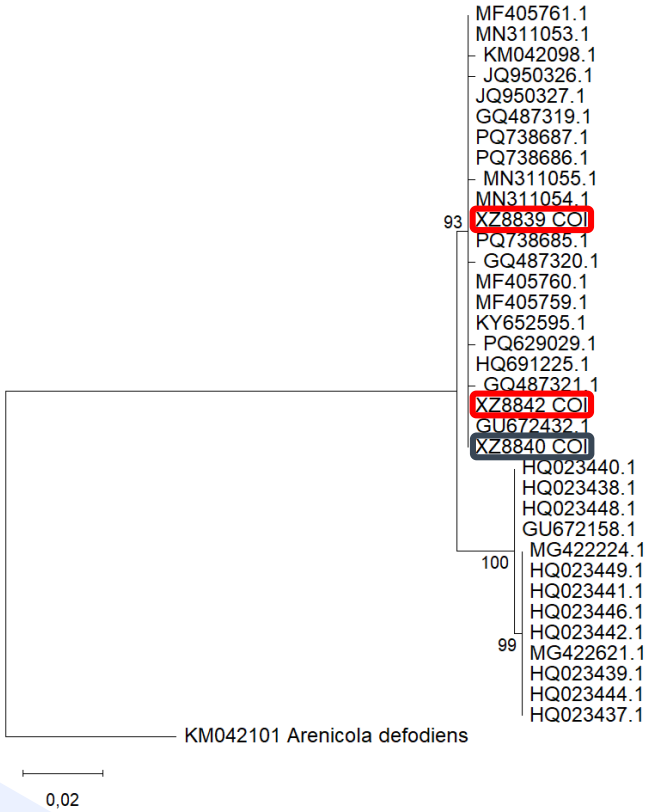
Методология

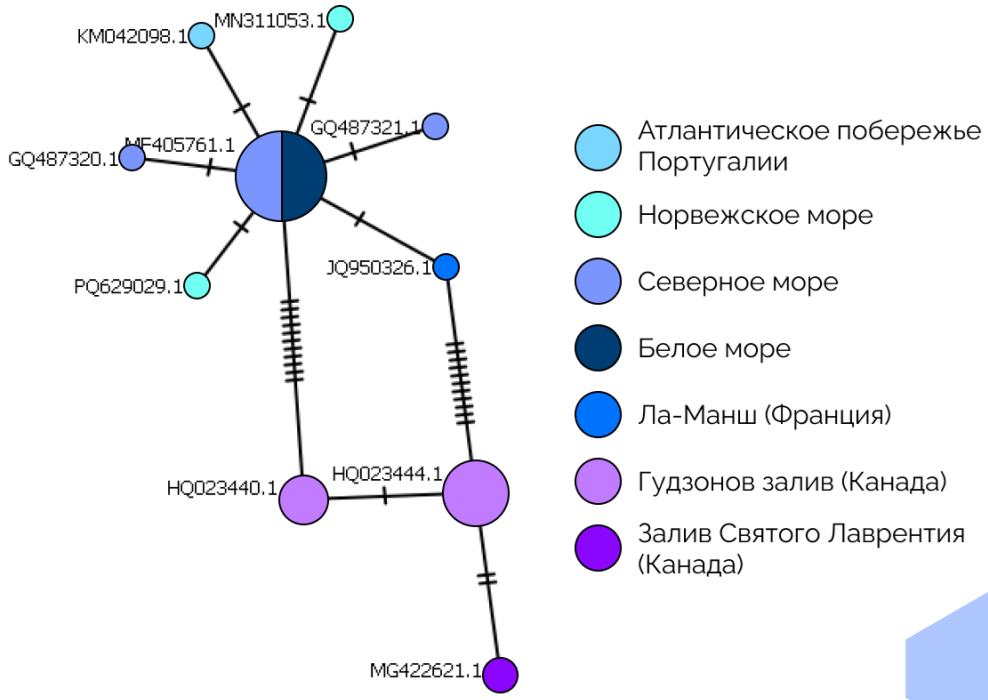
1. Отбор препаратов мышечной стенки 4 образцов *Arenicola spp.*
2. Выделение тотальной ДНК с помощью набор Diatom™ DNA Prep 100 (Галарт Диагностикум).
3. Амплификация митохондриальных (COI, 16S) и ядерных маркёров (18S, 28S) с использованием 5xScreenMix (Evrogen).
4. Проверка наличия продукта в пробах электрофорезом, подготовка проб к секвенированию по Сэнгеру и получение сиквенсов.
5. Обработка сиквенсов (CodonCode Aligner) и построение филогенетических деревьев (MEGA12) и гаплосетей (PopART).

Филогенетический анализ последовательностей фрагмента COI

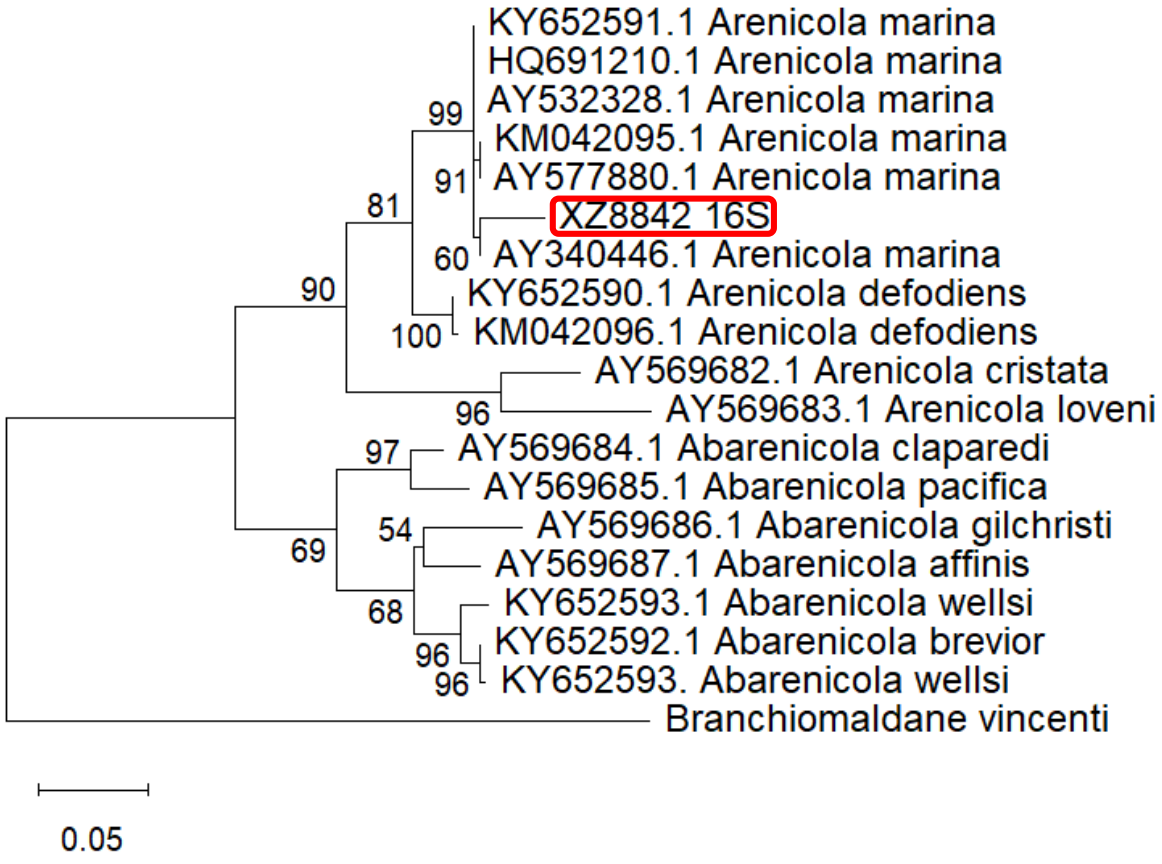


Филогенетический анализ последовательностей фрагмента COI

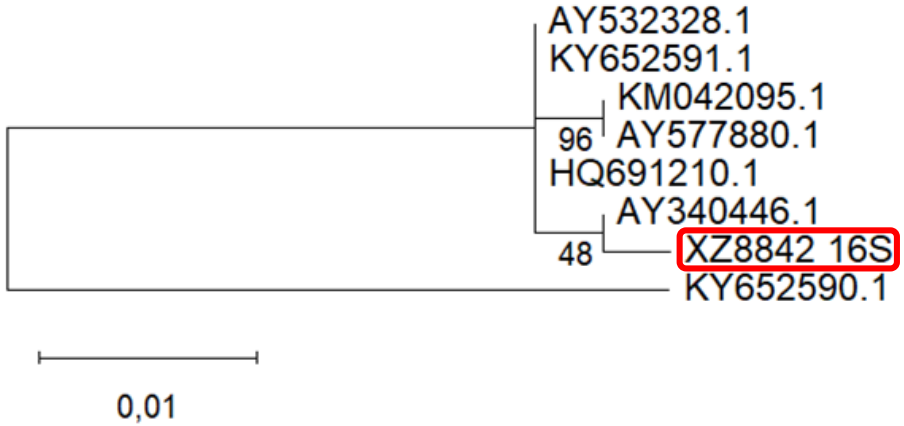


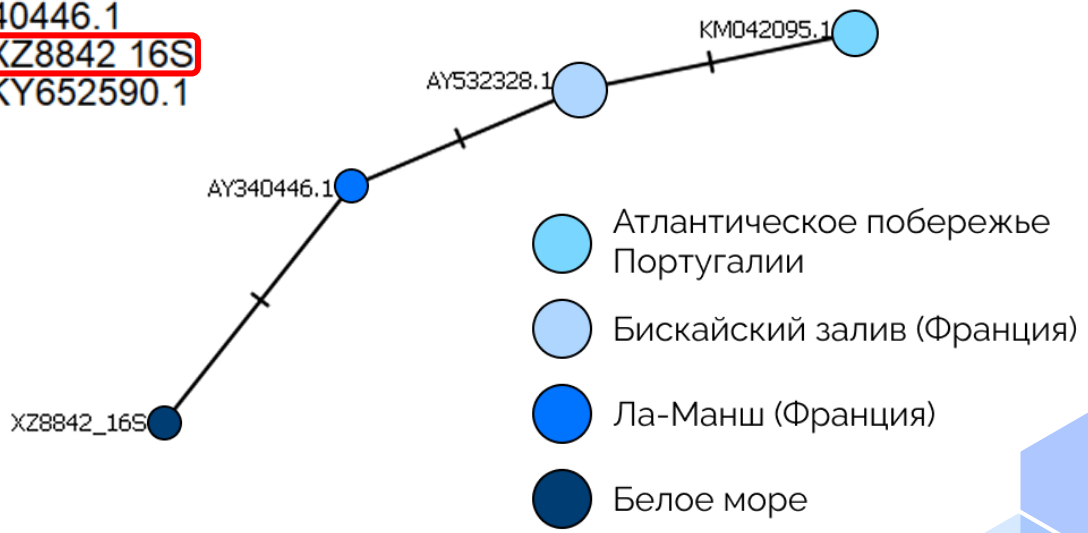


Филогенетический анализ последовательностей фрагмента мт-16S рРНК

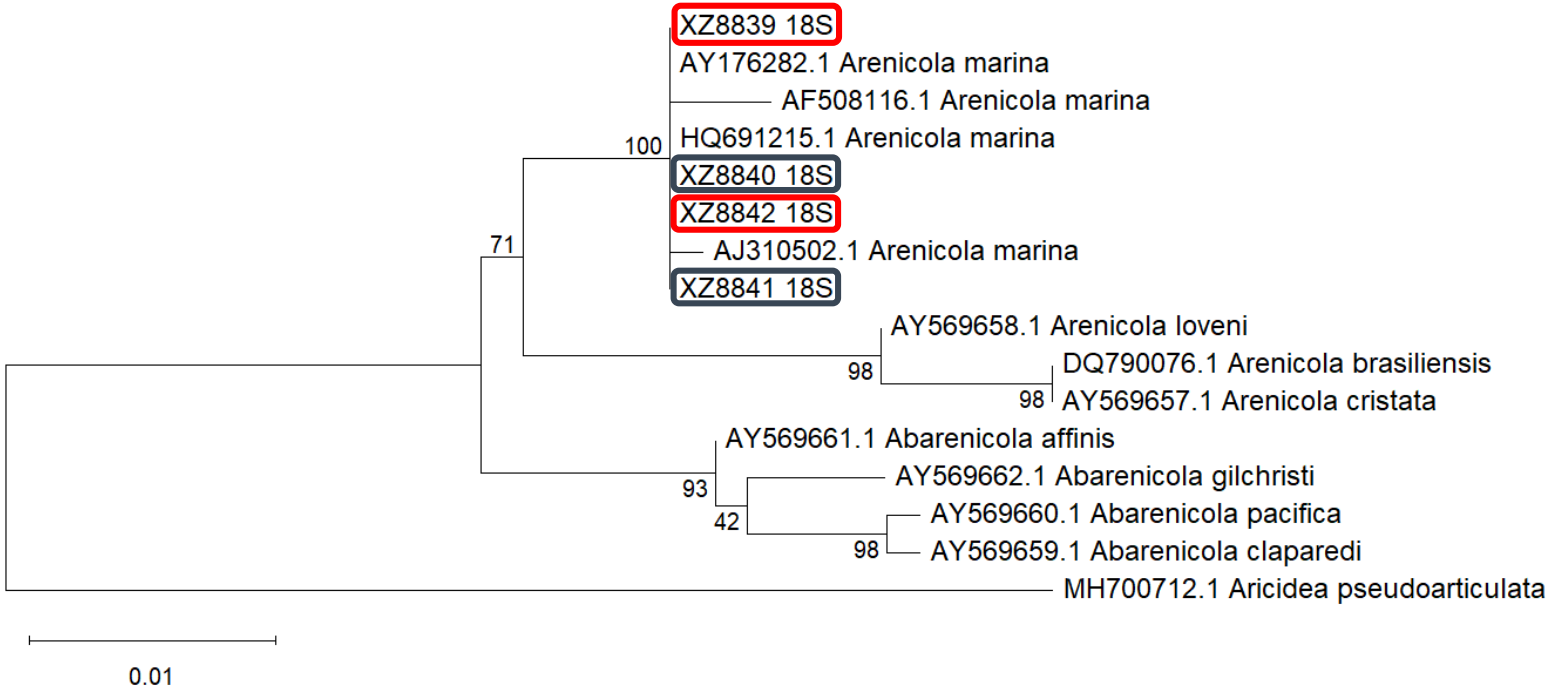


Филогенетический анализ последовательностей фрагмента 16S рРНК

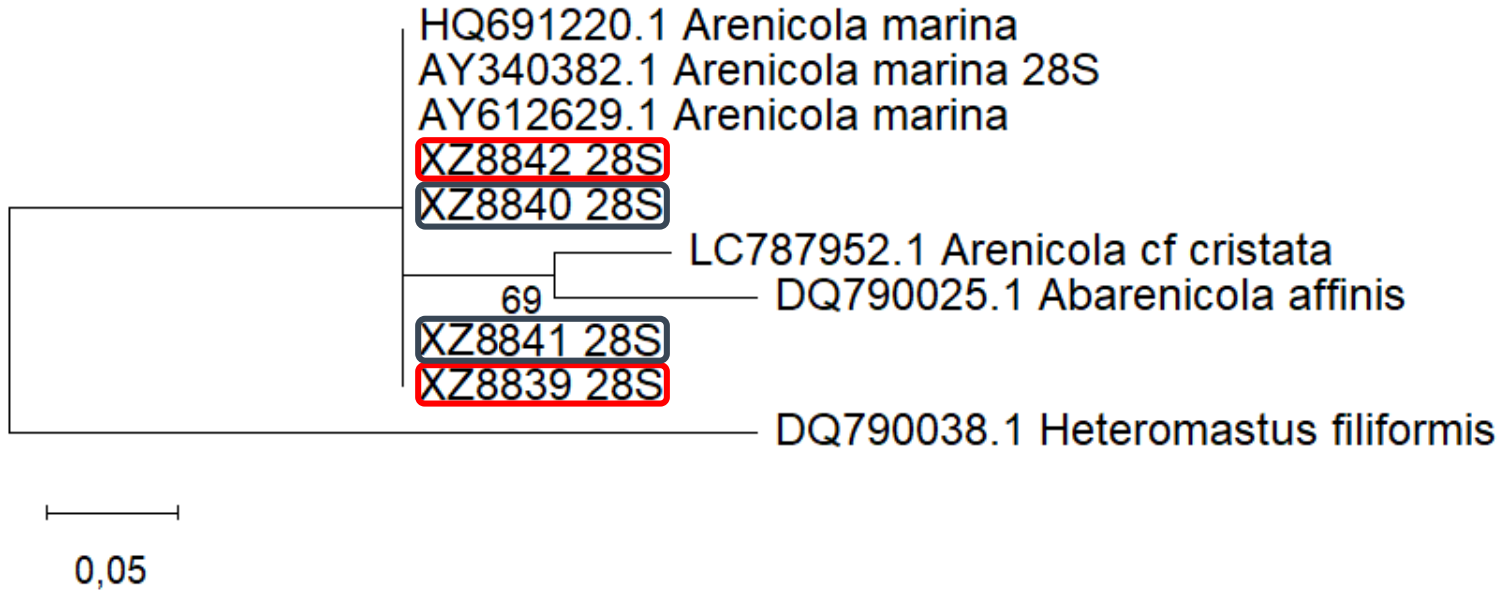




Филогенетический анализ последовательностей 18S рРНК



Филогенетический анализ последовательностей фрагмента 28S рРНК



Выводы

1. По митохондриальным (COI, 16S) и ядерным (18S, 28S) маркерам все четыре исследованных образца относятся к виду *Arenicola marina*.
2. Красные и тёмные особи не образуют обособленных клад, соответствующих разным видам; тёмные образцы группируются вместе с *A. marina*.
3. Тёмная окраска является внутривидовой изменчивостью *A. marina*, а не признаком отдельного вида.
4. Митохондриальные маркёры COI и 16S более информативны для внутривидового уровня, тогда как ядерные маркёры 18S и 28S подтверждают видовую и родовую принадлежность.
5. Окраска тела не может использоваться как надёжный диагностический признак для разделения видов у *Arenicola*.

Спасибо
за внимание!