

ЕКОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ ВОДНИХ ТВАРИН

УДК 577.2:575:574.3:594.124

І.Ю. ЧУБИК, аспірантка,
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082, Україна
e-mail: inna_chubik@ukr.net
ORCID 0000-0002-1443-7778

Г.О. ЧЕБОТАР, к.б.н.,
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська 2, Одеса, 65082, Україна
e-mail: gchebotar@gmail.com
ORCID 0000-0002-7465-4678,

А. БІК, д.природ.н.
Ростоцький університет,
Університетська площа, 2, м. Росто́к, 18055, Німеччина
e-mail: andreas.bick@uni-rostock.de
ORCID 0000-0003-2356-6106

С.В. ЧЕБОТАР, д.б.н., проф., член-кор. НААН,
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

ВИДОВА ПРИНАЛЕЖНІСТЬ МІДІЙ ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОГО РЕГІОНУ ЧОРНОГО МОРЯ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ

Проведено ідентифікацію поселень мідій північно-західного регіону Чорного моря використовуючи діагностичний маркер Me 15-16 до неповторювальної області гена адгезивного білка мідій. Мідії в досліджуваних локаціях характеризувалися алелем довжиною 126 п.н., що відповідає виду *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). В якості референтних зразків за діагностичним маркером Me 15-16 були проаналізовані мідії з Балтійського моря, серед яких виявлені представники видів *Mytilus trossulus* (Gould, 1850), *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) та їх гібриди, які характеризувалися довжиною алелів 168 п.н. і 180 п.н. Виявлено більшу спорідненість виду *M. galloprovincialis* з *M. edulis*, ніж з видами *M. californianus* і *M. coruscus* за результатами філогенетичного аналізу амінокислотних послідовностей адгезивного білка стопи мідій.

Ключові слова: *Mytilus galloprovincialis*, молекулярні маркери, Me 15-16, адгезивний білок, філогенетичний аналіз.

Ц и т у в а н н я: Чубик І.Ю., Чеботар Г.В., Бік А., Чеботар С.В. Видова приналежність мідій північно-західного регіону Чорного моря за результатами молекулярно-генетичного аналізу. *Гідробіол. журн.* 2022. Т. 58, № 1. С. 71—80.

ISSN 0375-8990. Гідробіологічний журнал. 2022. 58(1)

Мідії р. *Mytilus* — двостулкові молюски з найбільшою біомасою у морях вищих широт. Завдяки застосуванню нових популяційно-генетичних методів, за останні роки значно зросла кількість досліджень з екології, систематики та популяційної генетики р. *Mytilus*.

За даними Інтегрованої таксономічної інформаційної системи (ITIS) [<https://www.itis.gov>], на сьогоднішній день до р. *Mytilus* відносять п'ять видів: *M. californianus* Conrad, 1837, *M. chilensis* Hupé, 1854, *M. edulis* Linnaeus, 1758, *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819, *M. trossulus* Gould, 1850. Світовий реєстр морських видів (WoRMS) [<https://www.marinespecies.org>] включає вищенаведені і додатково три види: *M. planulatus* Lamarck, 1819, *M. platensis* d'Orbigny, 1842 та *M. unguiculatus* Valenciennes, 1858 (або *M. coruscus* Gould, 1861). Більшість наукових публікацій [19, 29, 33—35], незалежно від цих списків, припускають наявність у Північній півкулі лише трьох видів мідій: *M. edulis*, *M. galloprovincialis* і *M. trossulus*. Вони схрещуються між собою, коли співіснують просторово, утворюючи гібридні зони [13, 17, 24, 26, 28].

Середземноморська мідія *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Mytilidae) — один з найбільш яскравих прикладів широкого розселення морських тварин у різні райони Світового океану шляхом ненавмисної антропогенної інтродукції [16, 32, 36]. У Чорному морі середземноморську мідію називають чорноморською. Вона формує поселення на різних біотопах (прибережні конструкції, скельні субстрати, донні мулові відкладення). Широкий ареал виду забезпечується його пластичністю, в основі якого має бути генетична різноманітність. З фенотипних ознак у мідій істотно варіюють форма і колір стулочок. Дослідження ізоферментних спектрів так само свідчать про їх значну внутрішньовидову різноманітність [1].

На сьогоднішній день добре вивчені морфологічна, розмірно-вікова, статева, фенотипна структура мідій у поселеннях Чорного моря [2—10]. За співвідношенням зовнішнього призматичного і внутрішнього перламутрового шарів у зоні лігаменту на внутрішній поверхні стулочок чорноморських мідій виділяють два морфологічні типи: *galloprovincialis*-подібні і *trossulus*-подібні. Найбільша кількість *trossulus*-подібних особин відзначена у прибережних опріснених водах та у районах з високим рівнем антропогенного навантаження. У північно-західній частині Чорного моря вони мають меншу швидкість росту і тривалість життя (три роки), ніж *galloprovincialis*-подібні (десять років), що відображається на біомасі у поселеннях. Поява *trossulus*-подібних мідій у Чорному морі може бути результатом гібридизації інтродукованого виду *M. trossulus* з нативним *M. galloprovincialis*. Однак, для більш повної характеристики *M. galloprovincialis* та її диференціації від найближчих родичів (*M. edulis* і *M. trossulus*) потрібно виявляти генетичну структуру популяції.

Для ідентифікації видів р. *Mytilus* широко використовується молекулярний маркер Me15-16, розроблений до неповторювальної області гена поліфенольного адгезивного білка, який дозволяє мідіям прикріплюватися до різноманітних субстратів [11, 12, 15, 22]. Цей білок стопи мідій був

виділений з *M. edulis* і містить повтори мотиву декапептиду АКPSYP*P*TY*K, де P* та Y* позначають відповідно гідроксипролін та 3,4-дигідроксифенілаланін (ДОФА), та гексапептидний мотив АКРТY*K. Первинна структура адгезивного білка була визначена після клонування відповідних генів. Показано [14], що адгезивний білок стопи складається з відносно короткого неповторюваного домену та довгого повторюваного. Повторюваний домен містить більше 70 повторів декапептиду і 13 або 14 гексапептидних повторів, але кількість і характер розподілу мотивів змінюються навіть у одного виду [14].

Амінокислотна послідовність адгезивного білка *M. galloprovincialis* також складається з неповторюваних і повторюваних доменів, але в обох наявні значні відмінності відносно цього білка у *M. edulis*. Основна відмінність у повторюваному домені полягає в тому, що амінокислотна послідовність *M. galloprovincialis* містить 62 декапептидні повтори без гексапептидного мотиву, неповторюваний домен має делецію 18 амінокислот. Відомо [18], що довжина фрагментів, ампліфікованих з неповторюваної області цього гена, є специфічною для кожного виду мідій, а довжина повторюваної області дуже розрізняється навіть у межах одного виду. Таким чином, неповторювана область використовується як діагностичний маркер, до неї було розроблено праймери (*Me 15 / Me 16*), які застосовують для ідентифікації *M. edulis*, *M. galloprovincialis* і *M. trossulus* [18].

Метою нашої роботи було встановити видову приналежність мідій північно-західного регіону Чорного моря за допомогою молекулярного маркера *Me 15-16*, з'ясувати, чи зустрічаються *M. edulis* та *M. trossulus* і їх гібриди разом з видом *M. galloprovincialis* у вибраних локаціях, і провести філогенетичний аналіз за амінокислотними послідовностями адгезивного білка стопи видів мідій, що представлені у GenBank.

Матеріал і методика досліджень

Матеріалом дослідження послужили особини мідій, виловлені у 2018–2021 рр. у шести локаціях північно-західного регіону Чорного моря: в Одеській затоці (локація А за географічними координатами N: 46°26'28" / E: 30°46'20"; локація Е — 46°22'35"N, 30°45'7"E), у районі Меморіалу 411-ї батареї (локація В — 46°22'2"N, 30°43'45"E), біля о. Зміїний (локація С — 45°15'18"N, 30°12'15"E), у Сухому лимані (локація D — 46°20'22"N, 30°39'38"E) і Тилігульському лимані (локація F — 46°40'46"N, 30°9'26"E). Як контроль використовували мідій, виловлених у Балтійському морі біля м. Росток (локація G — 12°5'18" N, 54°10'55"E). З локації А було проаналізовано 37 особин, з локації В — 25, з локації С — 26, з локації D — 24, з локації Е — 29, з локації F — 30 і з локації G — 38 особин.

До проведення молекулярно-генетичного аналізу молюсків з Чорного моря заморожували при температурі -20°C, а молюсків з Балтійського моря зберігали у 96% етанолі.

Очищення геномної ДНК із індивідуальних особин мідій проводили за допомогою модифікованого методу з використанням СТАВ буферу ISSN 0375-8990. Гідробіологічний журнал. 2022. 58(1)

[30] та колонок CONGEN Biotechnologie GmbH (Німеччина). Популяції мідій ідентифікували за допомогою ПЛР із застосуванням молекулярного маркера *Me 15-16* [18] (табл. 1).

ПЛР проводили на ампліфікаторі «Flex Cycler» (Analytik Jena, Німеччина) за програмою, рекомендованою [18]. Застосований у роботі діагностичний маркер *Me 15-16* характеризується трьома продуктами ПЛР, що відрізняються довжиною фрагментів ампліфікації — алелів у різних видів мідій: при ампліфікації з ДНК *M. edulis* визначається фрагмент 180 п. н., з ДНК *M. trossulus* — фрагмент 168 п. н. і з ДНК *M. galloprovincialis* — 126 п. н.

Продукти ампліфікації, отримані в ПЛР з праймерами *Me 15-16*, фракціонували методом електрофорезу у 7%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) розмірами 200×200×0,75 мм у камері для електрофорезу VE-20 (Helicon, Росія). Електрофорез проводили при напрузі 300 В впродовж 2 год. Візуалізацію продуктів ПЛР здійснювали шляхом фарбування гелю азотнокислим сріблом відповідно до методики [27]. Довжину фрагментів ампліфікації обраховували відповідно до маркера молекулярної маси *pUC 19 / Msp I* із застосуванням комп'ютерної програми GelAnalyzer [http://www.gelanalyzer.com].

Пошук амінокислотних послідовностей, представлених у GenBank (NCBI [https://www.ncbi.nlm.nih.gov]) споріднених адгезивних білків представників р. *Mytilus* проведено за алгоритмом blastp. Вирівнювання амінокислотних послідовностей споріднених білків здійснювали за допомогою програми ClustalX [http://www.clustal.org]. Філогенетичне дерево побудоване у програмному забезпеченні MEGA [21] із застосуванням методу UPGMA [31].

Результати досліджень та їх обговорення

Результати ПЛР-аналізу із застосуванням діагностичного маркера *Me 15-16* виявили ідентичні за довжиною фрагменти ампліфікації у 171 особини мідій з локацій північно-західного регіону Чорного моря. Всі вони характеризувалися алелем розміром 126 п. н., що свідчить про наявність особин лише виду *M. galloprovincialis* (рис. 1). Слід зазначити, що

Таблиця 1

Комбінація праймерів до гену адгезивного білка мідії

Праймери	Послідовності праймерів 5'–3'	T_e (°C)	N	Довжина алелів, п. н.
<i>Me 15</i>	CCAGTATACAAACCTGTGAAGA	56	3	126
<i>Me 16</i>	TGTTGTCTTAATAGGTTTGTAAAGA			148
				180

T_e — температура відпаду праймерів в ПЛР; N — кількість алелів згідно даних літератури [18].

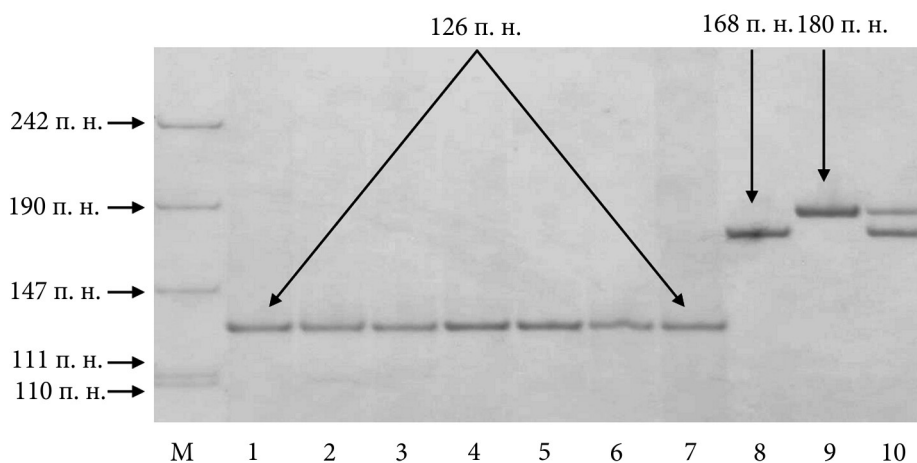


Рис. 1. Електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР із застосуванням праймерів *Me 15 / Me 16* ДНК мідій: *M* — маркер *pUC 19 / Msp I*; Чорне море: 1—2 — з локації *A*; 3—4 — з локації *C*; 5—7 — з локації *F*; 8 — *M. trossulus*; 9 — *M. edulis*; 10 — гібрид *M. trossulus* × *M. edulis* з локації *G* (референтні зразки з Балтійського моря)

за морфологічними ознаками дев'ять особин з локації *A* і шість з локації *B* було віднесено до типу *trossulus*-подібних.

За допомогою діагностичного маркера *Me 15-16* були досліджені мідії Адріатичного моря [15], які за морфологічними характеристиками визначалися як вид *M. galloprovincialis*, і показано, що серед 110 проаналізованих особин з 22 локацій дві мали гетерозиготний генотип. Одна з них характеризувалась алелями довжиною 126 п. н. і 180 п. н. визначена як гібрид *M. galloprovincialis* × *M. edulis*, друга — 126 п. н. та 168 п. н. визначена як гібрид *M. galloprovincialis* × *M. trossulus*. Отримані результати були підтвердженні секвенуванням продуктів ПЛР, отриманих з використанням комбінації праймерів *Me 15 / Me 16*.

Відомо [20], що у Балтійському морі зустрічаються два види мідій, *M. edulis* колонізує його західну частину при солоності від 12 до 25‰, а *M. trossulus* зустрічається у східній частині при солоності від 4,5 до 8‰. При цьому обидва види демонструють місцеву адаптацію до природної солоності, утворюючи зони гібридизації. У нашому дослідженні за допомогою маркера *Me 15—16* проаналізовано 38 особин мідій з локації *G*, серед яких було зареєстровано одну *M. trossulus*, яка характеризувалась фрагментом ампліфікації 168 п. н., 26 особин виду *M. edulis*, у яких виявлено фрагмент ампліфікації 180 п. н., і 11 гібридів *M. trossulus* × *M. edulis* — спектр ампліфікації відповідає гетерозиготному генотипу (рис. 2).

У базі даних GenBank представлені повні і часткові амінокислотні послідовності адгезивного білка шести видів мідій р. *Mytilus*: *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus*, *M. coruscus*, *M. chilensis*, *M. trossulus*. Для філогенетичного аналізу ми обрали лише повні амінокислотні пос-

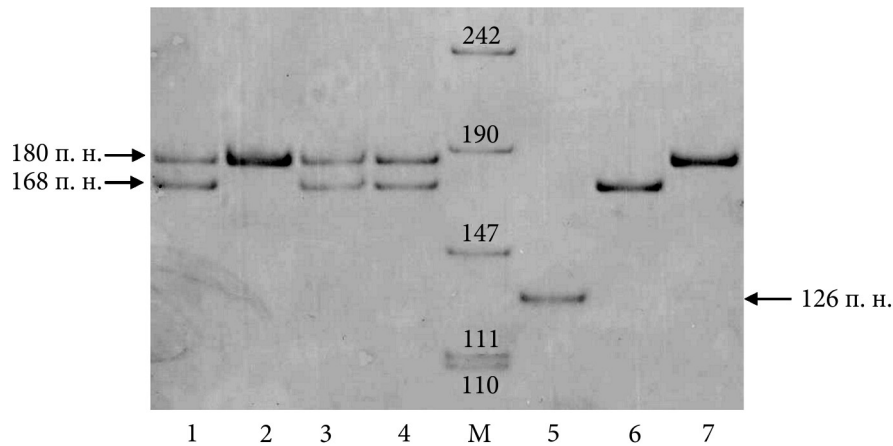


Рис. 2. Електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР із застосуванням праймерів *Me 15 / Me 16* ДНК мідій з Балтійського моря: 1, 3, 4 — міжвидові гібриди *M. trossulus* × *M. edulis*; M — маркер *pUC 19 / Msp I*; 5 — контрольний зразок (*M. galloprovincialis*); 6 — *M. trossulus*; 2, 7 — *M. edulis*

лідовності адгезивного білка таких видів: *M. galloprovincialis* (ID: Q27409) з послідовністю довжиною 751 амінокислота, *M. galloprovincialis* (ID: VDI57717.1) — 600 амінокислот, *M. edulis* (ID: AAX23968.1) — 565 амінокислот, *M. californianus* (ID: AAY29131.1) — 732 амінокислоти, *M. californianus* (ID: AAY29132.1) — 672 амінокислоти, *M. coruscus* (ID: SAC5361065.1) — 872 амінокислоти, *M. coruscus* (ID: Q25434.1) — 872 амінокислоти. Зазначимо, що повну послідовність адгезивного білка *M. trossulus* досі не анотовано.

Вирівнювання семи амінокислотних послідовностей споріднених білків чотирьох видів мідій було згенероване програмою ClustalX. У програмі MEGA із застосуванням методу UPGMA на підставі розрахунків генетичних дистанцій побудоване філогенетичне дерево (рис. 3).

Еволюційні відстані розраховані за допомогою методу числа відмінностей [25] і є одиницями кількості амінокислотних відмінностей на послідовність. Представлена дендрограма відображає філогенетичні відношення видів мідій р. *Mytilus*, виявлені при порівнянні амінокислотних послідовностей адгезивного білка стопи молюсків. На дендрограмі виділилися на два кластери. До першого увійшли *M. californianus* і *M. coruscus*, до другого — *M. edulis* і *M. galloprovincialis*. Отримані результати свідчать про більшу спорідненість *M. edulis* і *M. galloprovincialis* між собою, ніж з *M. californianus* і *M. coruscus*, які утворюють окремий кластер. Цікаво, що за даними філогенії, побудованої за аналізом мітохондріального геному [23], також виявлено більшу подібність між *M. galloprovincialis* і *M. edulis*, у той час, як *M. coruscus* і *M. californianus* утворюють дещо відокремлений субкластер. Це узгоджується і з даними щодо терито-

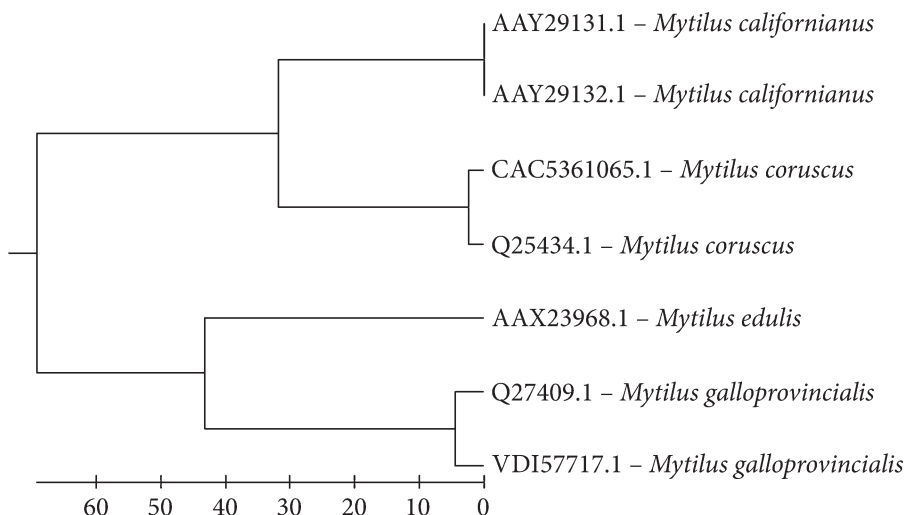


Рис. 3. Філогенетичне дерево, побудоване за методом UPGMA на основі генетичних дистанцій з урахуванням спорідненості між амінокислотними послідовностями адгезивного білка представників р. *Mytilus*

ріального розподілу цих видів. Саме *M. edulis* і *M. galloprovincialis* зустрічаються у Північній півкулі.

Висновки

За результатами молекулярно-генетичного аналізу серед досліджених чорноморських мідій поліморфізму гену адгезивного білка за сайтом, що обмежується комбінацією праймерів *Me 15 / Me 16*, виявлено не було. Досліджені поселення мідій з шести локацій північно-західного регіону Чорного моря складаються виключно з особин *M. galloprovincialis*. Їх генотипи є гомозиготними за геном адгезивного білка і характеризуються алелем 126 п. н. Таким чином, отримані результати не підтверджують присутність видів *M. trossulus* і *M. edulis* та їх гібридів з *M. galloprovincialis* у досліджених локаціях. У той же час підтверджено гібридизацію між *M. trossulus* і *M. edulis* у Балтійському морі. На основі даних філогенетичного аналізу за амінокислотними послідовностями адгезивного білка стопи мідій виявлено більшу спорідненість виду *M. galloprovincialis* з *M. edulis*, ніж з видами *M. californianus* і *M. coruscus*.

Автори висловлюють подяку завідувачу Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, к.б.н., доц. О.О. Ковтуну, к.б.н., с.н.с. С.М. Снігірьову (Регіональний міжвідомчий центр інтегрованого моніторингу і екологічних досліджень Одеського національного університету імені І.І. Мечникова), с.н.с., д.б.н. Ю.В. Квачу, ISSN 0375-8990. Гідробіологічний журнал. 2022. 58(1)

с.н.с., к.б.н. С.В. Стадніченко та м.н.с. О.П. Куракіну (Інститут морської біології НАН України) за вилов мідій, надання консультацій та обговорення результатів дослідження.

Список використаної літератури

1. Александрова О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В. Особенности глутатионпероксидной системы в тканях двухцветовых морф черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Экология моря*. 2001. Вып. 58. С. 22—26.
2. Варигин, А.Ю. Тенденция изменения фенотипической структуры популяции черноморской мидии в период формирования прибрежного сообщества обрастания. *Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія*. 2016. Вип. 41. С. 9—12
3. Наум, Е.А. Фильтрационная способность мидий разных фенотипов Одесского побережья Черного моря. *Вісн. Одеськ. нац. ун-ту. Сер. Біологія*. 2018. Т. 23, № 1. С. 47—54.
4. Стадниченко С.В., Золотарев В.Н. Популяционные характеристики мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) с разных биотопов Черного моря. *Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа*. Севастополь, 2012. Вып. 26. Том 1. С. 397—406.
5. Челядина Н.С. Фенотипическая и половая структура поселения мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam., культивируемой на внешнем рейде г. Севастополя (Крым, Чёрное море). *Морской биол. журн.* 2018. Том 3, № 3. С. 86—93.
6. Челядина Н.С., Попов М.А. Сравнительный анализ морфометрических характеристик мидии *Mytilus galloprovincialis* из различных районов обитания (Крым, Чёрное море). *Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация*. 2018. № 2. С. 264—269.
7. Челядина Н.С., Попов М.А., Поспелова Н.В., Смирнова Л.Л. Смена пола у черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 под влиянием тяжёлых металлов. *Морской биол. журн.* 2019. Т. 4, № 3. С. 104—106.
8. Шурова Н.М. Структурно-функціональна організація популяції мідій *Mytilus galloprovincialis* Чорного моря: автореф. дис. ... д-ра біол. наук. Севастополь, 2009. 32 с.
9. Шурова Н.М. Структурно-функціональна організація популяцій мидий *Mytilus galloprovincialis* Чорного моря. Киев: Наук. думка, 2013. 208 с.
10. Шурова Н.М., Стадниченко С.В. Фенотипическая пластичность мидий *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) в разных условиях среды Черного моря. *Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія*. 2016. Вип. 41. С. 77—80.
11. Boukadida, K., Mlouka, R., Clerandau, C. et al. Natural distribution of pure and hybrid *Mytilus* sp. along the south Mediterranean and North-east Atlantic coasts and sensitivity of D-larvae stages to temperature increases and metal pollution. *Sci. Tot. Environment*. 2021. Vol. 756. Art. 143675.
12. Coolen J.W.P. Marine stepping-stones: connectivity of *Mytilus edulis* populations between offshore energy installations. *Mol. Ecology*. 2020. Vol. 29, N 4. P. 686—703.
13. Crego-Prieto V., Ardura A., Juanes F. et al. Aquaculture and the spread of introduced mussel genes in British Columbia. *Biol. Invasions*. 2015. Vol. 17. P. 2011—2026.
14. Filpula D.R., Lee S.M., Link R.P. et al. Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. *Biotechnol. Pritg*. 1990. Vol. 6. P. 171—177.
15. Hamer B., Durmiši E., Nerlovic V., Bierne N. Recent taxonomic discoveries concerning the genus *Mytilus* in the Adriatic Sea. Implications for biomonitoring. *Rapp. Comm. int. Mer Medit*. 2013. Vol. 40. P. 772.
16. Hilbish, T.J., Carson, E.W., Plante, J.R. et al. Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England. *Mar. Biology*. 2002. Vol. 140. P. 137—142.
17. Inoue, K., Odo S., Noda T. et al. A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers. *Mar. Biol.* 1997. Vol. 128. P. 91—95.
18. Inoue, K., Waite, J.H., Matsuoka, M. et al. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*. *Biol. Bull.* 1995. Vol. 189. P. 370—375.

19. Kartavtsev, Y.P., Katolikova, M.V., Sharina, S.N. et al. A population genetic study of the hybrid zone of *Mytilus trossulus* Gould, 1850 and an introduced species, *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819, (Bivalvia: Mytilidae) in Peter the Great Bay in the Sea of Japan. *Russ. J. Mar. Biol.* 2014. Vol. 40. P. 208—216.
20. Knöbel, L., Nascimento-Schulze, J.C., Sanders, T. et al. Salinity driven selection and local adaptation in Baltic Sea Mytilid mussels. *Front. Mar. Sci.* 2021. Vol. 8. Art. 692078.
21. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biology and Evolution.* 2016. Vol. 33. P. 1870—1874.
22. 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. P. 1—13.
23. Lee, Y., Kwak, H., Shin, J. et al. A mitochondrial genome phylogeny of Mytilidae (Bivalvia: Mytilida). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2019. Vol. 139. Art. 106533.
24. Mathiesen, S.S., Thyrring J., Hemmer-Hansen J. et al. Genetic diversity and connectivity within *Mytilus* spp. in the subarctic and Arctic. *Evol. Appl.* 2017. Vol. 10. P. 39—55.
25. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 2000. 333 p.
26. Oyarzún, P.A., Toro, J.E., Cacete, J.I., Gardner, J. Bioinvasion threatens the genetic integrity of native diversity and a natural hybrid zone: smooth-shelled blue mussels (*Mytilus* spp.) in the Strait of Magellan. *Biol. J. Linn. Soc.* 2016. Vol. 117. P. 574—585.
27. Promega Technical Manual. Gene Print. STR Systems. 1999. Vol. 7. 52 p.
28. Rawson, P.D., Agrawal, V., Hilbish, T.J. Hybridization between the blue mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* along the Pacific coast of North America: evidence for limited introgression. *Mar. Biol.* 1999. Vol. 134. P. 201—211.
29. Riginos, C., Cunningham, C.W. Invited review: local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* × *Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Mol. Ecol.* 2005. Vol. 14. P. 381—400.
30. Saghai-Maroo M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1984. Vol. 81. P. 8014—8019.
31. Sneath P.H.A., Sokal, R.R. Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco, Freeman, 1973. 573 p.
32. Suchanek T.H., Geller J.B., Kreiser B.R., Mitton J.B. Zoogeographic distributions of the sibling species *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* (Bivalvia: Mytilidae) and their hybrids in the North Pacific. *Biol. Bull.* 1997. Vol. 193, N 2. P. 187—194.
33. Väinölä R., Hvilsum M.M. Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations (Mytilidae: Mollusca). *Biol. J. Linn. Soc.* 1991. Vol. 43. P. 127—148.
34. Väinölä R., Strelkov P. *Mytilus trossulus* in Northern Europe. *Mar. Biology.* 2011. Vol. 158. P. 817—833.
35. Wilhelm, R., Hilbish, T.J. Assessment of natural selection in a hybrid population of mussels: evaluation of exogenous vs endogenous selection models. *Mar. Biol.* 1998. Vol. 131. P. 505—514.
36. Wonham M.J. Mini-review: Distribution of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) and hybrids in the Northeast Pacific. *J. Shellfish Res.* 2004. Vol. 23, N 2. P. 535—543.

Надійшла 15.11.2021

I. Chubik, PhD student,
Odessa I.I. Mechnikov National University,
Dvoryanskaya str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
e-mail: inna_chubik@ukr.net
ORCID 0000-0002-1443-7778

G. Chebotar, PhD (Biol.), Associated professor
Odessa I.I. Mechnikov National University,
Dvoryanskaya str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
e-mail: gchebotar@gmail.com
ORCID 0000-0002-7465-4678

A. Bick, Dr. Sci.,
Rostock University,
University Square 2, Rostock, 18055, Germany
e-mail: andreas.bick@uni-rostock.de
ORCID 0000-0003-2356-6106

S. Chebotar, Dr. Sci., Prof.
Odessa I.I. Mechnikov National University,
Dvoryanskaya str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua
ORCID 0000-0002-9130-7272

SPECIES AFFILIATION OF THE MUSSELS OF THE NORTH-WESTERN BLACK SEA REGION BASED ON THE MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS

The genotypes of mussels from six locations in the North-Western region of the Black Sea were analyzed using the diagnostic marker *Me 15-16* to the adhesive protein gene in order to establish the species affiliation of mussel settlements. The molecular genetic marker *Me 15-16* used in our work allowed to detect only *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 in the locations of the Black Sea. Studied mussels (171 specimens) were characterized by an amplification fragment 126 bp, that corresponds to the species *M. galloprovincialis*. We have also detected *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, *Mytilus trossulus* Gould, 1850 and their hybrids that were characterized by 168 bp and 180 bp alleles in the Baltic Sea (location G).

Phylogenetic analysis of the amino acids sequences of adhesive proteins showed higher relatedness of *M. galloprovincialis* and *M. edulis*, than for species *M. californianus* and *M. coruscus*.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, molecular marker, *Me 15-16*, adhesive protein, phylogenetic analysis.