

## Унікальність концепції виду в молюсків роду *Corbicula* через невідповідність мітохондріального та ядерного геномів

Галина М. Моргун<sup>1\*</sup>, Михайло О. Сон<sup>2</sup>, Сергій Ю. Утевський<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна (Харків)

<sup>2</sup>Інститут морської біології НАН України (Одеса)

\*e-mail: [halynamorghun94@gmail.com](mailto:halynamorghun94@gmail.com); orcid: 0000-0002-7888-477X

**MORHUN, H.\*, SON, M. O., UTEVSKY, S. Unique issues of the species concept in molluscs of the genus *Corbicula*: a mismatch of mitochondrial and nuclear genomes.** — Molluscs of the genus *Corbicula* are well-known invasive bivalves found all over the world. These ecologically important clams are characterised by a wide range of habitats (both brackish waters and freshwater environments) and by contrasting modes of reproduction in native ranges (including sexual and asexual modes) and in invasive ranges (asexual mode). The asexual freshwater *Corbicula* reproduces through androgenetic fertilization, also termed “egg parasitism”, where the oocyte nucleus is replaced by the spermatozoon nucleus, yet the mitochondria are inherited from the mother cell. This results in a mismatch between the genetic material of the nucleus and mitochondria (and, accordingly, with the external morphology of the shell). In addition, the low nucleotide diversity in the genus *Corbicula* challenges the delimitation of separate species, thus it is difficult to apply the traditional taxonomic and phylogenetic species criteria to *Corbicula* populations.

### Вступ

Одними з найпоширеніших і найважливіших інвазивних двостулкових молюсків у світі є представники роду *Corbicula* (McMahon 2002; Darrigran *et al.* 2002; Illari *et al.* 2012). Успіх всесвітньої інвазії корбікул пов’язаний із деякими їхніми біологічними особливостями, як-от швидким ростом, різними репродуктивними стратегіями, ранньою статевою зрілістю, короткою тривалістю життя, високою плодючістю, здатністю до заселення різноманітних субстратів, а також певним місцем у харчовій культурі людини (McMahon 2002; Karatayev *et al.* 2007; Sousa *et al.* 2008; Gomes *et al.* 2016). Крім того, їхня здатність до статевого розмноження в нативних регіонах (Siripattawan *et al.* 2000; Glaubrecht *et al.* 2003; Korniushev 2004) і до безстатевого (андрогенного) розмноження як у нативних регіонах, так і під час інвазій (Glaubrecht *et al.* 2003; Hedtke *et al.* 2008) збільшує їхні репродуктивні можливості, у такий спосіб сприяючи високому інвазивному потенціалу.

Незважаючи на великий інтерес дослідників до цих молюсків через їхній інвазивний потенціал, досі залишається недостатньо ясною таксономія роду *Corbicula*. Серед дослідників цієї групи не було єдності стосовно кількості валідних видів роду. Наприклад, у Китаї виділяють від шести видів (Prashad 1929) до двох (Morton 1986); в Африці поширений тільки вид *C. fluminalis*

(Morton 1986) або існують нативні види *C. africana* (F. Krassus, 1848) та *C. consorbina* (Cailiaud, 1823); у Японії — тільки *C. fluminea* (Morton 1986) або чотири окремі види: *Corbicula fluminea* Muller 1774, *Corbicula japonica* Prime, 1864, *Corbicula leana* Prime, 1864 і *Corbicula sandai* Reinhardt 1887 (Habe, 1977).

### Проблеми таксономії роду *Corbicula*

В першу чергу, складнощі таксономічної ідентифікації цих моллюсків пов'язані з їхнім великим морфологічним розмаїттям, а також із неможливістю генетично розділити різні види корбікул через низьку нуклеотидну різноманітність (Etoundi *et al.* 2019; Hedtke *et al.* 2008, 2011; Pigneur *et al.* 2012, 2014). Згодом ці складнощі в делімітації видів спонукали багатьох авторів (Pigneur *et al.* 2011b, 2014; Hedtke, Hillis, 2011; Hedtke *et al.* 2011) перейти від поняття «вид» у таксономії корбікул до понять «лінія», «форма» і «морфа» (Peñarrubia *et al.* 2017, Bernal *et al.* 2018, Etoundi *et al.* 2019). Крім того, необхідність ідентифікувати в регіонах інвазії нові невідомі лінії / форми / морфи корбікул, які стали повсюдно з'являтися, призвела до виникнення їхніх тимчасових назв, які не є ані латинізованими, ані біноміальними, наприклад «Сідлоподібна форма», «Кругла форма» тощо (Mouthon 2000, Pfenninger *et al.* 2002).

Безлад у таксономії пояснюється ще й тим, що назви цих морф варіюють у різних регіонах. Наприклад, американські автори використовують назви «форма А», «В», «С» і «D» (Lee *et al.* 2005; Tiemann *et al.* 2017), водночас у Європі оперують термінами «форма R», «R1c», «S» (Mouthon 2000; Pfenninger *et al.* 2002; Marescaux *et al.* 2010).

Здавалося б, достатньо просто співвіднести морфологію й назви та виявити синоніми, проте молекулярні дані показують невідповідність гаплотипів різних ліній їхнім морфотипам. Ця таксономічна плутанина розглядається детальніше нижче і є наслідком андрогенетичної стратегії розмноження корбікул.

### Особливості репродуктивних стратегій корбікул

Андрогенез у моллюсків роду *Corbicula* в регіонах інвазії є унікальним. Його суть полягає в тому, що сперматозоїди однієї лінії моллюсків можуть запліднити яйцеклітину іншої лінії й таким чином викликати явище, відоме як «яйцеклітинний паразитизм» (egg parasitism) або «захоплення мітохондріального геному» (mitochondrial genome capture) — поєднання ядерного геному першої лінії з мітохондріальним геномом другої лінії, що призводить до цитоядерних невідповідностей. Отже, материнський ядерний геном другої лінії буде видалений з яйцеклітини, водночас ядерний геном батька залишиться, а материнський цитоплазматичний геном стане захопленим (Lee *et al.* 2005; Рисунок 2). Це явище досліджувалось як в нативних регіонах (Park 2003; Lee *et al.* 2005; Hedtke *et al.* 2008), так і в регіонах інвазії (Pigneur *et al.* 2011a, 2011b, 2012, 2014).

Слід зазначити, що така цитоплазматично-ядерна невідповідність унаслідок «паразитизму» може швидко поширитися й зафіксуватися в популяції (Hedtke & Hillis 2011; Pigneur *et al.* 2012), особливо завдяки високій плодючості корбікул і їхній здатності розмножуватися самоzapлідненням.

Ба більше, андрогенетичні лінії роду *Corbicula* мають здатність ще й до гібридизації (Komaru *et al.* 2006), яка також є результатом їхнього унікального андрогенетичного розмноження (Komaru *et al.* 1998; Ishibashi *et al.* 2002; Ishibashi & Komaru 2006; Ishibashi *et al.* 2003). Різні дослідники продемонстрували, що криптичні лінії *Corbicula* можуть бути диплоїдними, триплоїдними і, навіть, тетраплоїдними, як це виявилось для популяцій у Тайвані, Японії, Китаї та Польщі (Skuzza *et al.* 2009, Ishibashi *et al.* 2003; Komaru & Konishi, 1999; Park *et al.* 200; Qui *et al.* 2001). Такі корбікули здатні продукувати сперматозоїди з незменшеним (нередукованим) набором хромосом (тобто диплоїдні) і з кількістю ДНК у ядрі як у соматичних клітинах та використовувати ці хромосоми для розмноження (Komaru *et al.* 1997; Komaru & Konishi, 1999; Ishibashi *et al.* 2003). Диплоїдний сперматозоїд («unreduced sperm») здатен або (1) запліднювати ооцит, унаслідок чого відбувається злиття двох ядер статевих клітин, або ж (2) може видалити материнське ядро з ооцита («яйцеклітинний паразитизм»). У першому випадку, якщо гаплоїдна яйцеклітина запліднюється диплоїдним сперматозоїдом, утворюється триплоїдний зародок (Komaru *et al.* 2001, 2006). Отже, за цим сценарієм, виникають молюски з нетиповою кількістю хромосом — триплоїдна зигота поєднує ядерний геном, який походить з ооцитів і сперматозоїдів, і мітохондріальний, який походить із цитоплазми ооцитів. Однак, за іншим сценарієм андрогенезу — елімінації материнського ядра з ооцита («яйцеклітинний паразитизм») — виникає зигота з ядром, отриманим тільки зі сперматозоїду, який мав нередукований набір хромосом. Мітохондрії в цитоплазмі мають завжди материнське походження.

Внаслідок такого унікального способу розмноження й цих «невідповідностей» ідентифікація певних морфотипів *Corbicula* за допомогою сучасних молекулярних методів баркодингу є проблематичною, оскільки результати аналізу мітохондріальних маркерів можуть не збігатися з результатами, отриманими для ядерних генів і, відповідно, для зовнішньої морфології молюсків (Komaru *et al.* 2012; Peñarrubia *et al.* 2017).

### Результати досліджень філогенії роду *Corbicula*

Виявлені філогенетичні відносини андрогенетичних корбікул за мітохондріальними генами показали три або чотири поліфілетичні групи андрогенетичних ліній. Такі результати отримували як і раніше (Lee *et al.* 2005; Glaubrecht *et al.* 2006; Hedtke *et al.* 2008; Pigneur *et al.* 2011b, 2012), так і в більш сучасних дослідженнях (Gomes *et al.* 2016; Etoundi *et al.* 2019; Wang *et al.* 2020). Серед цих поліфілетичних груп спостерігається низька генетична різноманітність, що може бути пов'язано з андрогенною репродуктивною стратегією (Pigneur *et al.* 2014).

Використання тільки мітохондріальних маркерів для вивчення філогенетики корбікул не може виявити таксономічний статус прісноводних ліній у роді *Corbicula*, і, навіть більше, такі результати можуть стати «пасткою», яка призводить до об'єднання ядерних ліній, які насправді не є спорідненими (Park & Kim 2003; Lee *et al.* 2005; Hedtke *et al.* 2008; Pigneur *et al.* 2011b). Слід застосовувати одночасно як ядерні, так і мітохондріальні послідовності, що дозволить з'ясувати еволюційні зв'язки андрогенетических ліній *Corbicula*.

Отже, аналіз ядерних та мітохондріальних маркерів надає наступну інформацію про еволюційні відносини між інвазивними видами. Американська «форма А» і європейська «форма R» мають однаковий мітохондріальний гаплотип і ядерний генотип (Hedtke *et al.* 2011; Pigneur *et al.* 2011a, Gomes *et al.* 2016). Американська «форма В» і європейська «форма Rlc» (з річки Рона, Нідерланди) належать до однієї мітохондріальної лінії, але вони мають різну морфологію та належать до різних ядерних генотипів (Hedtke & Hillis 2011; Pigneur *et al.* 2011a). Американська «форма С» і європейська «форма S» є різними морфотипами, але вони характеризуються одним мітохондріальним гаплотипом та послідовністю ядерної ДНК (Hedtke & Hillis 2011). Вочевидь, для останньої форми морфологічні відмінності є наслідком фенотипічної пластичності, тобто вони не зумовлені різними ядерними генотипами (Pigneur *et al.* 2012).

Досить складне виявлення філогенії за допомогою аналізу послідовностей ДНК може бути пов'язане з браком молекулярних даних або з недавнім розходженням ліній *Corbicula* (Glaubrecht *et al.* 2006; Hedtke *et al.* 2011). Варто відзначити, що мікросателітні маркери, розроблені Pigneur *et al.* (2011a), можуть бути корисні для виявлення еволюційних відносин всередині *Corbicula* і таким чином прояснити таксономію роду.

Слід зазначити, що невідповідність мітохондріальних маркерів і морфологічних ознак, що корелюють із ядерними маркерами, відома не тільки для андрогенетичних видів. Наприклад, для азійських прісноводних Viviparidae це пояснюється інтрогресивною гібридизацією (Hirano *et al.* 2019). Однак, для видів зі статевим розмноженням це є лише методологічною проблемою філогеномного аналізу, що не зачіпає саму концепцію виду. У випадку андрогенетичних *Corbicula* це ставить питання: чи слід враховувати цитоплазматичну спадковість, пов'язану з органелами, у контексті походження й окремості виду, або до неї треба ставитися так, як, наприклад, до геному цитоплазматичних вірусів і ендосимбіонтів? Це має особливе значення в разі застосування філогенетичних концепцій виду.

## Література

- Bespalaya, Y. V., I. N. Bolotov, O. V. Aksenova, A. V. Kondakov, M. Y. Gofarov, T. M. Laenko, S. E. Sokolova, A. R. Shevchenko, O. V. Travina. 2018. Aliens are moving to the Arctic frontiers: an integrative approach reveals selective expansion of androgenic hybrid *Corbicula* lineages towards the North of Russia. *Biological Invasions*, **20** (8): 2227–2243.

- Darrigran, G. 2002. Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biological Invasions*, **4**: 145–156.
- Etoundi, E., J. Marescaux, M. Vastrade, N. Debortoli, S.M. Hedtkke, L.-M. Pigneur, J. Virgo, J.-F. Flot, K. Van Doninck. 2019. Distinct biogeographic origins of androgenetic *Corbicula* lineages followed by genetic captures. *BioRxiv*, 590836.
- Glaubrecht, M., T. von Rintelen, A. V. Korniusshin. 2003. Toward a systematic revision of brooding freshwater Corbiculidae in southeast Asia (Bivalvia, Veneroidea): on shell morphology, anatomy and molecular phylogenetics of endemic taxa from islands in Indonesia. *Malacologia*, **45**: 1–40.
- Glaubrecht, M., Z. Fehér, T. von Rintelen. 2006. Brooding in *Corbicula madagascariensis* (Bivalvia, Corbiculidae) and the repeated evolution of viviparity in corbiculids. *Zoologica Scripta*, **35**: 641–654.
- Gomes, C., R. Sousa, T. Mendes, R. Borges, P. Vilares, V. Vasconcelos, L. Guilhermino, A. Antunes. 2016. Low genetic diversity and high invasion success of *Corbicula fluminea* (Bivalvia, Corbiculidae) (Müller, 1774) in Portugal. *PLoS ONE*, **11** (7): e0158108.
- Habe, T. 1977. *Systematics of Mollusca in Japan*. Bivalvia and Scaphopoda. Tokyo, 1–372.
- Hedtkke, S. M., K. Stanger-Hall, R. J. Baker, D. M. Hillis. 2008. All-male asexuality: origin and maintenance of androgenesis in the Asian clam *Corbicula*. *Evolution*, **62** (5): 1119–1136.
- Hedtkke, S. M., D. M. Hillis. 2011. The Potential Role of Androgenesis in Cytoplasmic–Nuclear Phylogenetic Discordance. *Systematic Biology*, **60** (1): 87–96.
- Hirano, T., T. Saito, Y. Tsunamoto, J. Koseki, B. Ye, V. T. Do, O. Miura, Y. Suyama, S. Chiba. 2019. Enigmatic incongruence between mtDNA and nDNA revealed by multi-locus phylogenomic analyses in freshwater snails. *Scientific Reports*, **9**: 6223.
- Illari, M.I., F. Freitas, S. Costa-Dias, C. Antunes, L. Guilhermino, R. Sousa. 2012 Associated macrozoobenthos with the invasive Asian clam *Corbicula fluminea*. *Journal of Sea Research*, **72**: 113–120.
- Ishibashi, R., A. Komaru, K. Ookubo, M. Kiyomoto. 2002. The second meiosis occurs in cytochalasin d-treated eggs of *Corbicula leana* even though it is not observed in control androgenetic eggs because the maternal chromosomes and centrosomes are extruded at first meiosis. *Developmental Biology*, **244** (1): 37–43.
- Ishibashi, R., K. Ookubo, M. Aoki, M. Utaki, A. Komaru, K. Kawamura. 2003. Androgenetic Reproduction in a Freshwater Diploid Clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *Zoological Science*, **20** (6): 727–732.
- Ishibashi, R., A. Komaru. 2006. Abortive second meiosis detected in cytochalasin-treated eggs in androgenetic diploid *Corbicula fluminea*. *Development, Growth and Differentiation*, **48** (4): 277–282.
- Karatayev, A. Y., D. K. Padilla, D. Minchin, D. Boltovskoy, L. E. Burlakova. 2007. Changes in global economies and trade: the potential spread of exotic freshwater bivalves. *Biological Invasions*, **9**: 161–180.
- Komaru, A., K. Konishi, I. Nakayama, T. Kobayashi, H. Sakai, K. Kawamura. 1997. Hermaphroditic Freshwater Clams in the Genus *Corbicula* Produce Non-Reductional Spermatozoa with Somatic DNA Content. *The Biological Bulletin*, **193** (3): 320–323.
- Komaru, A., T. Kawagishi, K. Konishi. 1998. Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime. *Development Genes and Evolution*, **208** (1): 46–50.
- Komaru, A., K. Konishi. 1999. Non-reductional Spermatozoa in Three Shell Color Types of the Freshwater Clam *Corbicula fluminea* in Taiwan. *Zoological Science*, **16** (1): 105–108.
- Komaru, A., K. Ookubo, M. Kiyomoto. 2000. All meiotic chromosomes and both centrosomes at spindle pole in the zygotes discarded as two polar bodies in clam *Corbicula leana*: unusual polar body formation observed by antitubulin immunofluorescence. *Development Genes and Evolution*, **210** (5): 263–269.
- Komaru, A., A. Kumamoto, T. Kato, R. Ishibashi, M. Obata, T. Nemoto. 2006. A hypothesis of ploidy elevation by formation of a female pronucleus in the androgenetic clam *Corbicula fluminea* in the Tone river estuary, Japan. *Zoological Science*, **23** (6): 529–532.
- Komaru, A., S. Houki, M. Yamada, T. Miyake, M. Obata, K. Kawamura. 2012. 28S rDNA haplotypes of males are distinct from those of androgenetic hermaphrodites in the clam *Corbicula leana*. *Development Genes and Evolution*, **222** (3): 181–187.

- Lee, T., S. Siripattawan, C. F. Ituarte, D. Ó. Foighil. 2005. Invasion of the clonal clams: *Corbicula* lineages in the New World. *American Malacological Bulletin*, **20** (1–2): 113–122.
- Marescaux, J., L.-M. Pigneur, K. Van Doninck. 2010. New records of *Corbicula* clams in French rivers. *Aquatic Invasions*, **5** (Supplement 1): S35–S39.
- McMahon, R. F. 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **59**: 1235–1244
- Morton, B. 1986. *Corbicula* in Asia — an updated synthesis. *American Malacological Bulletin, Special Edition 2*: 113–124.
- Mouthon, J. 2000. Répartition du genre *Corbicula* Megerle von Mühlfeld (Bivalvia: Corbiculidae) en France à l'aube du XXI siècle. *Hydroécologie Appliquée*, **12**(1–2): 135–146.
- Park, J.-K., S. J. Lee, W. Kim. 2002. A single mitochondrial lineage is shared by morphologically and allozymatically distinct freshwater *Corbicula* clones. *Molecules and Cells*, **14**: 318–322.
- Park, J., W. Kim. 2003. Two *Corbicula* (Corbiculidae: Bivalvia) mitochondrial lineages are widely distributed in Asian freshwater environment. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29** (3): 529–539.
- Peñarrubia, L., R.-M. Araguas, O. Vidal, C. Pla, J. Viñas, N. Sanz. 2017. Genetic characterization of the Asian clam species complex (*Corbicula*) invasion in the Iberian Peninsula. *Hydrobiologia*, **784** (1): 349–365.
- Penninger, M., F. Reinhardt, B. Streit. 2002. Evidence for cryptic hybridization between different evolutionary lineages of the invasive clam genus *Corbicula* (Veneroidea, Bivalvia). *Journal of Evolutionary Biology*, **15** (5): 818–829.
- Pigneur, L.-M., A.-M. Risterucci, N. Dauchot, X. Li, K. Van Doninck. 2011a. Development of novel microsatellite markers to identify the different invasive lineages in the *Corbicula* complex and to assess androgenesis. *Molecular Ecology Research*, **11**: 573–577.
- Pigneur, L.-M., J. Marescaux, K. Roland, E. Etoundi, J.-P. Descy, K. Van Doninck. 2011b. Phylogeny and androgenesis in the invasive *Corbicula* clams (Bivalvia, Corbiculidae) in Western Europe. *BMC Evolutionary Biology*, **11**: 147.
- Pigneur, L.-M., S.M. Hedtko, E. Etoundi, K. Van Doninck. 2012. Androgenesis: a review through the study of the selfish shellfish *Corbicula* spp. *Heredity*, **108** (6): 581–591.
- Pigneur, L.-M., E. Etoundi, D. C. Aldridge, J. Marescaux, N. Yasuda, K. Van Doninck. 2014. Genetic uniformity and long-distance clonal dispersal in the invasive androgenetic *Corbicula* clams. *Molecular Ecology*, **23** (20): 5102–5116.
- Prashad, B. 1929. Revision of the Asiatic species of the genus *Corbicula*. III. The species of the genus *Corbicula* from China, south-eastern Russia, Thibet, Formosa and the Philippine Islands. *Memoirs Indian Museum*, **9**: 49–68.
- Qiu, A., A. Shi, A. Komaru. 2001. Yellow and brown shell colour morphs of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) from Sichuan Province, China, are triploids and tetraploids. *Journal of Shellfish Research*, **20**: 323–328.
- Skuza, L., A. M. Labecka, J. Domagala. 2009. Cytogenetic and Morphological Characterization of *Corbicula fluminalis* (O. F. Müller, 1774) (Bivalvia: Veneroidea: Corbiculidae): Taxonomic Status Assessment of a Freshwater Clam. *Folia Biologica*, **57** (3): 177–185.
- Sousa, R., C. Antunes, L. Guilhermino. 2008. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales de Limnologie — International Journal of Limnology*, **44** (2): 85–94.
- Tiemann, J. S., A. E. Haponski, S. A. Douglass, T. Lee, K. S. Cummings, M. A. Davis, D. Ó. Foighil. 2016. First record of a putative novel invasive *Corbicula* lineage discovered in the Illinois River, Illinois, USA. *BioInvasions Records*, **6**: 159–166.
- Wang, W., X. Liu, N. Ferreira-Rodríguez, W. Sun, Y. Wu, S. Ouyang, C. Zhou, X. Wu. 2020. Demographic and genetic characterization of harvested *Corbicula fluminea* populations. *PeerJ*, **8**: e9657.

## Резюме

**МОРГУН, Г. М., СОН, М. О., УТЕВСЬКИЙ, С. Ю. Унікальність концепції виду в молюсків роду *Corbicula* через невідповідність мітохондріального та ядерного геномів.** — Представники роду *Corbicula* — добре відомі інвазивні двостулкові молюски, які поширені по всьому світу. Їх вивчення становить інтерес для екології та еволюційної біології з огляду на те, що ці молюски характеризуються широким колом можливих оселищ (як солонуваті, так і прісні водойми), та різноманітними способами розмноження в нативному (статевий і безстатевий способи) та інвазивному (безстатевий спосіб) ареалі. Прісноводні корбікули розмножуються за допомогою андрогенетичного запліднення, яке ще також називають «яйцеклітинним паразитизмом»: ядро яйцеклітини замінюється ядром сперматозоїдів, а мітохондрії мають материнське походження. Це призводить до невідповідності генетичного матеріалу ядра з одного боку й мітохондріального геному та зовнішньої морфології мушлі з іншого. Крім того, низька нуклеотидна різноманітність у роді *Corbicula* ускладнює делімітацію окремих видів, через що важко застосувати традиційні таксономічні й філогенетичні критерії виду до цієї групи молюсків.