

АНОТАЦІЯ

Березкіна А. Є. Популяційна структура та ресурси черевоногого молюска *Nacella concinna* (Strebel, 1908) у прибережних водах Української антарктичної станції «Академік Вернадський», архіпелаг Аргентинські острови, Західна Антарктика. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (Галузь знань 09 – Біологія). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків 2021.

У дисертації розкрито нові дані щодо структури популяції черевоногого молюска *N. concinna* для цілої острівної системи Аргентинських островів, Західна Антарктика. Встановлено закономірності розповсюдження молюска в дослідженій акваторії з урахуванням морфологічної та генетичної структури популяції. Реконструйовано філогенію представників роду *Nacella* і можливі регіони походження і шляхи поширення. Визначено роль молюска в антарктичних екосистемах, дані про ресурси та можливість його використання як індикатора стану навколишнього середовища.

Виявлено три морфотипи *N. concinna* з різною скульптурою раковини в акваторії Української антарктичної станції «Академік Вернадський»: перший морфотип – раковина з гладкою глянцевою темною поверхнею, другий – класична форма з чіткими радіальними ребрами, третій – з концентричними кільцями та білою вершиною раковини. Встановлено, що морфотипи не відрізняються за морфометричними показниками, не мають генетичної диференціації, що свідчить про приналежність трьох морфотипів *N. concinna* до одного виду.

За допомогою неруйнуючого аналізу популяції *N. concinna* в акваторії архіпелагу Вільгельма розраховано основні морфометричні показники. Вага молюска розраховувалася за розробленими формулами. Встановлено залежності довжини, ширини раковини, ваги молюска, щільності популяції від глибини, а також кореляції між щільністю популяції *N. concinna*, довжиною раковини і вагою молюска на різних трансектах. Встановлено відсутність видимих закономірностей розподілу молюска за глибинами, морфометричними параметрами раковини

(довжина, ширина) та вагою молюска. Показано, що правило Фостера, щодо залежності морфометричних характеристик від об'єму харчових ресурсів, не виконується на деяких досліджених ділянках підводних ландшафтів.

Досліджені трансекти відрізняються за показниками щільності популяції, однак загальна тенденція прослідковується, а саме – зі збільшенням глибини, щільність популяції зменшується.

Різні розмірні класи молюска представлені на всіх досліджених глибинах (1 м, 5 м, 10 м, 15 м) на 8 трансектах протоки Meek, Stella Creek та акваторії мису Marina Point. Поділ популяції молюска на літоральний та субліторальний морфотипи не підтверджений для акваторії Архіпелагу Вільгельма. Різна скульптура раковини, ймовірно, є результатом фенотипової пластичності. Очевидно, морфологія раковин і вага *N. concinna* залежить від рельєфу дна, доступу до харчування (кількості водоростей) та хвильової активності на кожній досліджуваній трансекті. Досліджений молюск заселяє всі доступні підводні ландшафти і становить багатий біологічний ресурс в даній акваторії. Перерахована біомаса молюсків на дослідженій ділянці акваторії Meek Channel площею 9096 м² становить 1,2 т (1215 кг), на дослідженій ділянці акваторії Marina Point площею 3982 м² становить 0,6 т (642 кг), а на дослідженій ділянці акваторії в протоці Stella Creek площею 1969 м² – 0,43 т (430 кг).

Молекулярно-філогенетичний аналіз за фрагментами генів *12S*, *16S*, *CO1* та *28S* показав належність трьох морфотипів антарктичного лімпета з різною морфологією раковини до одного виду *N. concinna* в акваторії архіпелагу Вільгельма. Різні філогенетичні реконструкції продемонстрували близькі зв'язки *N. concinna* та інших нацеллід з Patellogastropoda тропічних та помірних вод Південної півкулі, зокрема з видами роду *Cellana* (*C. capensis*, *C. solida*, *C. taitensis*, *C. pricei*, *C. tramoserica* та інших). Показано, що нацелліди є автохтонами Антарктики.

Реконструкція філогенії Patellogastropoda за фрагментом мітохондріального гену *12S* показало приналежність трьох морфотипів до одного виду *N. concinna*. Досліджені молюски мають генетичну спорідненість з іншими представниками

нацеллід, зокрема мешканцями акваторії Південної Америки і формують з ними монофілетичну кладу з бутстрепом 99: *N. clypeater*, *N. magellanica*, *N. deaurata*, *N. mytilina*. *N. clypeater*, *N. magellanica* з чилійського узбережжя (Тихий океан) і узбережжя Вогняної Землі відповідно, утворюють окрему субкладу. Рід *Nacella* об'єднується з бутстрепом 99 з сестринською кладою роду *Cellana*, що є представниками помірних та тропічних океанічних вод. Цей рід зустрічається в помірних і тропічних Індо-Тихому океанах, на Гавайях, навколо Австралії і Нової Зеландії. Види також зустрічаються навколо берегів Японії, Червоного моря, Маврикія, Мадагаскару, Південної Африки і субантарктичних островів. Вид *C. capensis* населяє Індо-Тихоокеанський регіон, в основному біля берегів Австралії. Представник *C. solida* поширений у східній частині Індійського океану, а також біля узбережжя Австралії. *C. taitensis* мешкає вздовж берегів Французької Полінезії та островів Піткерн. Ці два роди утворюють єдину монофілетичну кладу, яка є сестринською з невеликим бутстрепом 54 до монофілетичної класи, до складу якої входять представники родів *Scutellastra*, *Helcion*, *Cymbula*. Представники цієї класи поширені в басейні Атлантичного океану від берегів Норвегії до Південної Африки. Представники роду *Patella* утворили монофілетичну кладу з бутстрепом 99. Рід поширений на атлантичному узбережжі Європи.

Приналежність виявлених трьох морфотипів до одного виду *N. concinna* показано за результатами філогенетичного аналізу по фрагменту мітохондріального гену *16S*. Досліджена вибірка видів поділилась на дві сестринські субклади першого порядку з бутстрепом 100. Перша сестринська класи першого порядку поділяється на дві сестринські субклади другого порядку з бутстрепом 99. До першої класи з бутстрепом 100, увійшли представники антарктичного роду *Nacella* і індотихоокеанського роду *Cellana*, які сформували відповідні класи третього порядку. Всі три морфотипи *N. concinna*, позначені як b1, b2, b3, належать до одного виду *N. concinna*. Другий і третій морфотипи об'єднуються в одну кладу разом із *N. concinna*, зібраного біля берегів Signy Island. *N. deaurata* з тихоокеанського узбережжя Чилі обіймає базальне положення

в цій кладі, у той самий час *N. magellanica* з того самого регіону виявляється «наймолодшим» елементом в цій групі разом із *N. mytilina*.

Реконструкція філогенетичного дерева різних морфотипів *N. concinna* за консервативним мітохондріальним фрагментом гену *COI*, показала приналежність досліджених зразків до одного виду. Всі представники виду *Nacella concinna* об'єдналися у єдину кладу з бутстрепом 100. Досліджені екземпляри мали генетичну спорідненість з іншими нацеллідами: південноамериканською *N. magellanica* та видами *N. delesserti*, *N. aff. mytilina*, *N. kerguelensis*, *N. macquariensis*, *N. terroris*, *N. edgari* з акваторій субантарктичних островів. Інші представники роду *Nacella* утворили окремі клади відповідно до їх географічного поширення. На дереві ми спостерігаємо дві великі сестринські субклади з бутстрепом 100. Перша субклада 1-го порядку включає представників родів *Iothia*, *Tectura*, *Cellana*. Представники роду *Tectura* утворили окрему субкладу в межах кладу *Iothia* з бутстрепом 85, що потребує подальших філогенетичних і таксономічних досліджень. Варто відзначити, що види *Iothia*, *Tectura*, що сформували єдину кладу, демонструють біполярне поширення. Глибоководний вид *Iothia megalodon*, що поширена від середніх широт тихоокеанського узбережжя Чилі до протоки Бігль, посів базальне положення. Філогенетичний зв'язок з нею демонструє циркумантарктичний вид *Iothia emarginuloides*. *Iothia fulva* з північно-атлантичного узбережжя Британських островів і Норвегії утворює з попереднім видом сестринську кладу, але з невеликим бутстрепом – 55. Сестринську кладу з бутстрепом 77 з попередніми двома видами утворюють представники роду *Tectura*. Цей рід також демонструє біполярне поширення і вважається синонімом - *Iothia (Tectura) coppingeri*. *Tectura virginea* поширена від Північного до Середземного моря, *Tectura fenestrata* – на тихоокеанському узбережжі Аляски, *Tectura testudinalis* – у Канадській Арктиці і Гренландії. Досліджені представники роду *Tectura* утворюють монофілетичну кладу з бутстрепом 96. Клада «*Cellana*» є монофілетичною і включає виключно представників роду *Cellana*. Представники роду широко поширені на узбережжі Індійського океану від Африки до Індокитаю, навколо Австралії і Нової Зеландії, і

далі сягають Японських островів. Клада «*Iothia, Cellana, Tectura*» займає базальне положення відносно клади «*Nacella*». Друга сестринська субклада 1-го порядку утворена виключно представниками роду *Nacella*. Монофілетична клада «*Nacella*» включає кілька субклад. Перша базальна субклада 2-го порядку утворена виключно видом *N. kerguelensis*, поширеним виключно в акваторії субантарктичного острова Кергелен. Друга субклада 2-го порядку складається з субклади 3-го порядку, що утворена видом *Nacella concinna*, що поширений біля берегів Антарктичного півострову. Базальна субклада 3-го порядку включає представників з субантарктичних островів – *N. terroris*, *N. edgari*, *N. macquariensis*. Ця субклада займає базальне положення. Друга субклада 3-го порядку включає: субкладу, що утворена видом *N. clypeater* з тихоокеанського узбережжя Чилі; субкладу, що утворена *N. deaurata*, *N. fuegiensis*, *N. magellanica*, *N. mytilina* з берегів Південної Америки. *N. mytilina* відзначено з тихоокеанського узбережжя Чилі, Патагонії, атлантичного узбережжя Аргентини.

Реконструкцію філогенії *N. concinna* за консервативним ядерним геном 28S у програмі IQtree методом maximum-likelihood (консенсусне дерево виведене з 10000 генерацій) з розрахунком бутстрепа за байєсівським протоколом на базі 56 послідовностей з сервісу ncbi. У якості аутгрупи використано представника ветігастропода *Lepetella*. Клади 1-го порядку утворились з бутстрепом 70. До однієї клади увійшли представники родів *Scutellastra*, *Tectura*, *Patelloida*, *Patella* (бутстреп 51). При цьому представники роду *Tectura* не утворили монофілетичну кладу. До сестринської субклади увійшли представники родів *Cellana*, *Nacella* (бутстреп 44). Ця субклада поділяється на клади другого порядку з незначним бутстрепом 44, що свідчить про давність цього процесу. Два роди *Cellana*, *Nacella* утворюють монофілетичні сестринські субклади другого порядку. Клада «*Cellana*» має бутстреп 96, клада «*Nacella*» - бутстреп 97, що підтверджує монофілетичність цих родів. Дві сестринські субклади «*Nacella*» 3-го порядку з бутстрепом 94 сформовані наступним чином. Першу субкладу з бутстрепом 95 утворили *N. clypeater*, *N. mytilina*, *N. deaurata*, *N. flammea*, *N. magellanica*. *N. clypeater* з тихоокеанського узбережжя Чилі займає базальне положення у цій

субкладі. Підпорядковане положення займає *Nacella mytilina*, що поширена в акваторії Вогняної Землі, прилеглих тихоокеанському і атлантичному узбережжях Південної Америки, Фолклендах, о. Маріон. Далі *Nacella deaurata*, ареал якої охоплює ті ж самі райони, Антарктичний півострів, а також більшість субантарктичних островів і о. Кемпбелл на 50-й паралелі. *Nacella flammea*, *Nacella magellanica* утворили монофілетичну кладу. Перший вид поширений на островах Вогняної Землі і Фолклендах, а *N. magellanica* на додаток у Південної Георгії і західного узбережжя Антарктичного півострова. Сестринську субкладу з бутстрепом 94 утворили – *N. kerguelenensis*, *N. concinna*, *N. delesserti*, *N. edgari*, *N. macquariensis* *N. terroris*. Базальне положення у цій субкладі з бутстрепом 90 зайняла *N. kerguelenensis*. Сестринська субклада *N. concinna* (Антарктичний півострів) + *N. delesserti* (Патагонія, субантарктичні острови) з бутстрепом 100. Сестринська субклада 3-го порядку з бутстрепом 97 утворена *N. edgari* (Патагонія, субантарктичні острови), *N. macquariensis* (острови Макуорі, Херд, Принц Едуард, Кемпбелл), *N. terroris* (о. Кемпбелл, новозеландська субантарктика).

Для перевірки можливості використання мікрофлори як філогенетичного маркера було виділено чисті культури бактерій з різних морфотипів молюска *N. concinna* та донних осадів з акваторії Української антарктичної станції «Академік Вернадський». Антарктичні штами представлені психрофільними, мезотолерантними, галофільними переважно грамнегативними паличками та коками. Ізольовані бактеріальні культури мають оксидазну активність, а деякі – агаролітичні властивості.

Показано, що із культуральних рідин 34 досліджених штамів 26 (76.4%) виявили кератинолітичну активність (КерА), як на середовищі з мальтозою і желатином у якості субстрату, так і на середовищі із додаванням пір'я як основного джерела вуглецю і азоту.

Показано, що найвищий рівень казеїнолітичної активності демонстрували бактеріальні ізоляти, виділені з кишкової трубки молюсків (протока Skua Creek, з 6 м та 3 м глибини), за температури не лише 19° С (0,082 Од/мл і 0,027 Од/мл,

відповідно), а і 28° С (0,074 Од/мл і 0,064 Од/мл, відповідно). Найвищий рівень кератинолітичної активності (15 Од/мл, 14 Од/мл і 8 Од/мл) за температури 19° С виявляли культури, виділені з м'яких тканин (протока Skua Creek, з 5 м та 3 м, та Marina Point, з 5 м), і культури, виділені з кишкової трубки молюсків (Meek Channel, з 8 м і 5 м) (14 Од/мл, 7 Од/мл, відповідно). За температури 28° С найвищу кератинолітичну активність проявляли бактеріальні ізоляти, виділені з кишкової трубки і м'яких тканин молюсків (Meek Channel, з 1 м і 8 м) (9 Од/мл і 8 Од/мл, відповідно). Найчастіше кератинолітична активність була виявлена у культур, виділених з молюсків, які були відібрані з протоки Skua Creek (з 6 м, 3 м, 5 м) і каналу Meek (з 8 м, 5 м, 1 м). Таким чином, за температури 28° С більша кількість культур синтезує ферменти з кератинолітичною активністю (від 1 до 9 Од/мл), однак за температури 19° С рівень цієї активності значно вищий (від 1 до 15 Од/мл). Показано, що лише 5 бактеріальних ізолятів при вирощуванні за температури 28° С виявляли казеїнолітичну активність на рівні від 0,011 до 0,074 Од/мл, в той час, як за температури 19° С значно більша кількість (10) культур її проявляла (від 0,01 до 0,082 Од/мл).

Внаслідок скринінгу продуцентів α -L-рамнозидази серед 34 штамів була виявлена активність (від 0.0025 до 0.11 од/мг білка) у 8 штамів (23.5%), в той час як в культуральній рідині штамів, виділених з акваторії острова Уругвай (16 м) та Stella Creek (1 м), вона була слідовою. Максимальна α -L-рамнозидазна активність виявлена в культуральній рідині двох штамів (0.11 та 0.095 од/мг білка, відповідно), які були ізольовані зі змиву раковин молюска з акваторії острова Уругвай (глибина 16 м), а також одного штаму (0.085 од/мг білка), ізольованого із м'яких тканин того ж молюска.

Таким чином, нами вперше виділено чисті бактеріальні культури-продуценти протеолітичних (з кератинолітичною та казеїнолітичною активністю) та гліколітичних (α -L-рамнозидаза) ферментів з молюсків *N. concinna*.

Молекулярно-генетичним баркодингом за фрагментом гену *16S* показано, що асоційована мікробіота з *N. concinna* представлена протеобактеріями

(*Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Cobetia*, *Psychromonas*), бактероїдами (*Bizionia*) та фірмікутами (*Oceanobacillus*).

Встановлено систематичне положення виділених нами антарктичних штамів та їх ймовірне біполярне розповсюдження. Реконструкція філогенетичних зв'язків молюск-асоційованої мікрофлори, показала їх спорідненість з бактеріями Арктичного регіону (*Psychromonas arctica*, *Oceanobacillus picturae*, *Pseudoalteromonas arctica*, *Shewanella vesiculosa*, *Psychrobacter fozi*, *Psychrobacter fjordensis*, *Psychrobacter glaciei* та інших) і можливий біполярний характер їх поширення.

Досліджений нами вид черевоногого молюска *N. concinna* в акваторії архіпелагу Вільгельма представляє собою як науковий об'єкт еволюційно-біологічних досліджень і філогенетичних реконструкцій, так і модельний об'єкт для моніторингу екологічних трансформацій під впливом глобальних кліматичних змін. Є біологічним ресурсом, що внесений до каталогу FAO (Food and Agriculture Organization, United Nations Organization). *N. concinna* є генетично гетерогенним видом, адаптованим до різноманітних підводних ландшафтів та здатний до широкого розселення. Виділені з молюска чисті бактеріальні культури є потенційним ресурсом джерела різних холодостійких ферментів і подальшого їх застосування у промисловості.

У результаті проведених досліджень було визначено таксономічний статус і структуру популяцій представників роду *Nacella* з різних ділянок акваторії Аргентинських та прилеглих островів за морфологічними, молекулярно-генетичними та екологічними ознаками. В результаті дослідження зроблено наступні основні висновки.

Поділ популяції молюсків на літоральний та субліторальний морфотипи не підтверджений для акваторії дослідженої острівної системи. Розподіл популяції *N. concinna* по підводних ландшафтах не має чітких закономірностей між морфометричними параметрами раковини, вагою молюска та глибиною. У деяких випадках правило Фостера, щодо залежності розмірів від енергетичних ресурсів, може не виконуватись.

N. concinna заселяє всі доступні ландшафти, утворює популяцію з високою фенотиповою пластичністю, яка включає три морфотипи за скульптурою раковини, і становить багатий ресурс в дослідженій акваторії.

Молекулярно-філогенетичний аналіз за мітохондріальними *12S*, *16S*, *CO1* генами і ядерним геном *28S* показав належність трьох морфотипів *N. concinna*, виділених за морфологією раковини, до одного виду в акваторії архіпелагу Вільгельма, Західна Антарктика. Філогенетичні реконструкції продемонстрували близькі зв'язки *N. concinna* з нацеллідами Вогняної Землі і субантарктичних островів.

Показано філогенетичні зв'язки нацеллід з *Patellogastropoda* тропічних та помірних вод Атлантичного океану. Встановлено, що нацелліди є автохтонами Антарктики. Ймовірним місцем первинного видоутворення за молекулярними годинниками є Кергеленське плато і межа Антарктичного півострова та Вогняної Землі, що пов'язані з прадавньою тріасовою фауною півдня Гондвани.

Молекулярно-генетичний баркодинг за фрагментом гену *16S* показав приналежність асоційованої з *N. concinna* мікробіоти до протеобактерій (*Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Cobetia*, *Psychromonas*), бактероїдів (*Bizionia*) та фірмікут (*Oceanobacillus*).

Реконструкція філогенетичних зв'язків молюск-асоційованої мікрофлори показала їх спорідненість з бактеріями Арктичного регіону і можливий біполярний характер їх поширення.

Показано, що асоційовані з *N. concinna* мікробіота не може слугувати філогенетичним маркером еволюційних процесів, однак може бути використана у якості екологічного маркера підводних ландшафтів і субпопуляцій молюску.

Ключові слова: *Nacella concinna*, антарктичний лімпет, структура популяції молюска, філогенія, баркодинг, молекулярні годинники, молюск-асоційовані бактерії, біполярне розповсюдження, ензими бактерій, Західна Антарктика