

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЗОНЫ ГИБРИДИЗАЦИИ *MYTILUS TROSSULUS GOULD, 1850* И ИНВАЗИВНОГО ВИДА *M. GALLOPROVINCIALIS LAMARCK,* 1819 (BIVALVIA: MYTILIDAE) В ЗАЛИВЕ ПЕТРА ВЕЛИКОГО ЯПОНСКОГО МОРЯ¹

© 2014 г. Ю. Ф. Картавцев^{1,2}, М. В. Католикова³, С. Н. Шарина^{1,2},
О. В. Чичвархина¹, Н. А. Масалькова¹

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041;

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690950;

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург 199034

e-mail: yuri.kartavtsev48@hotmail.com

Статья принята к печати 21.11.2013 г.

Изучена генетическая изменчивость тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* и атлантического вида-вселенца мидии *M. galloprovincialis* в северо-западной части Японского моря (зал. Петра Великого и б. Киевка). Проведено генотипирование особей, отобранных из 8 поселений, по 8 полиморфным ферментным локусам и двум ядерным ДНК-маркерам (*Me-5* и *ITS-1,2*), определена частота встречаемости родительских видов и гибридов. В изученном материале разные типы маркеров демонстрировали согласованную изменчивость. В выборках преобладали генотипы местного вида *M. trossulus*. Доля *M. galloprovincialis* в общем объеме материала была относительно небольшой, однако в выборках, отобранных в зал. Посьета вблизи пос. Зарубино в зоне активного международного судоходства, она достигала $42 \pm 2\%$. Здесь же отмечено наибольшее число гибридов. Сделан вывод, что инвазия *M. galloprovincialis* в северо-западной части Японского моря продолжается, а в зал. Посьета появились постоянные поселения этого вида, не отмеченные здесь ранее.

Ключевые слова: мидии, гибридная зона, ДНК-маркеры, аллозимная изменчивость, инвазия.

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, the Sea of Japan. Y. Ph. Kartavtsev^{1,2}, M. V. Katolikova³, S. N. Sharina^{1,2}, O. V. Chichvarkhina¹, N. A. Masalkova¹ (¹A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041; ²Far Eastern Federal University, Vladivostok 690950; ³Saint Petersburg State University, Saint Petersburg 199034)

This study examines the genetic variability of the Pacific mussel *Mytilus trossulus* and an introduced Atlantic species *M. galloprovincialis* in the northwestern Sea of Japan (Peter the Great Bay and Kievka Bay). The genotyping of individuals from 8 populations was carried out using 8 polymorphic enzyme loci and 2 nuclear DNA markers (*Me-5* and *ITS-1,2*); the occurrence frequency of parent species and their hybrids was determined. The enzyme and nuclear markers demonstrated concordant genetic variation. The genotypes of the native species *M. trossulus* were predominant in the samples studied. The share of the introduced species *M. galloprovincialis* in the total material was relatively low; however, it reached $42 \pm 2\%$ in samples collected in Possjet Bay near the town of Zarubino in the zone of active international navigation. In this area, the greatest number of hybrids was found. It is concluded that the invasion of *M. galloprovincialis* in the northwestern Sea of Japan continues; permanent populations of this mussel appeared in Possjet Bay that were not recorded here previously. (Biologiya Morya, 2014, vol. 40, no. 3, pp. 220–228).

Keywords: mussels, hybrid zone, DNA markers, allozyme variation, invasion.

Важность генетического изучения мидий обусловлена особым положением данной группы моллюсков. Мидии используются самыми разными специалистами как объект исследований. Кроме того, большинство видов мидий осваивается промыслом или разводится в марикультуре. Очевидно, что ясная систематика для таких групп имеет первостепенное значение. Однако для видов *Mytilus trossulus* Gould, 1850, *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *M. edulis* L., 1758, относящихся к ком-

плексу *Mytilus* ex. gr. *edulis*, идентификация по морфологическим признакам затруднена и реально диагностическими являются только генетико-биохимические и молекулярно-генетические признаки (Чичвархин и др., 2000). Генетико-биохимические маркеры традиционно используются для идентификации этих видов как наиболее быстрые и дешевые. Молекулярные ДНК-маркеры дороги, но обладают большим диагностическим потенциалом (подробное пояснение см. далее).

¹ Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ (№ 11-04-90751 моб_ст, 13-04-00394а, 14-04-00758а) и гранта ДВО РАН № 12-I-0-06-045.

Актуально исследование мидий также в связи с инвазией атлантического вида *M. galloprovincialis* в зал. Петра Великого Японского моря, населенный нативной тихоокеанской мидией *M. trossulus*. Точное время вселения *M. galloprovincialis* в данный район неизвестно, но, по-видимому, это произошло в 1970-х годах или раньше. Информация о наличии гибридной зоны в зал. Петра Великого появилась в 1990-е гг. (Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005). Насколько стабильна гибридная зона и какова ее протяженность, как взаимодействуют аборигенная форма и вселенец, наблюдается ли интровергессия генов и в каком направлении она идет в настоящее время? Ответы на эти вопросы пока не получены.

Таксономический статус трех номинальных видов комплекса *Mytilus ex. gr. edulis*, гибридизация которых наблюдается в зонах контакта их ареалов, обсуждается до сих пор (Kartavtsev et al., 2005). В частности, в данной цитированной работе ранг вида генетически обоснованно достигнутым признается для *M. trossulus*, тогда как два других номинальных вида определены как полувиды. При исследовании мидий данного комплекса необходимо 1) установить таксономический статус представителей группы с применением генетических подходов, учитывая отсутствие четких диагностических признаков традиционной систематики, и 2) проанализировать генетические процессы в гибридных зонах в связи с инвазией и видообразованием.

Известно, что тихоокеанский вид *M. trossulus* гибридизует с интродуцированным *M. galloprovincialis* в разных районах северной Пацифики (Heath et al., 1995; Inoue et al., 1997; Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005). В восточной части Тихого океана (Калифорния и зал. Пьюджет-Саунд) зоны гибридизации изучены относительно подробно (Heath et al., 1995; Rawson et al., 1999; Anderson et al., 2002), однако его западным районам удалено значительно меньше внимания, хотя таксономические вопросы обсуждались и проблемы генетики видообразования затрагивались (Чичвархин и др., 2000; Kartavtsev et al., 2005). В целом описаны распространение и гибридизация *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* у побережья Японии вдоль островов Хонсю и Хоккайдо (Inoue et al., 1997; Brannock et al., 2009), в то же время сведений о структуре поселений этих видов у западных берегов Японского моря, в частности в зал. Петра Великого, относительно мало. В опубликованных работах (Чичвархин и др., 2000; Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005) либо больше таксономии, либо рассматривается материал, отобранный всего из нескольких поселений, – в основном особи одного из родительских видов и небольшая доля гибридов. Эта информация не дает полного представления о распространении *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* в зал. Петра Великого, а также не позволяет описать пространственно-генетическую структуру зон интерградации и гибридизации изучаемых видов. Анализ, выполненный в рамках данного исследования, должен восполнить этот пробел.

Таким образом, основные задачи настоящей работы – определение зоны инвазии исходно атлантического вида *M. galloprovincialis* в ареал тихоокеанского вида *M. trossulus* на основе генетико-биохимических и молекулярно-генетических маркеров, выяснение частоты межвидовой гибридизации, оценка динамики и размера гибридной зоны в северо-западной части Японского моря, преимущественно в зал. Петра Великого.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили 8 выборок мидий объемом от 50 до 128 особей, отобранных в разных районах российского прибрежья Японского моря от б. Троицы и б. Витязь на юго-западе до б. Киевка на северо-востоке (рис. 1). Краткая характеристика выборок (номер, место отбора, дата отбора, объем – n): 1, прибрежье у пос. Зарубино (зал. Посыета), 22.07.2011, n = 128; 2, б. Витязь (зал. Посыета), 23.07.2011, n = 58; 3, Амурский залив, нефтебаза, 11.08.2011, n = 111; 4, Уссурийский залив, 12.08.2011, n = 58; 5, б. Гайдамак (зал. Восток), 20.08.2011, n = 56; 6, б. Подсобная (зал. Восток), 19.07.2011, n = 60; 7, район Морской биологической станции (МБС) "Восток" Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (зал. Восток), 07.08.2011, n = 60; 8, б. Киевка, 24.08.2011, n = 50. Отметим, что в зал. Посыета и зал. Восток (МБС) распределение *Mytilus trossulus* и *M. galloprovincialis* с использованием генетических признаков изучалось и ранее (МакДональд и др., 1990; Чичвархин и др., 2000; Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005). Соотношение данных видов в Амурском и Уссурийском заливах, а также в б. Гайдамак и б. Киевка на основе генетико-биохимических и молекулярно-генетических признаков исследовано впервые (б. Киевка находится к северу от м. Поворотный).

Проведен генетический анализ собранного материала по 8 аллозимным локусам и по двум маркерам ядерной ДНК. Изучены аллозимные маркеры ферментных локусов: гликозофосфатизомеразы (ГФИ, *GPI*^{*}, КФ 5.3.1.9), фосфоглюкомутазы (ФГМ, *PGM-1*^{*}, КФ 5.4.2.2), маннозофосфатизомеразы (МФИ, *MPI*^{*}, КФ 5.3.1.8), лейцинаминопептидазы (ЛАП, *LAP*^{*}, КФ 3.4.11.1), аланинаминопептидазы (ААП, *AAP*^{*}, КФ 3.4.11.2), октопиндинегидрогеназы (ОНДГ, *ONDH*^{*}, КФ 1.5.1.11) и аспартатаминотрансферазы (ААТ, *AAT-1*^{*} и *AAT-2*^{*}, КФ 2.6.1.1). Эти локусы являются полудиагностическими для дискриминации *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* (МакДональд и др., 1990; Gosling, 1992). Изученные маркеры ядерной ДНК – локус *Me-5* и *ITS-1,2* – являются диагностическими для дискриминации двух видов. На основании генотипирования особей по всем описанным локусам оценены доли встречаемости аборигенного вида, гибридов и интродуцентов в выборках из исследованных районов.

Анализ аллозимных маркеров

Для аллозимного анализа брали мягкие ткани живых моллюсков. Ткани аддуктора и гепатопанкреаса гомогенизировали механически с добавлением стабилизирующего раствора 2-меркаптоэтанола (0.2%), гомогенат центрифугировали и надосадочную фракцию использовали в качестве проб. Белковые фракции разделяли при помощи горизонтального электрофореза в 14% крахмальном геле. При электрофорезе использовали трис-малеатную (pH 7.4) и трис-цитратную (pH 8.0) буфер-



Рис. 1. Места сбора мидий комплекса *Mytilus* ex. gr. *edulis* в зал. Петра Великого и в б. Киевка (Японское море). 1 – Зарубино; 2 – б. Витязь; 3 – Амурский залив; 4 – Уссурийский залив; 5 – зал. Восток, б. Гайдамак; 6 – зал. Восток, б. Подсобная; 7 – зал. Восток, МБС "Восток"; 8 – б. Киевка. "Корабликом" отмечены места сбора мидий вблизи портов или базирования судов.

ные системы. Продолжительность электрофореза составляла 13–19 ч при постоянном токе 130–180 В и 20–40 мА на блок 15 см и при температуре 4°C. Специфическое гистохимическое окрашивание ферментных фракций в геле проводили по известным из литературы методикам (Harris, Hopkinson, 1976; Manchenko, 2002).

Для оценки видовой принадлежности отдельных особей по мультилокусным аллозимным данным применяли программу Structure, использующую описанные ранее алгоритмы (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003). При расчетах использовали следующие параметры модели: admixture, correlated allele frequencies, k: 2, burnin: 30000, MCMC: 50000; предполагались разные значения F_{st} для разных субпопуляций и средние априорные F_{st} , равные 0.01; для краткости части параметров опущена. Возможность использования этой программы для описания генетической структуры популяций и оценки видовой принадлежности особей в гибридных зонах мидий по набору аллозимных локусов была показана ранее (Стрелков и др., 2008). На основании отклонений генотипических значений программа Structure реконструирует частоты аллелей в гипотетических родительских популяциях и для каждой особи рассчитывает индексы (показатели), варьирующие от 0 до 1 и отражающие вклад генофонда отдельной родительской популяции в индивидуальный составной генотип. Так, когда гетерогенность в исследуемой популяции возникает за счет скрещивания двух родительских форм, в частности *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*, в результате анализа с помощью программы Structure для каждой особи мы получаем два показателя, отражающих относительный вклад в данный индивидуальный генотип генофондов первого и второго вида соответственно. В сумме эти два показателя дают 1, поэтому в последующих расчетах достаточно использовать лишь один из них. Под термином "индивидуальный индекс по Structure" далее подразумеваем вклад *M. trossulus*. Вклад по совокупности генетико-биохимических локусов (GBL) при идентификации особей посредством этого индекса далее будем обозначать как GBL.

Анализ индивидуальных индексов позволяет классифицировать особей на группы родительских видов и гибридов

(Стрелков и др., 2008; Roberts et al., 2009, 2010). Как показано ранее (Roberts et al., 2009, 2010), границы значений индексов для разделения чистых видов и гибридов могут быть выбраны субъективно в пределах от 0.08 до 0.95. Мы относили особь к *M. trossulus*, если ее индивидуальный индекс по Structure попадал в диапазон значений 0.9–1.0 (т.е. вклад *M. trossulus* в генотип этой особи составлял 90% и более). К *M. galloprovincialis* относили особей со значениями индивидуальных индексов от 0 до 0.1 (вклад *M. trossulus* в генотип не более 10%). Остальные особи (индивидуальный индекс по Structure > 0.1 и < 0.9) классифицировали как гибриды. На основании этих данных рассчитывали частоты родительских и гибридных генотипов в исследованных выборках.

Анализ ДНК-маркеров

Для анализа ядерных ДНК-маркеров тотальную ДНК выделяли из жаберных пластинок, фиксированных в 95% этиловым спиртом по стандартной методике (Маниатис и др., 1984) с небольшими модификациями (удаление фенола из протокола и добавление рибонуклеазы), или методом HotSHOT (Alasaad et al., 2008). Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей дистиллированную воду – 2.3 мкл; 10× буфер (Evrogen) – 1 мкл; смесь dNTP (концентрация каждого трифосфата – 2.5 мМ, Evrogen) – 1.0 мкл; 25 мМ MgCl₂ – 0.6 мкл; праймеры (5 пмоль/мкл) – по 1 мкл; Taq-полимераза (5 ед./мкл, Evrogen) – 0.1 мкл; ДНК – 1 мкл. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась при следующих условиях: предварительная денатурация при 94°C – 1 мин; далее для 30 циклов: денатурация при 92°C – 30 с, отжиг при 53°C – 60 с, синтез при 75°C – 1 мин; заключительный цикл при 75°C – 5 мин. В качестве специфических праймеров использовали праймеры для гена *Me-5* прикрепительного белка (прикрепительный полифенольный белок, образующий клеящие нити биссуса у мидий): Me15 5'-CCAGTATAACAACTGTGAAAA-3' и Me16 5'-TGTGTCTTAATAGGTTTGTAAGA-3' (Inoue et al., 1995). Для идентификации ITS ядерной рРНК использовали условия амплификации и последовательности праймеров, описанные

ранее (Heath et al., 1995). Методические условия позволяют amplifyфицировать фрагмент ДНК, включающий оба внутренних транскрибуемых спейсера (*ITS*) – *ITS-1* и *ITS-2* (для краткости – *ITS-1,2*). Идентификация особей и классификация генотипов выполнены с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

Классификацию генотипов по ДНК-маркерам, имеющим только 2 аллеля, каждый из которых типичен для одного из родительских видов (условно аллель 1 и аллель 2), проводили следующим образом: генотип 1-1 – *M. trossulus*, 1-2 – гибриды и 2-2 – *M. galloprovincialis*. На основании полученных результатов рассчитывали доли встречаемости аборигенного вида, гибридов и интродуктов.

Данные, полученные с использованием разных типов маркеров, сопоставляли. Для сопоставления оценивали стан-

дарные ошибки средних значений и отклонения в пределах доверительных интервалов. С помощью пакета программ (ПП) Statistica 6 (StatSoft, 2001) выполнен также дисперсионный анализ. Анализ изменчивости частот аллелей, генетических расстояний и F-статистик выполнен в ПП Specstat (Картавцев, Соловьев, 1992; Kartavtsev, Soloviev, 1993).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для каждого из 8 аллозимных локусов выявлено от 4 до 14 аллелей. Частоты аллелей, сгруппированных согласно их относительной подвижности в геле, приведены в табл. 1. В табл. 2 и на рис. 2 представлены частоты генотипов *Mytilus trossulus*, гибридов и *M. galloprovincialis*, полученные для разных типов марке-

Таблица 1. Частоты аллелей 8 аллозимных локусов в выборках мидий комплекса *Mytilus ex gr. edulis* из зал. Петра Великого и б. Киевка (Японское море)

Локусы	Аллели*, количество особей в выборке, N	1, Зарубино, зал. Посытка	2, б. Витязь, зал. Посытка	3, Амурский залив (нефтебаза)	4, б. Соболь, Уссурийский залив	5, б. Гайдамак, зал. Восток	6, б. Полюбнай, зал. Восток	7, МБС "Восток", зал. Восток	8, б. Киевка
ФГМ	< 80	0.06	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01
ФГМ	80–87	0.27	0.08	0.05	0.03	0.21	0.03	0.04	0.09
ФГМ	92–96	0.22	0.30	0.34	0.16	0.08	0.32	0.32	0.30
ФГМ	100	0.25	0.50	0.42	0.61	0.53	0.50	0.52	0.52
ФГМ	103–105	0.06	0.02	0.09	0.03	0.03	0.08	0.00	0.07
ФГМ	> 105	0.14	0.09	0.08	0.16	0.15	0.06	0.11	0.01
	N	124	58	111	58	56	60	60	50
ГФИ	< 80	0.04	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01
ГФИ	82–89	0.10	0.30	0.27	0.28	0.35	0.42	0.35	0.32
ГФИ	93–96	0.04	0.04	0.05	0.06	0.22	0.28	0.12	0.04
ГФИ	100	0.35	0.59	0.59	0.53	0.34	0.26	0.48	0.46
ГФИ	105	0.06	0.01	0.06	0.06	0.07	0.04	0.04	0.15
ГФИ	110	0.39	0.06	0.04	0.06	0.01	0.00	0.00	0.02
ГФИ	> 110	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
	N	118	58	111	58	56	60	60	50
МФИ	66	0.00	0.00	0.02	0.03	0.04	0.00	0.01	0.02
МФИ	84	0.39	0.03	0.00	0.02	0.12	0.01	0.02	0.15
МФИ	100	0.61	0.97	0.95	0.96	0.79	0.97	0.96	0.81
МФИ	115	0.00	0.00	0.03	0.00	0.04	0.02	0.02	0.02
МФИ	131	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
	N	127	57	111	58	56	60	60	50
ОНДГ	< 80	0.12	0.07	0.06	0.02	0.05	0.01	0.06	0.07
ОНДГ	79–82	0.07	0.03	0.02	0.04	0.00	0.08	0.03	0.05
ОНДГ	89	0.07	0.02	0.07	0.15	0.05	0.00	0.10	0.00
ОНДГ	95	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.08
ОНДГ	100–102	0.53	0.84	0.82	0.74	0.86	0.76	0.72	0.61
ОНДГ	107	0.23	0.03	0.03	0.05	0.03	0.00	0.05	0.14
ОНДГ	> 107	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.08	0.08	0.05
	N	127	58	111	57	55	59	60	50
AAT1	75	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
AAT1	100	0.94	0.96	0.95	0.95	0.98	0.93	0.97	0.96
AAT1	120	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Окончание табл.1

Локусы	Аллели*, количество особей в выборке, N		1, Зарубино, зал. Посьета	2, б. Витязь, зал. Посьета	3, Амурский залив (нефтебаза)	4, б. Соболь, Уссурийский залив	5, б. Гайдамак, зал. Восток	6, б. Подсобная, зал. Восток	7, МБС "Восток", зал. Восток	8, б. Киевка
AAT1	150	0.05	0.04	0.03	0.05	0.02	0.08	0.03	0.04	
	N	70	27	82	28	56	60	60	50	
AAT2	75	0.02	0.02	0.03	0.00	0.02	0.02	0.01	0.00	
AAT2	100	0.98	0.96	0.96	1.00	0.97	0.98	0.99	0.98	
AAT2	105	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	
AAT2	135	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
	N	100	57	82	28	56	60	60	50	
ЛАП	> 77	0.01	0.04	0.00	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01
ЛАП	77–84	0.09	0.09	0.08	0.13	0.09	0.25	0.07	0.06	
ЛАП	90–96	0.24	0.42	0.44	0.37	0.34	0.26	0.51	0.36	
ЛАП	100–104	0.49	0.41	0.44	0.47	0.50	0.44	0.39	0.45	
ЛАП	107	0.06	0.01	0.00	0.01	0.00	0.02	0.03	0.00	
ЛАП	111	0.09	0.03	0.04	0.01	0.06	0.00	0.00	0.12	
ЛАП	124	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	N	123	58	108	58	56	60	60	50	
AAP	> 91	0.10	0.15	—	0.27	0.18	—	0.15	0.15	
AAP	91–96	0.24	0.54	—	0.28	0.35	—	0.41	0.32	
AAP	100–103	0.26	0.29	—	0.43	0.42	—	0.43	0.44	
AAP	109	0.13	0.02	—	0.02	0.05	—	0.02	0.03	
AAP	> 109	0.28	0.00	—	0.00	0.00	—	0.00	0.06	
	N	36	24	0	57	55	0	54	48	

*Аллели обозначены в соответствии с электрофоретической подвижностью по отношению к наиболее частым аллозимам, принятным за 100. Соответственно, аллоферменты, мигрирующие дальше к аноду, имеют значения > 100, и наоборот, более медленные – < 100. Если указаны диапазоны, то в этих случаях близкие по подвижности аллоферменты объединены в один аллельный класс.

Таблица 2. Экспериментальная оценка доли генотипов двух видов мидий рода *Mytilus* и их гибридов в исследованных выборках по комплексу аллозимных локусов (GBL, гибридный индекс) и по двум молекулярным маркерам (*Me-5* и *ITS-1,2*)

Поселение	<i>M. trossulus</i>			Гибриды			<i>M. galloprovincialis</i>		
	GBL	<i>Me-5</i>	<i>ITS-1,2</i>	GBL	<i>Me-5</i>	<i>ITS-1,2</i>	GBL	<i>Me-5</i>	<i>ITS-1,2</i>
1, Зарубино, зал. Посьета	0.37±0.02	0.49±0.03	0.49±0.03	0.21±0.01	0.21±0.02	0.19±0.02	0.42±0.02	0.30±0.02	0.31±0.02
2, б. Витязь, зал. Посьета	0.83±0.02	1—	1—	0.16±0.02	0—	0—	0.02±0.003	0—	0—
3, Амурский залив, нефтебаза	0.90±0.01	1—	1—	0.09±0.01	0—	0—	0.01±0.001	0—	0—
4, б. Соболь, Уссурийский залив	0.86±0.02	1—	1—	0.14±0.02	0—	0—	0—	0—	0—
5, б. Гайдамак, зал. Восток	0.77±0.02	0.95±0.01	0.95±0.01	0.23±0.02	0.05±0.01	0.05±0.01	0—	0—	0—
6, б. Подсобная, зал. Восток	0.98±0.002	0.90±0.03	1—	0.02±0.002	0.10±0.03	0—	0—	0—	0—
7, МБС "Восток", зал. Восток	0.93±0.01	1—	1—	0.07±0.01	0—	0—	0—	0—	0—
8, б. Киевка	0.80±0.02	0.64±0.05	0.64±0.05	0.06±0.01	0.14±0.02	0.14±0.02	0.14±0.02	0.23±0.04	0.23±0.04
Средняя ± ошибка	0.80±0.07	0.87±0.07	0.88±0.07	0.12±0.03	0.06±0.03	0.05±0.03	0.07±0.05	0.07±0.04	0.07±0.04

П р и м е ч а н и е. Прочерк – данные не получены.

ров. Даже визуальный анализ генотипической идентификации исследованных мидий (табл. 2) обнаруживает хорошую воспроизводимость данных по трем группам маркеров: 1) GBL – генетико-биохимические маркеры, идентификация по гибридному индексу, 2) *Me-5* и 3) *ITS-1,2*. Средние частоты встречаемости показывают, что в выборках преобладают особи аборигенного вида: 80 ± 7 , 87 ± 7 и $88 \pm 7\%$ соответственно для GBL, *Me-5* и *ITS-1,2* (табл. 2). Распределение частот родительских и гибридных генотипов в исследованных выборках для краткости показано только для двух групп маркеров – GBL и *Me-5* (рис. 2).

Оценки вероятностей происхождения или индексов, полученные с помощью программы Structure, как и любые другие результаты моделирования, базируются на ряде допущений, описанных выше. Поэтому их интерпретация требует осторожности. Тем не менее, наши результаты хорошо согласуются с данными предыдущих исследований (МакДональд и др., 1990; Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005) и оценками, полученными по двум ДНК-маркерам (см. ниже). Средняя частота встречаемости генотипов *M. trossulus* составила $80 \pm 7\%$. Доля генотипов *M. trossulus* в большинстве выборок колебалась от 77 до 98% (табл. 2, рис. 2А). Исключение составила лишь выборка 1 из зал. Посыета (пос. Зарубино), где доля этого вида была относительно низкой (37–49%); разброс оценок демонстрирует различия оценок по трем группам маркеров в табл. 2). Эта же выборка характеризовалась максимальной среди всего материала долей генотипов *M. galloprovincialis* (30–42%). Достаточно много генотипов *M. galloprovincialis* (14%) обнаружено в выборке из б. Киевка. В большинстве же выборок доля *M. galloprovincialis* была либо очень низкой – 1–2% (б. Витязь, зал. Посыета и Амурский залив), либо представители этого вида в выборках отсутствовали (выборка из Уссурийского залива и выборки 6 и 7 из зал. Восток).

Обсуждая данные популяционно-генетического анализа, распространение двух видов мидий в масштабе региона можно назвать мозаичным. Предположительно, эта мозаичность обусловлена векторами расселения *M. galloprovincialis*. Зарубино – международный порт, поэтому возможен занос *M. galloprovincialis* в качестве обрастаеля судов из зон постоянного обитания данного вида. Сравнительно высокая доля *M. galloprovincialis* в б. Киевка (14–23%) рассматривается как неожиданный результат. Источник инвазии *M. galloprovincialis* в этот район не ясен, хотя допускается влияние миграции через обрастание судов и действие экологических факторов. Распространение *M. galloprovincialis* во многих случаях ограничено температурным фактором (см.: Hilbush et al., 2010), и по результатам предыдущих исследований (Кепель, Озолинш, 1992; Ivanova, Lutaenko, 1998; Скурихина и др., 2001) можно предположить, что южная часть зал. Петра Великого является северной границей распространения этого вида у материкового побережья Японского моря. Наши данные показывают, что граница

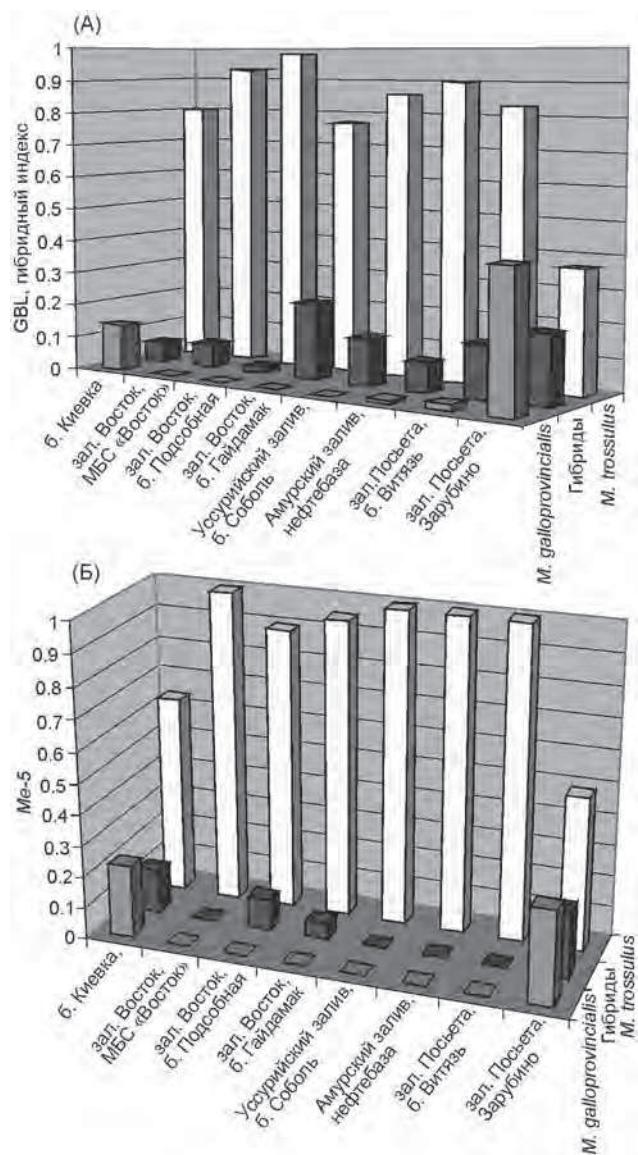


Рис. 2. Гистограмма распределения частоты встречаемости интродуцента (*Mytilus galloprovincialis*), гибридов и местного вида (*Mytilus trossulus*) в исследованных выборках мидий из зал. Петра Великого и б. Киевка (Японское море). Гистограммы построены по данным табл. 2: А – GBL, Б – *Me-5*. По оси ординат – частота встречаемости особей трех проанализированных групп.

ареала *M. galloprovincialis* пролегает севернее, чем считалось ранее (б. Киевка).

Доминирование особей родительских видов над гибридами во всех выборках позволяет описать гибридную зону как бимодальную (Barton, Hewitt, 1985). По-видимому, гибридизация между аборигенным видом и интродуцентом до определенной степени ограничена какими-то изоляционными механизмами. Кроме этого, анализ соотношений родительских и гибридных генотипов в выборках из разных районов показал, что в среднем доля гибридов в выборках снижается в направлении от юго-запада к северо-востоку (табл. 2, рис. 2А). Такая

тенденция отчасти может быть связана с общим снижением доли одного из родительских видов в выборках из северных поселений мидий. В то же время интересно следующее сравнение. В выборках из более южных районов доля "чистых" *M. galloprovincialis* колебалась от 30–42% у пос. Зарубино до 0–2% в б. Витязь. В Амурском заливе доля интродуцентов и гибридов изменялась от 0–1 до 0–9% соответственно. В выборках, в которых "чистые" *M. galloprovincialis* в принципе отсутствовали (Уссурийский залив, б. Гайдамак, б. Подсобная, МБС "Восток"), доля гибридов составляла от 2 до 23%. В то же время в выборках из б. Киевка доля гибридов не превышала 6–14%, несмотря на то, что доля "чистых" *M. galloprovincialis* достигала 14–23% (табл. 2, рис. 2А). По-видимому, в разных районах степень репродуктивной изоляции между родительскими видами может быть различной. Схожие результаты получены при исследовании зон гибридизации *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* у о-ва Хоккайдо (Brannock et al., 2009), причем дифференциация по степени гибридизации, как и в нашем материале, наблюдалась между северными и южными районами. Факторы, влияющие на степень гибридизации до конца не изучены, это могут быть как климатические особенности районов, так и история инвазии. В нашей работе интересна также выборка из б. Гайдамак, содержащая большую долю гибридов (5–23%) при полном отсутствии "чистых" *M. galloprovincialis*. Причины, обусловливающие такое соотношение генотипов, пока не ясны. Отметим, что гибриды в этом районе находили и ранее (в конце 1990-х годов),

но определяли их по морфологическим признакам (М.Б. Иванова, личное сообщение). Возможно, гибридные особи появляются в б. Гайдамак как результат размножения *M. galloprovincialis*, присутствующей в обрастаниях судов, приходящих в судоремонтный завод, находящийся в данной бухте. Очевидно, что необходимы дальнейшие генетические исследования в данной акватории, чтобы ответить на этот вопрос. Один из важных выводов, следующих из полученных результатов, – возможное нарастание инвазии *M. galloprovincialis* в северо-западной части Японского моря. Так, в б. Гайдамак зал. Восток доля гибридных особей достигает $23 \pm 3\%$ (табл. 2), ранее этот показатель был более низким: $8.95 \pm 1.68\%$ в 1999 г. (Скурихина и др., 2001) и $1.60 \pm 0.90\%$ в 2003 г. (Kartavtsev et al., 2005). Кроме этого, появились ранее не отмечавшиеся постоянные поселения вида-интродуцента в районе пос. Зарубино в зал. Посытка. Прежде в районе зал. Посытка встречались лишь единичные особи *M. galloprovincialis*, в основном прикрепленные к плавающим предметам, переносимым течениями со стороны Кореи и Японии (Кепель, Озолинш, 1992; Ivanova, Lutaenko, 1998; Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005). Однако эти выводы могут быть связаны и с недостаточной изученностью региона в предыдущие годы, так как поселения мидий непосредственно у пос. Зарубино (зал. Посытка) и в б. Гайдамак (зал. Восток) ранее не изучались. С осторожностью мы делаем вывод и об экспансии зоны инвазии на север в б. Киевка, где генетические исследования ранее также не выполнялись.

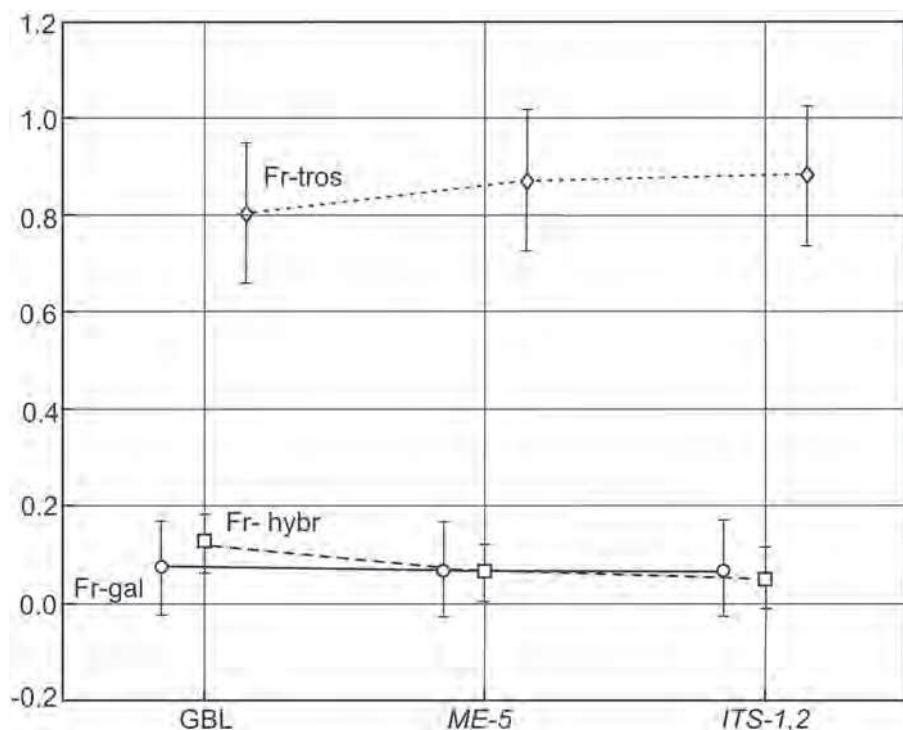


Рис. 3. Однофакторный дисперсионный анализ частоты встречаемости в выборках *Mytilus galloprovincialis* (Fr-gal), гибридов (Fr-hybr) и *Mytilus trossulus* (Fr-tros) при оценке по трем группам маркеров: GBL, Me-5 и ITS-1,2. Различия частот при оценке совокупно по трем маркерам незначимы: Wilks lambda = 0.6536, F = 1.5004, d.f. = 6, 38, P < 0.2044. Вертикальные линии – 95% доверительный интервал.

Анализ данных по ядерным ДНК-маркерам, гену *Me-5* и *ITS-1,2* выявил те же тенденции, что и при анализе по 8 аллозимным локусам. В изученных выборках преобладали генотипы местного вида *M. trossulus*. Обнаружена относительно высокая доля вида-интодуцента *M. galloprovincialis* вблизи пос. Зарубино в зал. Посьета. Здесь же отмечено наибольшее число гибридов (табл. 2, рис. 2Б). Если учесть ошибки выборочности, то в среднем доли гибридов и двух исследуемых родительских видов, определенные по трем различным группам маркеров, статистически значимо не различались (табл. 2, рис. 3): $P < 0.2$. Хотя в целом различия оценок долей гибридов, выявленные по разным типам маркеров, ожидаются, поскольку GBL-маркеры являются полудиагностическими и частоты гибридов оценены посредством цифрового моделирования. Диапазон значений индекса для оценки гибридного статуса особи выбран произвольно на основе предыдущего опыта или из эвристических соображений. Имеются и другие погрешности этого подхода, связанные с неизвестностью точных значений некоторых параметров при выполнении моделирования, о чем уже упоминалось. Оценки по ДНК-маркерам, которые являются диагностическими, получены по фактической численности гибридных генотипов. При этом совпадение оценок достаточно хорошее, что говорит о надежности полученных результатов.

Сопоставление данных по разным типам маркеров показало, что при гибридизации у мидий разные генетические компоненты могут вести себя несогласованно. Такая ситуация описана и для Балтийского моря, где длительная активная гибридизация привела к интрогрессии генов североморской *M. edulis* в геном балтийской *M. trossulus*. Однако это выявлено преимущественно по митохондриальным генам и в меньшей степени по неаллозимным ядерным локусам (Borsig et al., 1999; Riginos, Cunningham, 2005). Обнаружение согласованной изменчивости по разным типам маркеров у гибридизующих мидий из Японского моря – одно из свидетельств невысокой степени гибридизации *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* в этом регионе.

В настоящей статье мы не оценивали уровень интрогрессии генов между таксонами и поэтому в обсуждении не касаемся аспектов генетики видеообразования в исследованном комплексе мидий, хотя полученные данные вполне согласуются с предыдущими выводами (Kartavtsev et al., 2005). В дальнейшем по комплексу генотипов предполагается оценить тип гибридов (F_1 , F_2) и выяснить преобладающее направление интрогрессии генов у изучаемой пары видов. К настоящему времени установлено, что генотипическую дифференциацию в поселениях мидий невысока. Так, для GBL суммарное минимальное несмещение расстояние Нея $D_m^{\wedge} = 0.0253 \pm 0.0041$. Это показывает небольшую, но статистически значимую генетическую дивергенцию поселений мидий в зал. Петра Великого, хотя отдельные локусы демонстрируют очень большую гетерогенность частот генотипов и аллелей. Усредненная по 8 локусам и взвешенная

по проанализированному на данный момент варианту из 6 выборок стандартизированная, нормализованная дисперсия частот аллелей F_{st}' (Nei, 1978) составила 0.0473 ± 0.0559 . Об относительно низкой генетической дифференции поселений мидий в зал. Петра Великого было известно и ранее (Картавцев, 1981; Картавцев, Заславская, 1982). Это связано с большим потоком генов между поселениями, представляющими собой супопуляции подразделенной популяции за счет длительно планктонирующих личинок и их разноса течениями на большие расстояния (Картавцев, 1981, 2009; Картавцев, Заславская, 1982).

Таким образом, из полученных результатов следует, что в выборках преобладает местный вид *M. trossulus*, инвазия *M. galloprovincialis* сохраняется и, возможно, даже нарастает в северо-западной части Японского моря. Имеющиеся данные о наличии преимущественной интрогрессии генов местного вида в генофонд вселенца в наших водах (Kartavtsev et al., 2005) позволяют надеяться на минимальный генетический ущерб местным популяциям *M. trossulus*. Однако со временем ситуация может измениться, поэтому необходим дальнейший генетический мониторинг зоны гибридизации. Отметим, что вывод о нарастании инвазии является предварительным, поскольку оценки 1999 и 2003 гг. базировались на разных маркерах с использованием в 2003 г. также многомерного морфометрического подхода и, наконец, были изучены географически близкие, но не одни и те же поселения.

Авторы благодарны П.П. Стрелкову (Санкт-Петербургский государственный университет) за поддержку идеи расширенного исследования мидий в Японском море.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Картавцев Ю.Ф. Аллозимный полиморфизм у двух видов мидий // Генетика и размножение морских животных. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1981. С. 36–38.
- Картавцев Ю.Ф. Молекулярная эволюция и популяционная генетика. 2-е изд., доп. и перераб. Владивосток: Изд-во ДВГУ. 2009. 280 с.
- Картавцев Ю.Ф., Заславская Н.И. Генетическая структура, факторы интеграции и дифференциации популяций обыкновенной мидии (*Mytilus edulis*) // Генетика. 1982. Т. 18, № 10. С. 1653–1666.
- Картавцев Ю.Ф., Соловьев А.А. Программный мини-комплекс SPECSTAT для статистической обработки данных по популяционной генетике // Генетика. 1992. Т. 28, № 3. С. 194–197.
- Кепель А.А., Озолини А.В. Морфометрический анализ мидий рода *Mytilus* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) морей СССР // Зоол. журн. 1992. Т. 71, № 9. С. 33–40.
- МакДональд Дж.Х., Коэн Р.К., Балакирев Е.С. и др. Видовая принадлежность "съедобной мидии", обитающей в приазиатской части Тихого океана // Биол. моря. 1990. № 1. С. 13–22.
- Маниатис Е., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. М.: Мир. 1984. 479 с.

- Скурихина Л.А., Картацев Ю.Ф., Панькова М.В., Чичвархин А.Ю. Исследование двустворчатых моллюсков *Mytilus trossulus* и *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae) с помощью ПЦР-маркеров в зоне их гибридизации в заливе Петра Великого Японского моря // Генетика. 2001. Т. 37, вып. 11. С. 1556–1559.
- Стрелков П.П., Католикова М.В., Лайус Д.Л. и др. Дискриминация беломорских мидий *Mytilus edulis* L и *M. trossulus* Gould // Вестн. СПбГУ. 2008. Сер. 3. Вып. 4. С. 77–82.
- Чичвархин А.Ю., Картацев Ю.Ф., Кафанов А.И. Генетические связи между некоторыми видами Mytilidae (Mollusca, Bivalvia) северной части Тихого океана // Генетика. 2000. Т. 35, вып. 7. С. 1206–1220.
- Alasaad S., Rossi L., Maione S. et al. HotSHOT Plus ThermalSHOCK, a new and efficient technique for preparation of PCR-quality Sarcoptes mite genomic DNA // Parasitol. Res. 2008. Vol. 103. P. 1455–1457.
- Anderson A.S., Bilodeau A.L., Gilg M.R., Hilbush T.J. Routes of introduction of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) to Puget Sound and Hood Canal // J. Shellfish Res. 2002. Vol. 21. P. 75–79.
- Barton N.H., Hewitt G.M. Analysis of hybrid zones // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1985. Vol. 16. P. 113–148.
- Borsig P., Dagquin C., Caetano S.R., Bonhomme F. Nuclear-DNA evidence that northeastern Atlantic *Mytilus trossulus* mussels carry *M. edulis* genes // J. Moll. Stud. 1999. Vol. 65. P. 504–507.
- Brannock P.M., Wethey D.S., Hilbush T.J. Extensive hybridization with minimal introgression in *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* in Hokkaido, Japan // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2009. Vol. 383. P. 161–171.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inference of population structure: extensions to linked loci and correlated allele frequencies // Genetics. 2003. Vol. 164. P. 1567–1587.
- Gosling E.M. Genetics of *Mytilus* // The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1992. Ch.7. P. 309–382.
- Harris H., Hopkinson D.A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam: North Holland Publ. Co. 1976.
- Heath D.A., Rawson P.D., Hilbush T.J. PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1995. Vol. 52. P. 2621–2627.
- Hilbush T.J., Brannock P.M., Jones K. et al. Historical changes in the distributions of invasive and endemic marine invertebrates are contrary to global warming predictions: the effects of decadal climate oscillations // J. Biogeogr. 2010. Vol. 37. P. 423–431.
- Inoue K., Odo S., Nakao S. et al. A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers // Mar. Biol. 1997. Vol. 128, no. 1. P. 91–95.
- Inoue K., Takeuchi Y., Miki D., Odo S. Mussel adhesive plaque protein gene is a novel member of epidermal growth factor-like gene family // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 6698–6701.
- Ivanova M.B., Lutaenko K.B. On the distribution of *Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819 (Bivalvia, Mytilidae) in Russian Far Eastern seas // Bull. Inst. Malacol. Tokyo. 1998. Vol. 3, no. 5. P. 67–71.
- Kartavtsev Yu.P., Soloviev A.A. SPECSTAT: PC software for statistical data analysis in the field of allozyme genetics // Genetica. 1993. Vol. 88. P. 79–82.
- Kartavtsev Y.Ph., Chichvarkhin A.Y., Gubanova N.V. et al. Allozyme and morphometric research on two common mussel species of *Mytilus* genus (Mollusca, Mytilidae) in Korea, Japan and Russian waters // Kor. J. Genet. 2005. Vol. 27, no. 4. P. 289–306.
- Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels: 2nd ed. CRC Press. 2002. 592 p.
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. Vol. 89. P. 583–590.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. Vol. 155. P. 945–959.
- Rawson P.D., Argawal V., Hilbush 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, no. 1. P. 201–211.
- Riginos C., Cunningham C.W. Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* × *Mytilus trossulus*) hybrid zones // Mol. Ecol. 2005. Vol. 14, no. 2. P. 381–400.
- Roberts D.G., Gray C.A., West R.J., Ayre D.J. Evolutionary impacts of hybridization and interspecific gene flow on an obligately estuarine fish // J. Evol. Biol. 2009. Vol. 22, no. 1. P. 27–35.
- Roberts D.G., Gray C.A., West R.J., Ayre D.J. Marine genetic swamping: hybrids replace an obligately estuarine fish // Mol. Ecol. 2010. Vol. 19, no. 3. P. 508–520.
- .