

УДК 574/577+57.015

Н.А. МАСАЛЬКОВА, Ю.Ф. КАРТАВЦЕВ, О.В. ЧИЧВАРХИНА

Генетический и морфометрический анализ поселений мидии (*Mytilidae: Mytilus ex. gr. edulis*) из вод Приморья: исследование дифференциации популяций в гибридной зоне

*Изучена изменчивость мидий комплекса *Mytilus ex. gr. edulis* из района гибридизации *Mytilus trossulus* и *M. galloprovincialis* в зал. Петра Великого (западная часть Японского моря) на основе изменчивости 4–6 аллозимных локусов, ДНК-маркера *Me-5*, 11 морфометрических признаков и 10 индексов. В выборках обнаружено преобладание особей вида *M. trossulus*. *M. galloprovincialis* в проанализированных выборках отсутствовали. Однако по локусу *Me-5* были выявлены гибридные особи со средней частотой в выборках $F_h = 9,6 \pm 3,3$ %. Подтверждена отмеченная ранее инвазия *M. galloprovincialis* в ареал местного вида *M. trossulus*. Установлено, что интенсивность инвазии год от года различается, изменяются также и доли гибридов в общей структуре комплекса *Mytilus ex. gr. edulis*. Обнаружена новая локальность, где встречаются гибриды, – бухта Лазурная (зал. Уссурийский).*

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

Genetic and morphometric analysis of mussel settlements (*Mytilidae: Mytilus ex. gr. edulis*) from Primorye waters: research of population differentiation in a hybrid zone. N.A. MASALKOVA (A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok), Yu.Ph. KARTAVTSEV (A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok; Far Eastern Federal University, Vladivostok), O.V. CHICHVARKHINA (A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok).

*Based on variability of 4–6 allozyme loci, DNA marker *Me-5*, 11 morphometric traits and 10 indices, genetic variability of mussels *Mytilus ex. gr. edulis* from the area of hybridization between *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*, is studied in the Peter the Great Bay of the west-pacific part of the Sea of Japan. Among the samples gathered there was prevalence of local species *M. trossulus*. No *M. galloprovincialis* individuals were detected. However, data obtained at *Me-5* evidenced on the presence of hybrids with average proportion $F_h = 9.6 \pm 3.3$ %. Data obtained confirmed the continuation of the invasion of *M. galloprovincialis* in the area of local species *M. trossulus*. Analysis of literature sources proved that intensity of invasion varied from year to year and the hybrid shares in the whole structure of the complex *Mytilus ex. gr. edulis* were also changed. New locality was obtained that inhabited by hybrid individuals – the Lazurnaya Inlet (the Ussuri Bay).*

Key words: mussels, hybrid zone, DNA markers, allozyme variability.

МАСАЛЬКОВА Наталья Александровна – аспирант (Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток), *КАРТАВЦЕВ Юрий Федорович – доктор биологических наук, профессор (Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток), ЧИЧВАРХИНА Ольга Владимировна – младший научный сотрудник (Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: yuri.kartavtsev48@hotmail.com

Исследование поддержано грантом РФФИ 14-04-00758, а также грантом РНФ (соглашение № 14-50-00034) в части молекулярной систематики морских организмов, а также грантом РФФИ 15-29-02456-офи в части исследований генетических основ биоразнообразия.

Двустворчатые моллюски рода *Mytilus* семейства Mytilidae широко распространены по всему земному шару, являются объектами исследований в разных дисциплинах биологии и используются в промысле и марикультуре. Именно поэтому их генетическое исследование имеет первостепенное значение. Однако для видов, относящихся к комплексу *Mytilus* ex. gr. *edulis* [13] (*Mytilus trossulus*, *M. galloprovincialis* и *M. edulis*), идентификация по морфологическим признакам затруднена и реально диагностическими являются только генетико-биохимические и молекулярно-генетические признаки. Анализ генетико-биохимических маркеров для этих видов, будучи быстрым и дешевым, используется традиционно. Анализ молекулярных ДНК-маркеров более дорогой, но обладает большим диагностическим потенциалом.

Исследование мидий становится особенно актуальным из-за инвазии атлантического вида *M. galloprovincialis* в зал. Петра Великого Японского моря, населенный тихоокеанской мидией *M. trossulus*. Судя по предыдущим исследованиям, вселение атлантического вида скорее всего произошло не позднее 1970-х годов. Существование здесь гибридных особей обнаружилось в 1990-е годы [11, 25]. Таким образом, возникли вопросы о существовании гибридной зоны, ее стабильности, размерах, взаимодействии двух форм и интрогрессии генов.

Таксономический статус трех номинальных видов комплекса *Mytilus* ex. gr. *edulis*, гибридизация которых наблюдается в зонах контакта их ареалов, обсуждается до сих пор. На данный момент ранг вида генетически обоснован для *M. trossulus*, тогда как два других номинальных вида определены в статусе полувидов [25].

В настоящее время виды комплекса, включая *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*, образуют гибридные поселения в северных и других районах Тихого океана [5, 11, 21, 23, 25]. Вопросы таксономии и генетики этих видов подробно исследованы в восточных акваториях (Калифорния и зал. Пьюджет-Саунд) [14, 15, 21, 30] и не столь детально в западных районах океана [13, 25]. Хорошо изучено распространение *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* и их гибридов вдоль островов Хонсю и Хоккайдо [17, 23], в то же время сведений о генетической и морфометрической дифференциации и динамике гибридизации вдоль западного побережья Японского моря, в том числе в зал. Петра Великого, недостаточно.

Таксономический статус трех номинальных видов комплекса *Mytilus* ex. gr. *edulis*, гибридизация которых наблюдается в зонах контакта их ареалов, обсуждался ранее [5, 12, 25, 34, 35]. Как упоминалось выше, твердо ранг биологического вида признан только за *M. trossulus* [25]. Далее необходимо решить следующие задачи: 1) уточнить таксономический ранг представителей группы с применением популяционно-генетических и молекулярно-филогенетических подходов, учитывая отсутствие четких диагностических признаков традиционной систематики, 2) проанализировать генетические процессы и морфологическую дифференциацию в гибридных зонах в связи с инвазиями, видообразованием и дальнейшим поиском дискриминирующих морфологических признаков. Комплексный подход к исследованию поселений мидии Японского моря реализуется достаточно давно [25]. Однако и сегодня он является актуальным, учитывая возможность комбинирования имеющихся данных с перспективными генетико-биохимическими и ДНК-маркерами.

Материал и методика

Материал собран в 2012–2013 гг. Детализация по размеру выборок из обследованных поселений мидии дана в подписи к рис. 1. Общее количество особей, отловленных в зал. Петра Великого и близлежащих бухтах Киевка и Преображение, составило 327.

Морфометрическое исследование основывалось на следующих процедурах:

1) корректное описание индивида по набору признаков, которые должны представлять различные морфофункциональные системы организма;



Рис. 1. Карта сбора материала в зал. Петра Великого в 2012–2013 гг. Кружками с номерами отмечены выборки из поселений мидий. Численность исследованных особей в выборках составила: 1 – 56 (зал. Восток, МБС «Восток»), 2 – 85 (зал. Восток, бухта Ливадия), 3 – 50 (бухта Киевка), 4 – 24 (зал. Посыета), 5 – 61 (бухта Лазурная), 6 – 51 (бухта Преображение)

2) представительная характеристика отдельных групп, которые нужно исследовать, т.е. сбор биологически представительного материала;

3) правильное осуществление выборочной процедуры в пространственно-временном измерении, чтобы получить количественно определяемую матрицу данных;

4) адекватный статистический анализ.

Исследование основано на общепринятых подходах [1, 2]. Особи проанализированы по 11 морфометрическим признакам (рис. 2, табл. 1) и 10 индексам. Индексы получали делением каждого из признаков на признак 1 (длину раковины). Затем индексы преобразовывали по формуле [7, 10]: $2 \arcsin \sqrt{p}$, где p – значение соответствующего индекса. Исходные признаки и преобразованные индексы стандартизировали для проведения многомерного анализа $(x_i - M)/s_x$, приведя все вариационные ряды к виду с $M = 0$, $s_x = 1$, где M – средняя арифметическая, s_x – стандартное отклонение.

Анализ изменчивости частот генотипов и аллелей проведен по 4–6 аллозимным локусам и *Me-5* – маркеру ядерной ДНК (ген прикрепительного белка нитей биссуса). Исследованы следующие аллозимные маркеры ферментных локусов: фосфоглюкомутазы (ФГМ, *PGM-1**, КФ 5.4.2.2), глюкозофосфатизомеразы (ГФИ, *GPI**, КФ 5.3.1.9), аспаратаминотрансферазы (ААТ, *AAT-1**, КФ 2.6.1.1), октопиндегидрогеназы (ОНДГ, *ODH**, КФ 1.5.1.11), маннозофосфатизомеразы (МФИ, *MPI**, КФ 5.3.1.8) и лейцинаминопептидазы (ЛАП, *LAP**, КФ 3.4.11.1). Эти локусы являются полудиагностическими для дискриминации *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* [5, 8, 19]. Изученный маркер ядерной ДНК, локус *Me-5*, является диагностическим для дискриминации двух видов. На основании генотипирования особей по всем описанным локусам оценены доли встречаемости аборигенного вида, гибридов и интродуцентов (представителей инвазивной формы *M. galloprovincialis*) в выборках из исследованных районов.

Анализ аллозимных маркеров. Для анализа аллозимных маркеров использовали 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 %-ном крахмальном геле. При электрофорезе применяли трис-малеатную (рН 7,4) и трис-цитратную (рН 8,0) буферные системы. Продолжительность электрофореза составляла 13–19 ч при постоянном токе 130–180 В и 20–40 мА на блок 15 см и температуре 4 °С. Специфическое

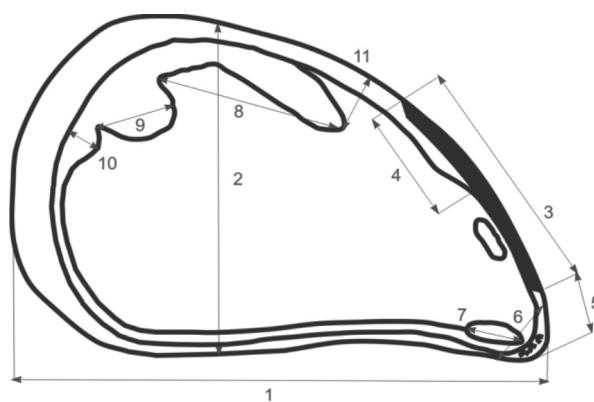


Рис. 2. Исследованные морфометрические признаки особей мидий (наименования и обозначения признаков указаны в табл. 1)

Таблица 1

Морфометрические признаки особей мидии, исследованные в данной работе

Признак	Обозначение признака
1. Длина раковины	LENGTH
2. Высота раковины	HEIGHT
3. Длина лигамента	LIG_LN
4. Длина участка перламутрового слоя, заходящего под лигамент	PERL_L
5. Расстояние от вентрального конца лигамента до макушки раковины	LIG_T
6. Длина зубной пластинки	DENT_PL
7. Длина отпечатка переднего аддуктора	ADR_FR
8. Длина отпечатка заднего ретрактора	BAC_RT
9. Длина отпечатка заднего аддуктора	ADR_BAC
10. Максимальная ширина мантийной линии вблизи ее слияния с отпечатком заднего аддуктора	SINUS
11. Расстояние между передним краем отпечатка заднего ретрактора и дорсальным краем раковины	RETR_MN

гистохимическое окрашивание ферментных фракций в геле проводилось по описанным в литературе методикам [20, 27] с небольшими модификациями.

Для оценки видовой принадлежности отдельных особей по мультилокусным генотипам применяли программу Structure, использующую описанные ранее алгоритмы [18, 29]. При расчетах использовали следующие параметры модели: admixture, correlated allele frequencies, k: 1-5, burnin: 30 000, MCMC: 50 000–500 000; предполагались различные значения стандартизированной дисперсии частот аллелей (F_{st}) для разных субпопуляций и средние априорные $F_{st} = 0,01$ (для краткости часть параметров здесь не названа). Возможность использования указанной программы в целях описания генетической структуры популяций и оценки видовой принадлежности особей в гибридных зонах мидий по набору аллозимных локусов была показана ранее [12]. В результате анализа получено два показателя, отражающих вклад в генофонд мидии видов *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*. В сумме оба показателя дают единицу, по этой причине в дальнейших расчетах достаточно использовать один из них. Терминологически индекс по Structure используется далее как вклад *M. trossulus* в составной генотип тестируемой особи. Ферментные локусы при идентификации особей посредством этого индекса для удобства обозначали как GBL (генетико-биохимические локусы) [5].

Анализ индивидуальных индексов позволяет проводить классификацию особей на группы родительских видов и гибридов [12, 32, 33]. Как показано в литературе, границы значений индексов для разделения чистых видов и гибридов могут быть выбраны субъективно в пределах 0,08–0,95 [32, 33]. В данной работе особь относили к *M. trossulus*, если ее индекс по Structure попадал в диапазон значений 0,6–1,0, т.е. вклад *M. trossulus* в генотип этой особи составлял 60 % и более. За вид *M. galloprovincialis* признавались особи со значениями индивидуальных индексов от 0 до 0,1 (вклад *M. trossulus* в генотип не более 10 %). Особи с индексом по Structure $\geq 0,1$ и $< 0,6$ классифицировались как гибриды. На основании этих данных мы рассчитывали частоты родительских и гибридных генотипов в исследованных выборках.

Анализ ДНК-маркера. Для анализа *Me-5* использовали следующие методики. Тотальную ДНК выделяли из жаберных пластинок, фиксированных в 95 %-ном этиловом спирте методом HotSHOT [11] или по стандартной методике [9] с небольшими модификациями, состоявшими в удалении фенола из протокола и добавлении рибонуклеазы. Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей дистиллированную воду – 2,3 мкл, 10 × буфер (Evrogen) – 1,0 мкл; смесь dNTP (концентрация каждого трифосфата – 2,5 мМ, Evrogen) – 1,0 мкл; 25 мМ MgCl₂ – 0,6 мкл; праймеры (5 пмоль/мкл) – по 1,0 мкл; Taq-полимераза (5 ед/мкл, Evrogen) – 0,1 мкл; ДНК – 1,0 мкл. Полимеразная цепная реакция проводилась при следующих условиях: предварительная денатурация при 94 °С в течение 1 мин; далее для 30 циклов: денатурация при 92 °С в течение 30 с, отжиг при 53 °С в течение 60 с, синтез при 75 °С в течение 1 мин; заключительный цикл реакции при 75 °С в течение 5 мин. В качестве специфических использовали праймеры для гена *Me-5* прикрепительного белка (прикрепительный полифенольный белок, образующий клеящие нити биссуса у мидий): Me15 5'-CCAGTATACAAACCTGTGAAAA-3' и Me16 5'-TGTTGTCTTAATAGGTTTGTAAAGA-3' [23]. Идентификация особей и классификация генотипов выполнены с помощью электрофореза в 2 %-ном агарозном геле.

Классификация генотипов по ДНК-маркеру, имеющему только два аллеля, каждый из которых типичен для одного из родительских видов (условно аллель 1 и аллель 2), проводилась следующим образом: генотип 2-2 – *M. trossulus*, 1-2 – гибриды и 1-1 – *M. galloprovincialis* (в материалах нашего исследования не обнаружен). На основании полученных данных были рассчитаны доли встречаемости аборигенного вида, гибридов и интродуцентов.

Далее сравнивались данные, полученные по разным типам маркеров. При сопоставлении оценивали стандартные ошибки средних значений и отклонения в пределах доверительных интервалов. Расчеты частот генотипов, частот аллелей и других характеристик изменчивости выполнены с помощью пакета программ SPECSTAT [26]. С использованием программы Statistica 6 (www.statsoft.com) проведен дисперсионный, а также многомерный анализ морфометрической изменчивости.

Результаты исследований

В целом проанализирована изменчивость 6 аллозимных локусов и ДНК-маркера *Me-5* в изученных нами выборках. По аллозимным локусам выявлено наличие до 7 аллелей, по *Me-5* внутривидовой изменчивости не обнаружено, т.е. у каждого номинального вида имеется по 1 фиксированному аллелю, отличающемуся от аллелей других видов. Распределение частот наиболее распространенных аллелей для каждого GBL показано на рис. 3. Частоты аллелей свидетельствуют о наличии статистически существенной генетической неоднородности выборок по трем из шести локусов (рис. 3, см. значения хи-квадрат).

По итогам экспериментальной работы в табл. 2 представлена оценка доли генотипов вида *M. trossulus* и гибридов в исследованных выборках по комплексу аллозимных

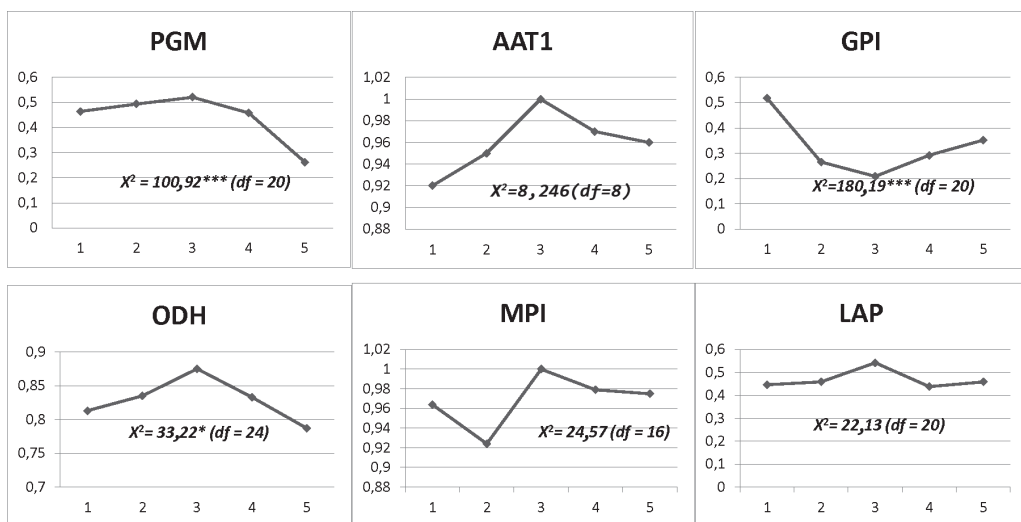


Рис. 3. Распределение частот наиболее распространенных аллелей для каждого исследованного локуса. 1–5 – номера выборок особей из поселений мидий (см. табл. 2). Звездочками отмечены статистически существенные различия частот в выборках: * $P < 0,05$; *** $P < 0,01$

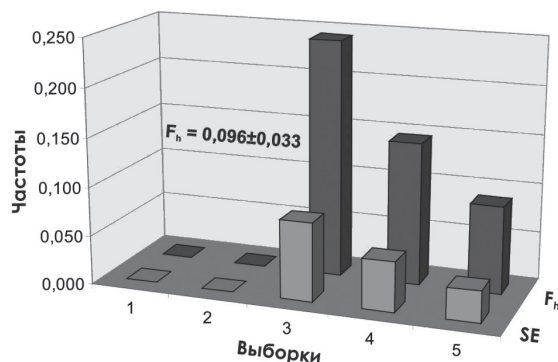


Рис. 4. Распределение доли гибридных особей (F_h) в исследованных выборках мидий (см. табл. 2) по ДНК-маркеру *Me-5*. На графике указано среднее значение $F_h = 9,6\%$ для всех выборок

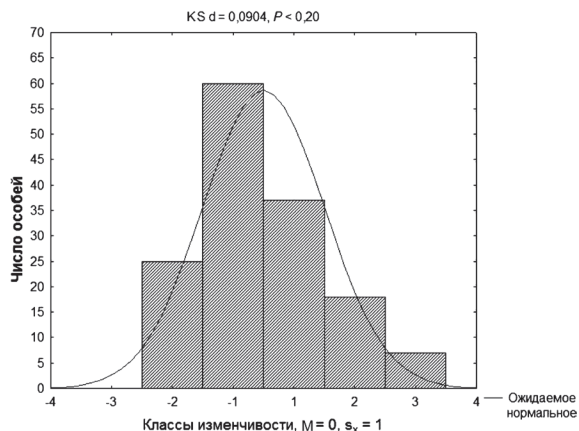


Рис. 5. График оценки нормального распределения признака длина лигамента в исследованных выборках мидий

локусов (*GBL*) и *Me-5* (особи инвазивного вида не встречены). Распределение долей (частоты встречаемости) гибридных генотипов (F_h) в исследованных выборках и их стандартные ошибки (SE) на основе *Me-5* показаны на рис. 4.

Анализ морфологических признаков показывает, что вариационные ряды в основном не отклоняются значительно от нормального распределения по критерию Колмогорова–Смирнова (*KS*) и главное – имеют одномодальное распределение, что показано на примере признака длины лигамента (рис. 5). Коэффициенты асимметрии и эксцесса, а также морфологические индексы тоже имеют нормальное или близкое к нормальному распределение (табл. 3).

О соотношении морфологических различий поселений мидий можно судить по итогам дискриминантного анализа. Распределение особей во всех исследованных нами выборках по значениям канонических переменных (КП 1, КП 2 и КП 3), оценивающих в дискриминантном анализе интегральную картину дифференциации, показано на рис. 6, 7. В случае 6 выборок анализ включал 11 признаков, 10 индексов и

Таблица 2

Экспериментальная оценка доли генотипов *Mytilus trossulus* и их гибридов в исследованных выборках по комплексу аллозимных локусов (GBL) и молекулярному маркеру (Me-5)

Поселения мидий	<i>M. trossulus</i>		Гибриды	
	GBL	Me-5	GBL	Me-5
1. Зал. Восток, МБС «Восток»	0,810 ± 0,050	1	0,190 ± 0,050	0
2. Зал. Восток, бухта Ливадия	0,990 ± 0,010	1	0,010 ± 0,010	0
3. Зал. Посъета, пос. Зарубино	0,030 ± 0,030	0,758 ± 0,030	0,970 ± 0,030	0,242 ± 0,002
4. Бухта Киевка	0,410 ± 0,070	0,854 ± 0,051	0,590 ± 0,070	0,146 ± 0,051
5. Бухта Лазурная	0	0,910 ± 0,032	0	0,090 ± 0,032
Средняя ± ошибка	0,448 ± 0,020	0,914 ± 0,033	0,552 ± 0,020	0,096 ± 0,033

Примечание. При значении доли 0 или 1 стандартные ошибки не рассчитываются.

Таблица 3

Характеристики вариационных рядов основных морфометрических признаков особей мидий

Признак	Коэффициент асимметрии (As)	SE	Коэффициент эксцесса (Ex)	SE
LENGTH	0,28	0,28	0,08	0,27
HEIGHT	0,69	0,69	0,85	0,27
LIG_LN	0,21	0,21	-0,13	0,27
PERL_L	0,35	0,35	0,08	0,27
LIG_T	1,02	1,02	2,1	0,27
DENT_PL	0,57	0,57	0,02	0,27
ADR_FR	0,93	0,93	1,74	0,27
BAC_RT	0,49	0,49	0,33	0,27
SINUS	0,75	0,75	1,42	0,27
ADR_BAC	0,62	0,62	0,2	0,27
RETR_MN	3,13	3,13	25,15	0,27
IND1	0,56	0,56	2,53	0,27
IND2	0,34	0,34	-0,26	0,27
IND3	0,19	0,19	-0,21	0,27
IND4	-0,2	-0,20	2,31	0,27
IND5	0,36	0,36	0,13	0,27
IND6	0,18	0,18	0,01	0,27
IND7	0,46	0,46	1,24	0,27
IND8	-1,19	-1,19	3,11	0,27
IND9	0,28	0,28	3,29	0,27
IND10	0,73	0,73	2,37	0,27

значения кодов генотипов по 4 локусам: *PGM-1**, *ODH**, *MPI**, *LAP**, а особи соответственно группировались по принадлежности к 6 различным выборкам.

По значениям комплекса признаков для 5 выборок, 10 индексов и 6 локусов выявлены кластеры особей, которые пересекаются (на рис. 6, 7 показаны ломаными линиями), что свидетельствует о наличии значительного сходства проанализированных особей в выборках из поселений мидий. Наиболее обособлены выборки из зал. Посъета (в районе пос. Зарубино), где ранее было обнаружено большое число особей вида интродуцента [5], и бухты Преображение (рис. 6).

В результате анализа векторов генотипов по комплексу из 6 аллозимных локусов для 5 поселений была выявлена высокая общность по происхождению комбинированных

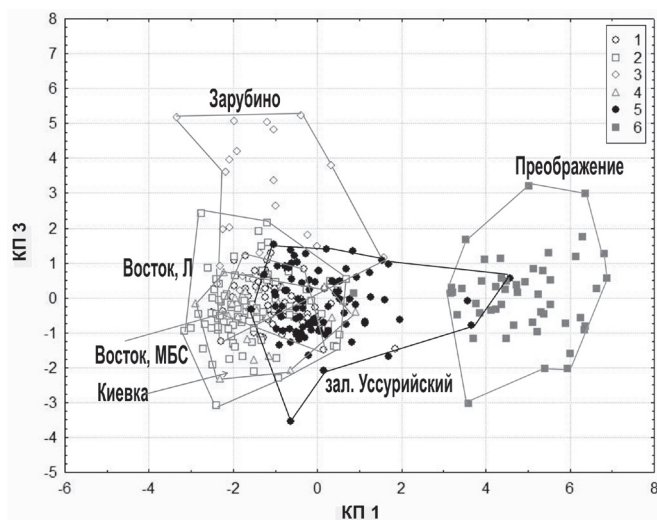


Рис. 6. График распределения значений координат для двух канонических переменных (КП 1 и КП 3) для изученных поселений мидий западной части Японского моря. Усл. обозначения: 1–6 – номера выборок из поселений мидий, указанных на рис. 1

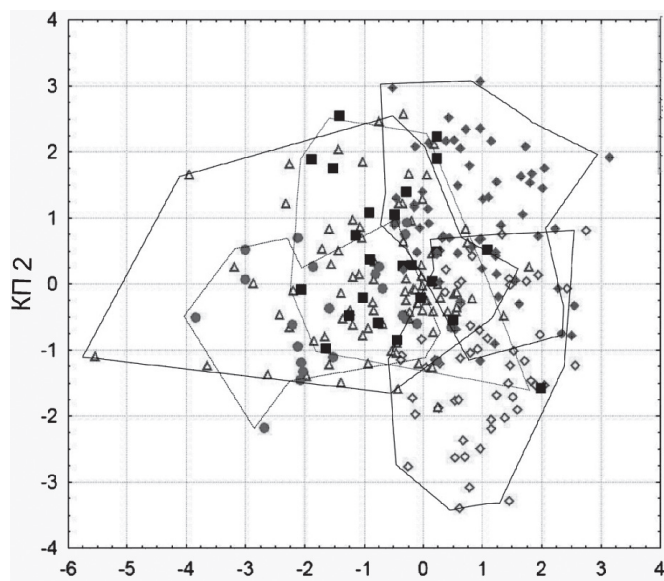


Рис. 7. Распределение значений канонических переменных (КП 1, КП 2) для модифицированных значений генотипов 6 аллозимных локусов и 10 морфологических индексов исследованных мидий из 5 выборок. В таблице показана точность дискриминации выборок по комплексу представленных признаков

Обозначения	ПОПУЛЯЦИИ	Точность классификации, %	КП 1				
			1	2	3	4	5
◇	зал. Восток, 1	71,4	40	8	0	1	7
△	б. Ливадия, 2	87,0	5	74	2	2	2
●	з. Посьета, Зарубино	66,6	2	6	16	0	0
■	б. Киевка, 4	54,2	2	9	0	13	0
◆	б. Лазурная, 5	83,6	7	2	1	0	51
	СУММАРНО	77,6	56	99	19	16	60

генотипов и слабая генетическая дифференциация проанализированных выборок из поселений мидий в зал. Петра Великого.

Обсуждение результатов

Оценки вероятностей происхождения или гибридных индексов, полученные с помощью программы Structure, как и любые другие результаты моделирования,

базируются на ряде допущений. Поэтому их интерпретация требует известной осторожности. Полученные доли генотипов представлены в табл. 2 по отдельности для двух групп – *M. trossulus* и гибридов *M. trossulus* × *M. galloprovincialis*. Даже на основе визуального анализа генотипической идентификации исследованных мидий можно заметить слабую воспроизводимость данных по разным группам маркеров. Средние частоты встречаемости, определенные по *Me-5*, показывают, что в выборках преобладают особи аборигенного вида *M. trossulus* (91 ± 3 %), тогда как по оценке на основе GBL доля этого вида равна 45 ± 2 %. Результаты оценки генотипов по происхождению для 6 условно диагностических GBL показывают необходимость использования большего числа маркеров. Данные по 8 локусам свидетельствуют о хорошем совпадении оценок разных групп маркеров [5].

Установлена слабая генетико-морфометрическая дифференциация исследованных поселений мидий в зал. Петра Великого. Например, усредненная по 8 локусам и взвешенная по проанализированному набору из 6 выборок стандартизованная, нормализованная дисперсия частот аллелей F'_{st} [28] в 2011 г. составляла $0,0473 \pm 0,0559$ [5], а в 2012–2013 гг. среднее значение F'_{st} для 6 локусов из 5 выборок было равно $0,0379 \pm 0,0330$ (среднее рассчитано по F'_{st} отдельных локусов; из стандартных ошибок следует практически нулевая суммарная генетическая дифференциация). Однако пусть небольшая, но статистически значимая генетическая дифференциация поселений мидий все же наблюдается. В тесте хи-квадрат значимой является гетерогенность частот аллелей трех из шести локусов (рис. 3). Эта дифференциация имеет сложную природу и неодинакова для разных локусов. По-видимому, она складывается из генетического дрейфа, присутствующего в любых природных популяциях, и естественного отбора, частично нивелируемых миграцией между поселениями. При этом отдельные локусы демонстрируют высокую гетерогенность частот генотипов и аллелей. Данные об относительно низкой генетической дифференциации поселений мидий в зал. Петра Великого были известны и ранее [3, 4]. Это связано с большим потоком генов между поселениями мидий, представляющими собой субпопуляции подразделенной популяции за счет планктонирующих в течение 20–30 дней личинок и их разноса течениями на большие расстояния [3, 4]. Данные по разным типам маркеров показывают, что при гибридизации у мидий генетические компоненты могут вести себя несогласованно. Это известно и для Балтийского моря, где гибридизация в течение нескольких лет привела к интрогрессии генов североморской *M. edulis* в геном балтийской *M. trossulus*. Следует отметить, что интрогрессия выявлена преимущественно по митохондриальным генам, а по ядерным маркерам выражена в меньшей степени [16, 31]. Обнаружение же согласованной изменчивости по разным типам маркеров у гибридизующих мидий из Японского моря, описанной ранее [5], – одно из свидетельств относительно низкого текущего уровня инвазии *M. galloprovincialis* и гибридизации *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* в этом регионе.

Если исключить выборку мидий из поселения близ пос. Преображение, представленную на рис. 6, то дифференциация по комплексным переменным, включающим значения КП по 10 индексам и 6 локусам, принципиально не меняется, хотя точность дискриминации немного снижается (рис. 7). Для 6 выборок и большего числа анализируемых морфологических признаков и индексов она составила 87 %. Как видно из рис. 7, мидии в 5 выборках слабо различаются между собой по комплексу GBL и 10 морфометрическим индексам. Добавление признаков вносит вклад в итоговую дифференциацию, по-видимому, за счет экологических факторов, определяющих рост моллюсков. Максимальная точность дискриминации выборок не превышает 87 %, а средняя равна 77,6 %. Эти данные согласуются с представленным выше популяционно-генетическим анализом и поддерживаются результатами моделирования генотипической дифференциации в предположении существующего смешения (admixture) или потока генов. Размер этой межвидовой миграции генов (интрогрессии) предстоит оценить в будущем.

Полученные результаты в целом соответствуют данным предыдущих исследований [8, 11, 25] и оценкам на основе ДНК-маркера *Me-5*. Средняя частота встречаемости генотипов

M. trossulus при оценке по *Me-5* составила $91,4 \pm 3,3$ %. Доля этих генотипов в большинстве выборок колебалась в пределах 76–100 %. В выборке из зал. Посыета близ пос. Зарубино доля вида снижается до 75,8 %. В этой же выборке обнаружена максимальная доля гибридов (24,2 %). В выборках из бухт Киевка и Лазурная отмечено достаточно много гибридных генотипов – 14,6 и 9,0 % соответственно (табл. 2, рис. 4).

Данные анализа подтверждают ранее высказанное предположение о мозаичном характере распределения исследуемых видов мидий [5]. Скорее всего, эта мозаичность обусловлена векторами расселения *M. galloprovincialis*. Возможна инвазия *M. galloprovincialis* из Южной Кореи в пос. Зарубино через паром и суда, которые, как известно, могут обрастать мидиями. Довольно неожиданным является обнаружение гибридных особей в бухтах Киевка и Лазурная. Источник инвазии *M. galloprovincialis* в эти районы не вполне ясен, хотя допускается влияние иммиграции через обрастание судов, заходящих на отстой после посещения ими портов Японии и Республики Корея непосредственно в бухту Киевка или порт г. Большой Камень (на противоположной от порта стороне Уссурийского залива находится бухта Лазурная). Распространение *M. galloprovincialis* во многих случаях ограничено температурным фактором (см. [22]). По данным предыдущих исследований [6, 11, 24], южная часть зал. Петра Великого предположительно является северной границей распространения этого вида в западной части Японского моря. Тем не менее результаты как данной, так и предыдущей работы [5] показывают, что граница ареала *M. galloprovincialis* пролегает севернее (бухта Киевка) и что появился новый очаг инвазии (бухта Лазурная). Ясно, что интенсивность инвазии год от года различается, изменяются также и доли гибридов в общей структуре комплекса *Mytilus* ex. gr. *edulis*. Так, доля гибридов в зал. Восток изменяется следующим образом: в 1999 г. – $8,95 \pm 1,68$ % [11], в 2003 г. – $1,60 \pm 0,90$ % [24], в 2011 г. – 0 % [5], в 2012–2013 гг. (данные, полученные в настоящей работе) – 0 %.

Выводы

Из полученных результатов следует, что в выборках преобладает местный вид *M. trossulus*, однако инвазия *M. galloprovincialis* сохраняется. Преобладающая интрогрессия генов местного вида в генофонд вселенца в водах зал. Петра Великого [25] позволяет надеяться на минимальный генетический ущерб местным популяциям *M. trossulus*. Тем не менее ситуация может измениться, поэтому генетический мониторинг зоны гибридизации и оценивание в динамике уровня интрогрессии генов необходимы и в будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев В.Л. Классификационные построения в экологии и систематике. М.: Наука, 1980. 142 с.
2. Аффифи А., Эйзен С. Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ. М.: Мир, 1982. 488 с.
3. Картавец Ю.Ф. Аллозимный полиморфизм у двух видов мидий // Генетика и размножение морских животных. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1981. С. 36–38.
4. Картавец Ю.Ф., Заславская Н.И. Генетическая структура, факторы интеграции и дифференциации популяций обыкновенной мидии (*Mytilus edulis*) // Генетика. 1982. Т. 18, № 10. С. 1653–1666.
5. Картавец Ю.Ф., Католикова М.В., Шарина С.Н., Чичвархина О.В., Масалькова Н.А. Популяционно-генетическое исследование зоны гибридизации *Mytilus trossulus* и инвазивного вида *M. galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae) в заливе Петра Великого Японского моря // Биология моря. 2014. № 3. С. 220–228.
6. Кепель А.А., Озолинш А.В. Морфометрический анализ мидий рода *Mytilus* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) морей СССР // Зоол. журн. 1992. Т. 71, № 9. С. 33–40.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1980. 293 с.
8. МакДональд Дж.Х., Коуэн Р.К., Балакирев Е.С., Манченко Г.П., Пудовкин А.И., Сергиевский С.О., Крутовский К.В. Видовая принадлежность «съедобной мидии», обитающей в приазиатской части Тихого океана // Биология моря. 1990. № 1. С. 13–22.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: пер. с англ. М.: Мир, 1984. 480 с.

10. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Высш. школа, 1973. 326 с.
11. Скурихина Л.А., Картавец 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.
12. Стрелков П.П., Католикова М.В., Лайус Д.Л., Андреев В.М., Федюк М.Л. Дискриминация беломорских мидий *Mytilus edulis* L. и *M. trossulus* Gould // Вестн. СПбГУ. 2008. Сер. 3. Вып. 4. С. 77–82.
13. Чичвархин А.Ю., Картавец 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.
14. Anderson A.S., Bilodeau A.L., Gilg M.R., Hilbish 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.
15. Borsa P., Daguin C., Caetano S.R., Bonhomme F. Nuclear-DNA evidence that northeastern Atlantic *Mytilus trossulus* mussels carry *M. edulis* genes // J. Molluscan Stud. 1999. Vol. 65. P. 504–507.
16. Brannock P.M., Wethey D.S., Hilbish 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.
17. 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.
18. Gosling E.M. Genetics of Mytilus // The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. B.V., 1992. Chapt 7. P. 309–382.
19. Harris H., Hopkinson D.A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1976. 680 p.
20. Heath D.A., Rawson P.D., Hilbish 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.
21. Hilbish T.J., Brannock P.M., Jones K., Smith A.B., Bullock B.N., Wethey D.S. 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.
22. Inoue K., Odo S., Nakao S., Takeyama S., Yamaha E., Yamazaki F., Harayama S. A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers // Mar. Biol. 1997. Vol. 128, N 1. P. 91–95.
23. Ivanova M.B., Lutaenko K.B. On the distribution of *Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819 (Bivalvia, Mytilidae) in Russian Far Eastern seas // Bull. Inst. Malacology. 1998. Vol. 3 (5). P. 67–71.
24. Kartavtsev Yu.Ph., Chichvarkhin A.Y., Gubanova N.V., Kijima A., Hanzawa N., Park I.-S. Allozyme and morphometric research on two common mussel species of *Mytilus genus* (Mollusca, Mytilidae) in Korea, Japan and Russian waters // Korean J. Genetics. 2005. Vol. 27 (4). P. 289–306.
25. Kartavtsev Yu.Ph., Soloviev A.A. SPECSTAT: Computer software for the statistical data analysis in the field of allozyme genetics // Genetica. 1993. Vol. 88. P. 79–82.
26. Manchenko G.P. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. Boca Raton: CRC Press, 2002. 592 p.
27. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. Vol. 89. P. 583–590.
28. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data // Genetics. 2000. Vol. 155. P. 945–959.
29. Rawson P.D., Argawal 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 (1). P. 201–211.
30. Riginos C., Cunningham C.W. Local adaptation and species segregation in two mussels (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) hybrid zones // Mol. Ecol. 2005. Vol. 14 (2). P. 381–400.
31. 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. Evolutionary Biol. 2009. Vol. 22 (1). P. 27–35.
32. Roberts D.G., Gray C.A., West R.J., Ayre D.J. Marine genetic swamping: hybrids replace an obligately estuarine fish // Molecular Ecol. 2010. Vol. 19 (3). P. 508–520.
33. Śmietanka B., Burzynski A., Hummel H., Wenne R. Glacial history of the European marine mussels *Mytilus*, inferred from distribution of mitochondrial DNA lineages // Heredity (Edinb). 2014. Vol. 113, N 3. P. 250–258.
34. Śmietanka B., Zbawicka M., Sańko T., Wenne R., Burzyński A. Molecular population genetics of male and female mitochondrial genomes in subarctic *Mytilus trossulus* // Mar. Biol. 2013. Vol. 160, N 7. P. 1709–1721.
35. Sokal R., Sneath P. Principles of Numerical Taxonomy // J. Basic Microbiol. 1966. Vol. 6, N 2. P. 139–140.