

УДК 574.3

П. П. Стрелков, М. В. Католикова, Д. Л. Лайус, В. М. Андреев, М. Л. Федюк

**ДИСКРИМИНАЦИЯ БЕЛОМОРСКИХ МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* L.
И *M. TROSSULUS* GOULD.***

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра ихтиологии и гидробиологии

Введение. Мидии *Mytilus edulis* и *M. trossulus* — близкие виды, сходные по морфологии, но различаемые по молекулярно-генетическим признакам. В Северной Атлантике ареалы двух видов отчасти перекрываются, они вступают в интрогрессивную гибридизацию. Происходит это, в частности, и в Белом море ([8, 6] и наши неопубликованные данные). Существует проблема различения особей и популяций двух видов. Дискриминация особей по морфологическим признакам ненадежна, к тому же требует трудоемкого анализа скульптуры внутренней поверхности створок [4]. Наличие в смешанных поселениях гибридов разных поколений делает 100%-ную дискриминацию теоретически невозможной даже по генетическим признакам. Задача данного исследования — отработать методы идентификации поселений и особей *M. edulis* и *M. trossulus* в Белом море. В работе апробируется метод анализа таксономической структуры выборок и классификации особей на родительские формы и гибриды по мультилокусным данным, метод разработан Д. Притчардом и соавторами [5]. Также проверяются гипотезы о том, что частоты морф окраски эпителия ноги и структуры раковины — степени развития перламутрового слоя в районе лигамента, являются маркерами присутствия *M. edulis* и *M. trossulus* в поселениях.

Материалы и методы исследования. Материал — семь выборок из окрестностей пос. Умба (Кандалакшский берег). В этом районе мидии образуют крупнейшие скопления в Белом море [2]. Наш материал — выборки с больших мидиевых банок из губ Падан, Умба и Малая Пирья и из разреженных литоральных поселений губ Большая Пирья и Малая Пирья (табл. 1 и рис. 1). Все мидии были генотипированы по аллозимным локусам эстеразы (*Est*), октопиндегидрогеназы (*Odh*), глюкозофосфатизомеразы (*Gpi*) и фосфоглюкомутазы (*Pgm*). Различия по частотам аллелей между *M. edulis* и *M. trossulus* по этим признакам составляют 57–87 % [7]. У части генотипированных моллюсков были определены окраска эпителия ноги и степень развития перламутрового слоя раковины в районе лигамента. Эти признаки демонстрируют у мидий качественную изменчивость, для них разработаны системы морф. Ранее высказывались предположения, что частоты морф у *M. edulis* и *M. trossulus* могут различаться [3, 1]. По окраске ноги различали морфу *purp* — однотонная черно-бурая окраска и «прочие», по строению раковины различали морфы *perl* — перламутровый слой развит вдоль всей длины лигамента, *prism* — перламутровый слой вдоль всей длины лигамента не развит и «прочие» — промежуточные варианты, когда перламутровый слой развит под лигаментом лишь частично (рис. 2).

Классификация мультилокусных генотипов проводилась с помощью компьютерной программы «Structure», использующей метод Д. Притчарда и соавторов [5]. Метод оценивает в выборке отклонения от ожидаемого при случайной рекомбинации аллелей по одним и тем же локусам и по разным локусам. На основании значений отклонений реконструирует частоты аллелей в гипотетических родительских популяциях и оценивает вклад генофондов этих популяций в индивидуальные генотипы.

* Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 04–04–57808 и 08–04–01315).

© П. П. Стрелков, М. В. Католикова, Д. Л. Лайус, В. М. Андреев, М. Л. Федюк, 2008

Частоты аллелей *M. trossulus*, генотипов, выявленных «Structure», морф окраски эпителия ноги и структуры раковины в выборках мидий из района Умбы (приведены объемы выборок (N))

Губа	Падан	Умба	Малая Пирья		Большая Пирья		
Выборка	Пдн	Умб	Мпк	Мпу	Бпу	Бпк	Бпс
<i>Odh</i>	0,10	0,00	0,03	0,60	0,06	0,40	0,16
<i>Pgm</i>	0,04	0,00	0,00	0,54	0,03	0,29	0,08
<i>Gpi</i>	0,11	0,11	0,05	0,81	0,14	0,45	0,19
<i>Est</i>	0,08	0,09	0,05	0,73	0,09	0,41	0,15
« <i>edulis</i> »	0,69	0,82	0,85	0,11	0,71	0,43	0,70
« <i>trossulus</i> »	0,00	0,00	0,00	0,63	0,02	0,30	0,08
«гибриды»	0,31	0,18	0,15	0,27	0,27	0,28	0,23
<i>N</i>	36	33	20	64	45	40	40
<i>Purp</i>	0,50	0,64	0,47	0,80	0,55	0,65	0,73
Прочие	0,50	0,36	0,53	0,20	0,45	0,35	0,27
<i>N</i>	36	33	15	40	44	23	37
<i>Perl</i>	0,59	0,41	0,21	0,02	0,37	0,09	0,27
<i>Prism</i>	0,00	0,00	0,05	0,95	0,00	0,36	0,03
Прочие	0,41	0,59	0,74	0,02	0,63	0,55	0,70
<i>N</i>	32	32	19	44	41	22	37

Генотипы классифицировались на группы «*edulis*», «*trossulus*» и «гибриды», к последней относили особей, у которых вклад каждого из родительских видов превышал 5 %. Эти группы сравнивались по частотам морф.

Корректность результатов анализа «Structure» оценивалась следующим образом. Во-первых, рассчитанные программой частоты аллелей в гипотетических родительских популяциях сопоставлялись с данными по «чистым» популяциям *M. edulis* и *M. trossulus* Северного и Балтийского морей (данные из работы [7]). Во-вторых, оценки вклада родительских видов в генотипы особей сопоставлялись со значениями гибридного индекса «доля аллелей *M. trossulus*» (подробнее см. результаты). Наконец, совместному анализу были подвергнуты наши выборки из окрестностей Умбы и из «чистых» популяций (наши неопубликованные данные). Это было сделано для того, чтобы понять, насколько правильно классифицируются особи из «чистых» популяций.

Результаты исследования. Частоты аллелей и морф в выборках приведены в табл. 1 и на рис. 1. Для удобства аллели по каждому из локусов объединены в две синтетические аллели — одна характерная для *M. edulis*, другая для *M. trossulus*. Объединение аллелей проведено согласно [7], что полностью согласуется с наблюдаемыми в нашем материале особенностям варьирования частот аллелей между выборками. Аллели, объединенные в синтетическую аллель *M. trossulus*, положительно коррелируют друг с другом и отрицательно — с остальными аллелями, объединенными в синтетическую аллель *M. edulis*.

Выборки гетерогенны по частотам аллелей, морф окраски и структуре раковины. Изменчивость между признаками в целом является согласованной. Высокие положительные значения коэффициента корреляции Спирмена (r) наблюдаются между частотами синтетических аллелей *M. trossulus* по разным локусам ($r \geq 0,79$), между частотами этих аллелей и частотами *purp* ($r \geq 0,71$) и *prism* ($r \geq 0,59$). Максимальные частоты синтетических аллелей *M. trossulus*, а также морф *purp* и *prism* обнаружены в выборках Мпу и Бпк, минимальные — в выборках Мпк и Умб (см. табл. 1, рис. 1).

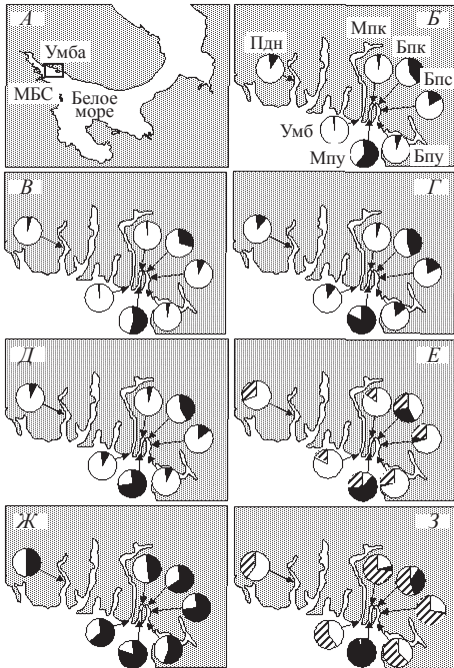


Рис. 1. Карта-схема района исследования

Названия изученных поселений мидий как в табл. 1. На диаграммах показаны частоты аллелей (Б — *Pgm*, В — *Gpi*, Г — *Est*, Д — *Odh*, черный сектор — синтетические аллели *M. trossulus*, белый — *M. edulis*), генотипов (Е, черный сектор — «*trossulus*», белый — «*edulis*», штриховка — «гибриды»), морф окраски эпителия ноги (Ж, черный сектор — *purp*, белый — «прочие») и раковины (черный сектор — *prism*, белый — *pearl*, штриховка — «прочие»).

Частоты аллелей в гипотетических родительских популяциях, выявленных «Structure», близки, хотя и не идентичны, к известным для «чистых» популяций *M. edulis* и *M. trossulus* (рис. 3, А–Г). Графики на рис. 3, Д–Е представляют другой результат анализа «Structure»: оценки вклада *M. edulis* и *M. trossulus* в генотипы особей из двух выборок с контрастной генетической структурой — Бпк и Умб. Для каждой особи также приведены значения индекса «доля аллелей *M. trossulus*». Индекс рассчитывался как доля аллелей, характерных для *M. trossulus* среди всех восьми аллелей. Видно, что с увеличением вклада *M. trossulus* значения индекса закономерно возрастают. Наблюдаемая в отдельных случаях несогласованность в первую очередь связана с тем, что разные локусы и разные аллели по одним и тем же локусам в различной степени отличают *M. edulis* от *M. trossulus*, что учитывает применяемая нами программа, но не учитывает индекс.

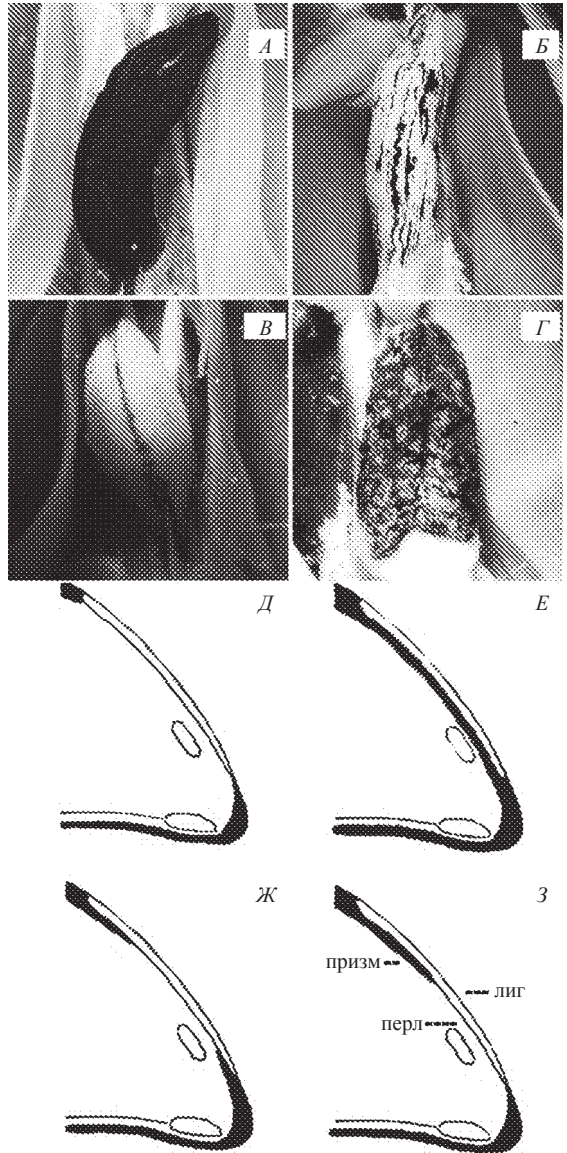


Рис. 2. Морфы окраски эпителия ноги (А — *purp*, Б–Г — прочие морфы) и структуры раковины (Д — *pearl*, Е — *prism*, Ж, З — прочие морфы) у мидий *Mytilus* spp. из окрестностей Умбы. Условные обозначения: лиг — лигамент, призм — призматический слой, перл — перламутровый слой раковины.

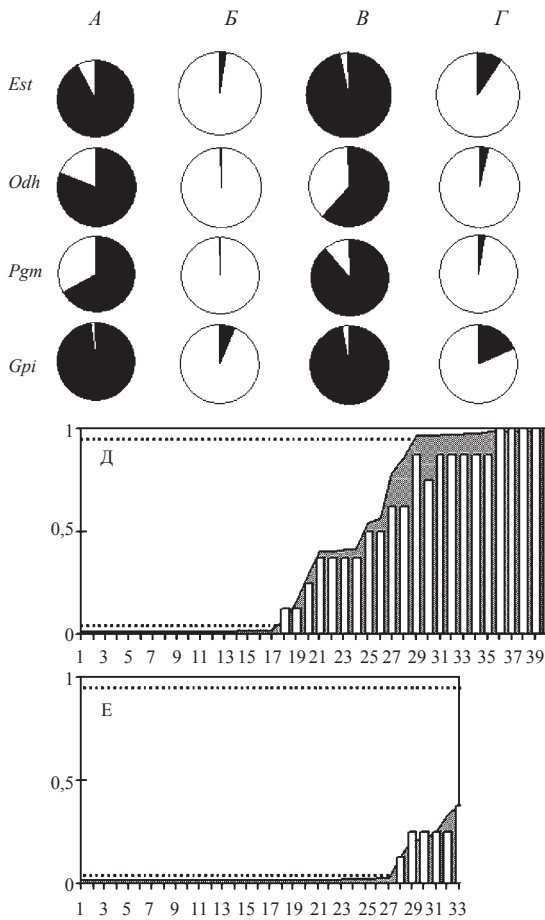


Рис. 3. Частоты синтетических аллелей *M. trossulus* (черный сектор) и *M. edulis* (белый сектор) в гипотетических родительских популяциях, реконструированных «Structure» (А, Б) и в европейских популяциях *M. trossulus* (В) и *M. edulis* (Г)

Примеры классификаций индивидуальных генотипов в выборках по степени вклада *M. edulis* и *M. trossulus* (Д — выборка Бпк, Е — Умб). По ОХ — порядковый номер моллюсков, ранжированных по величине вклада *M. trossulus*, по ОУ — относительный вклад *M. trossulus*, оцененный «Structure» (серый сектор) и значения индекса «доля аллелей *M. trossulus*» (столбцы).

По морфам окраски ноги значимых различий между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами не обнаружено.

Обсуждение результатов исследования. В работе впервые применен метод Притчарда и соавторов [5] для анализа структуры выборок *Mytilus*, представленных смесью разных видов и межвидовых гибридов. Этот опыт представляется успешным. Программа «Structure» позволяет выявлять таксономическую неоднородность выборок. Об этом свидетельствует сходство между реконструированными программой частотами

Свыше 95 % особей из «чистых» популяций двух видов были классифицированы программой правильно, остальные как гибриды. Важно отметить, что результаты классификации особей из популяций окрестностей Умбы в двух разных анализах — в совместном с «чистыми» популяциями и в отдельном, оказались идентичными (результат не показан).

Доля «*edulis*» и «*trossulus*» в беломорских выборках варьирует в широких пределах (7–85 % и 0–63 % соответственно), доля «гибридов» относительно постоянна (11–31 %). Максимальная частота «*trossulus*» и минимальная «*edulis*» выявлена в выборках Мпу и Бпк, в выборках Умб и Мпк ситуация обратная (см. табл. 1, рис. 1, Е).

Если рассматривать материал в целом, то оказывается, что частота *purp* выше у «*trossulus*» (89 %), чем у гибридов (63 %) и у «*edulis*» (55 %) (рис. 4, А). Еще больше различия по частотам морф структуры раковины. Доля *prism* составляет 91 % у «*trossulus*», 25 % у «гибридов» и 3 % у «*edulis*». Морфа *perl* у «*trossulus*» не обнаружена, ее частота составляет 24 % у «гибридов» и 38 % у «*edulis*» (рис. 4, Б). Исходя из этих оценок, были рассчитаны ожидаемые частоты морф в выборках (табл. 2). Сопоставление наблюдаемых частот морф структуры раковины с ожидаемыми выявило в двух случаях статистически достоверные различия. В выборке Пдн наблюдается дефицит *perl*, в Мпу — избыток *prism* и дефицит «прочих» морф структуры раковины (точный критерий Фишера, $p < 0,01$).

Таблица 2

Ожидаемые частоты морф окраски эпителия ноги
и структуры раковины в выборках мидий из района Умбы

Выборка	Пдн	Умб	Мпк	Мпу	Бпу	Бпк	Бпс
<i>Purp</i>	0,58	0,57	0,56	0,78	0,58	0,67	0,59
Прочие	0,42	0,43	0,44	0,22	0,42	0,33	0,41
<i>Perl</i>	0,33	0,35	0,35	0,09	0,33	0,23	0,32
<i>Prism</i>	0,11	0,07	0,07	0,68	0,12	0,35	0,13
Прочие	0,56	0,58	0,58	0,23	0,56	0,42	0,55

аллелей в гипотетических родительских популяциях и в популяциях европейских *M. trossulus* и *M. edulis*. Наблюдаемые различия, возможно, связаны с тем, что удаленные от Белого моря популяции Балтийского и Северного морей не могут являться в полном смысле этого слова родительскими для беломорских *M. trossulus* и *M. edulis*.

Убедительными представляются и результаты классификации особей на родительские формы и гибриды. Об этом говорит сопоставление между значениями гибридного индекса «доля аллелей *M. trossulus*» и рассчитанными программой величинами вклада *M. trossulus* и *M. edulis* в индивидуальные генотипы. Более того, у нас создалось впечатление, что «Structure» позволяет более объективно характеризовать гибридный статус особей, чем традиционные гибридные индексы. В любом случае, очевидно, что качество дискриминации зависит от качества и количества использованных признаков, а также от критерия выбора границы между «чистыми» особями и гибридами. В данной работе для анализа использованы недиагностические признаки, а границы между родителями и гибридами установлены субъективно. Полагаем, что для решения первоочередных задач исследований мидий в Белом море — изучения пространственного распределения *M. trossulus* и *M. edulis* и их экологических особенностей, этого достаточно.

Изучение пространственного распределения *M. trossulus* и *M. edulis* и их экологических особенностей не являлось целью настоящего исследования, которое было задумано как методическое и было выполнено на небольшом материале. Пока можно только сказать, что распределение частот генотипов в районе Умбы является мозаичным и что в изученном материале генотипы и аллели *M. trossulus* обнаружены с минимальной частотой в крупнейших поселениях — мидиевых банках (Пдн, Умб и Мпк).

Различать *M. trossulus* и *M. edulis* и их гибридов без генотипирования невозможно [4]. Отсюда необходимость поиска косвенных признаков, по которым можно составить предварительное представление о структуре поселений мидий. Ранее нами была высказана гипотеза о том, что *M. trossulus* и *M. edulis* различаются по частотам морф окраски ноги [3]. В свою очередь, В. Н. Золотарев и Н. М. Шурова [1] выдвинули гипотезу о том, что два вида различаются по частотам морф структуры раковины. В настоящей работе эти гипотезы впервые формально проверены. Как и предполагали авторы гипотез, повышенная частота морф *purp* и *prism* в поселениях говорит о наличии там *M. trossulus* и (или) гибридов. Признаки окраски ноги и структуры раковины можно рекомендовать для предварительного анализа структуры поселений мидий с двумя оговорками. Во-первых, генетическая структура выборок в терминах «*edulis*», «*trossulus*» и «гибриды», очевидно,

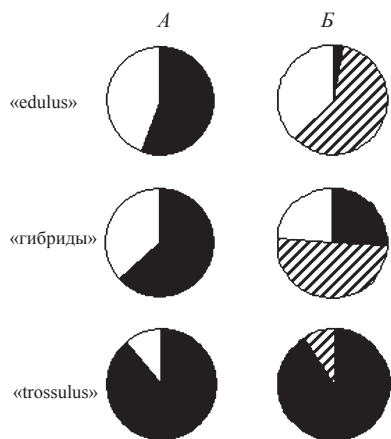


Рис. 4. Частоты морф окраски ноги (А, черный сектор — *purp*, белый — «прочие») и структуры раковины (Б, черный сектор — *prism*, белый — *perl*, штриховка — «прочие») у «*edulis*», «*trossulus*» и «гибридов»

не единственный фактор, определяющий частоты морф в поселениях. В двух случаях мы наблюдали значимые отклонения между наблюдаемыми частотами морф структуры раковины в выборках и ожидаемыми на основании знания о генетической структуре этих выборок. Во-вторых, морфологическим полиморфным признакам свойственно демонстрировать внутривидовую географическую изменчивость. Можно предположить, что частоты морф в удаленных популяциях *M. trossulus* и *M. edulis* могут быть иными, чем в районе Умбы.

Авторы благодарят Р. Вайнолу за идею исследования и методический опыт; сотрудников ББС Каргеш, Умба-Дискавери и Кандалакшского государственного заповедника за организационную помощь; Т. Дмитриеву, С. Л. и А. М. Федюк, М. М. Ганцевича, Д. В. Редькина и Г. Г. Паскерова за помощь в работе; В. М. Хайтова за интерес к работе, который во многом явился мотивацией к ее написанию.

Summary

Strelkov P. P., Katolikova M. V., Lajus D. L., Andreev V. M., Fedjuk M. L. Discrimination of *Mytilus edulis* L. and *M. trossulus* Gould White Sea mussels.

The method of Pritchard and co-authors (2000) was applied for the analysis of genetic structure of mussel populations from Umba region – area where *Mytilus edulis* and *M. trossulus* co-exist and hybridize. The advantages of the method to reveal taxonomic heterogeneity of samples and to identify parental and hybrid individuals are illustrated. We also checked hypotheses that two species differ in frequencies of foot color morphs and morphs of a shell structure – the degree of pearl layer development around the ligament. It is concluded that these characters could be used for preliminary identification of *M. edulis* and *M. trossulus* in the White Sea populations.

Key words: hybridization, program «Structure», allozymes, foot color, shell structure

Литература

1. Золотарев В. Н., Шурова Н. М. О соотношении призматического и перламутрового слоев в раковинах мидий *Mytilus* // Биология моря. 1997. Т. 23. С. 26–30.
2. Луканин В. В. Распределение мидии *Mytilus edulis* в Белом море // Исследование мидии Белого моря. Л., 1985. С. 45–58.
3. Стрелков П. П., Сергиевский С. О., Сухотин А. А. Феногеографический анализ популяций мидий *Mytilus edulis* морей Северо-Запада России // Труды Зоологического института РАН. 1995. Т. 264. С. 174–192.
4. McDonald J. H., Seed R., Koehn R. K. Allozyme and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern hemispheres // Mar. Biol. 1991. Vol. 111. P. 323–335.
5. Pritchard K. J., Stephens M., Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data // Genetics. 2000. Vol. 155. P. 945–959.
6. Riginos C., Cunningham C. W. Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* X *Mytilus trossulus*) hybrid zones // Molecular Ecology. 2005. Vol. 14. P. 381–400.
7. Vainola R., Hvilson M. M. Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations (Mytilidae: Mollusca) // Biolog. J. Linnean Society. 1991. Vol. 43. P. 127–148.
8. Varvio S. L., Koehn R. K., Vainola R. Evolutionary genetics of the *Mytilus edulis* complex in the North Atlantic Region // Mar. Biol. 1988. Vol. 98. P. 51–60.