

На правах рукописи



ЧИЧВАРХИН АНТОН ЮРЬЕВИЧ

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ
СИСТЕМАТИКА МИТИЛИН ЯПОНСКОГО МОРЯ
(MOLLUSCA: MYTILIDAE, MYTILINAE)**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2005

Работа выполнена в Институте биологии моря Дальневосточного отделения
Российской Академии наук (ИБМ ДВО РАН)

Научный руководитель: доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории генетики ИБМ ДВО РАН
Ю.Ф. Картавцев

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
заведующий лабораторией исследований геномов морских
животных ДВГУ
Е.С. Балакирев

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории эмбриологии ИБМ ДВО РАН
А.Л. Дроздов

Ведущая организация: Институт общей генетики РАН

Защита состоится 14 Дек. 2005 г в 10 часов на заседании диссертационного
совета Д 005 008 01 при Институте биологии моря ДВО РАН по адресу 690041,
г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМ ДВО РАН (690041,
г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Автореферат разослан 22 октября 2005 г

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук,

Вашенко

М А Вашенко

2006-А
28007

2253061

3

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Мидии, или митилиды (*Bivalvia Mytilidae*) являются одними из наиболее знакомых нам морских беспозвоночных. Огромное их разнообразие представлено приблизительно 250 современными видами, входящими в состав 33 родов (Boss 1971), или 57 современными и вымершими таксонами родового ранга (Kafanov, Drozdov, 1997). Некоторые митилиды, в том числе почти все представители подсемейства *Mytilinae* имеют ценность как объект рыбохозяйственного промысла и аквакультуры. Ископаемые остатки мидий имеют важное значение для биостратиграфии. Распространены митилиды от литоральной зоны (например, подавляющее большинство митилин, являющихся объектом нашего исследования) до глубин в несколько километров. Они формируют поселения на каменистых и галечных грунтах, сверлят камни, поселяются в илах (Bayne, 1964; Scarlato, 1981), а также, в районах глубоководных гидротермальных источников и выходах холодных минерализованных вод (Lutz, Kennish, 1993; Distel et al., 2000). Митилиды интегрированы в состав различных экологических сообществ, а некоторые из них, в том числе многие митилины, включая *Mytilus* ex gr. *edulis*, играют важнейшую роль в формировании этих сообществ (Скарлато, Старобогатов, 1979; Seed, 1992).

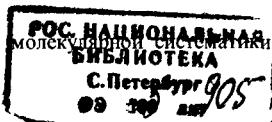
Популяционные и таксономические исследования митилид имеют давнюю историю. Однако, большинство филогенетических гипотез, выдвинутых в течение последнего столетия на основе классических морфологических работ для *Mytilinae* и *Mytilidae* в целом, весьма противоречивы. В частности, широко распространенные в мировом океане мидии группы «*edulis*», или более корректно *Mytilus* ex gr. *edulis* (Чичвархин и др., 2000), привлекали особое внимание исследователей из многих стран мира (Seed, 1968; 1971; Skibinski et al., 1978; 1983; 1994; Zouros et al., 1992; Sarver, Foltz, 1993; Gosling, 1992a; Saavedra et al., 1996; Gilg, Hilbish, 2003). Помимо всего прочего, исследователей в значительной мере интересовал вопрос изучения зон гибридизации *M. edulis* с *M. galloprovincialis* (Skibinski et al., 1978, 1983, Gosling, 1992a; Rawson, Hilbish, 1998; Gilg, Hilbish, 2003) и *M. trossulus* с *M. galloprovincialis* (Sarver, Foltz, 1993; Heath et al., 1995; Rawson et al., 1999). Эти исследования дали толчок для оживленной дискуссии о статусе таксонов группы *Mytilus* ex gr. *edulis*, которые инициировали в том числе и данную работу.

Цели работы: Изучить генетическую дифференциацию и молекулярную систематику митилин Японского моря на основе методов биохимической генетики, молекулярной генетики и морфометрии. Провести анализ гибридизации и потенциала интрогрессии генов между таксонами группы близнецовых видов комплекса *Mytilus* ex gr. *edulis*.

Основные задачи:

1 Проверить гипотезу о монофилии трибы *Mytilini* и выявить филогенетические взаимоотношения входящих в ее состав видов.

2 Подтвердить либо опровергнуть с помощью методов



гипотезу о конспецифичности *Mytilus californianus* и *M. coruscus*, неоднократно выдвигаемую рядом современных исследователей (Vermeij, 1991, Kenchington et al., 1995)

3 Установить видовую принадлежность представителей комплекса *Mytilus* ex gr *edulis*, обитающих в водах Японского моря

4 Подтвердить либо опровергнуть гипотезу о возможности гибридизации видов *Mytilus* ex gr *edulis* в российских водах Японского моря и оценить возможность интрогрессии генов между видами.

5 Установить применимость использования данных об аллозимной изменчивости для выведения филогений таксонов митилид различного таксономического ранга

Научная новизна работы. Впервые для построения филогении дальневосточных митилин была использована совокупность данных по аллельной изменчивости 24 аллозимных локусов. Достоверно показана монофилия трибы *Mytilini* базальное положение в ней занимает *C. grayanus*. В составе этой трибы выявлена монофилетическая группа видов *Mytilus* ex gr *edulis*, наряду с которой таксоны *Crassimytilus* и *Pacifimytilus* формируют монофилетическую группу (род *Mytilus*).

Впервые при помощи бутстреп-теста определены границы использования генетико-биохимических данных для филогенетических построений. Показано, что данные об аллозимной изменчивости пригодны для установления филогенетических взаимоотношений между таксонами митилид в пределах рода, либо близких родов одной трибы. При сравнении видов, относящихся к разным трибам и подсемействам, данный метод оказывается непригодным из-за частой ошибочной интерпретации электроморф, обладающих сходной электрофоретической подвижностью, как гомологичных.

Используя в качестве видоспецифичного генетического маркера участок неповторяющихся последовательностей гена полифенольного клеящего белка биссуса, а также аллозимный маркер маннозофосфатизомеразу, впервые исследовали двустворчатых моллюсков рода *Mytilus* (*M. trossulus* и *M. galloprovincialis*), на обширной акватории, включающей залив Петра Великого и сопредельные воды Японского моря. Показана возможность применения данных генетических маркеров для идентификации близкородственных видов рода *Mytilus* и их гибридов в зонах совместного обитания, в частности в прибрежных водах Приморья. Наличие примерно 9% гибридных особей подтверждает мнение о существовании зоны гибридизации между *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* в этом регионе.

Практическое и теоретическое значение работы.

1) Оценена возможность использования аллозимных признаков для выведения филогенетических взаимоотношений между таксонами митилид разного ранга, что может

быть использовано в дальнейшем в при планировании эволюционных генетико-биохимических исследований

2) Уточнена систематика подсемейства *Mytiliinae*, имеющего важное хозяйственное и научное значение

3) Определен видовой состав япономорских *Mytilus* ex *gr. edulis*, являющихся одним из основных объектов марикультуры в этом регионе

4) Показан факт гибридизации видов группы *Mytilus* ex *gr. edulis*, что может оказаться важным в ходе их культивирования, а также открывает перспективу фундаментальных исследований в области механизмов генетической изоляции между способными гибридизоваться видами морских беспозвоночных, имеющими двуродительское наследование митохондриальной ДНК

Апробация работы. Результаты исследований и основные положения докладывались на международном конгрессе «Towards a Great Future of Aquatic Genomics» (Токио, 2000), на III международном симпозиуме Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological Genetics (Владивосток, 2001), на ежегодной научной конференции ИБМ ДВО РАН (Владивосток, 2000, 2001), и на Расширенном генетическом семинаре ИБМ ДВО РАН (Владивосток, 2004)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ, из которых 4 на английском языке и 2 на русском, обе из которых переведены на английский язык, еще одна работа находится в печати в зарубежном журнале Korean Journal of Genetics

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 111 страницах машинописного текста, включает 16 рисунков и 9 таблиц. Список процитированной литературы содержит 157 названий, из них 125 на иностранных языках. В приложение, занимающее 12 страниц, вынесены первичные данные

Глава 1. СИСТЕМАТИКА И ФИЛОГЕНИЯ МИТИЛИН

1.1 Филогенетические исследования митилид

Наиболее полную на сегодняшний день молскулярно-филогенетическую гипотезу для митилид сравнительно недавно предложил Дистел в своей работе, основанной на нуклеотидной последовательности митохондриального гена 18S-rРНК (Distel, 2000). Эта филогения включала в себя 12 видов, относящихся к шести родам, а также несколько видов из других семейств, взятых в качестве внешней группы. В своей работе автор пользовался классификацией, предложенной Ньюэллом (Newell, 1969), найдя ньюэлловское подсемейство *Mytilinae* Rafinesque, 1815 полифилетичным.

Помимо наиболее известной, основанной на палеонтологических данных так называемой «сутрайэнской» классификации (Soot-Ryen, 1969), последовательно использованной Ньюэллом и Дистелом, было предложено еще несколько схем классификации митилид. После первого обзора Сут-Райэна (Soot-Ryen, 1955) стало обычной практикой выделять среди митилид четыре подсемейства *Mytilinae* Rafinesque, 1815, *Crenellinae* Gray, 1840, *Lithophaginae* H Adams et A Adams, 1857, и *Modiolinae* Keen, 1958. В более поздних классификациях (Bernard, 1983, Moore, 1983) выделялись те же подсемейства, что и у Сут-Райэна, однако их состав был весьма отличен (см. Кафанов, 1987). Позже Habe (1977) выделил пятое подсемейство, *Musculinae* Iredale, 1939, а Higo et al (1999) дополнили список подсемейств, включив в него *Dacrydinae* Ockelmann, 1983 и *Bathymodiolinae* Kenk et Wilson, 1985.

Совсем иную систему предложили Скарлато и Старобогатов (Скарлато, Старобогатов, 1979, 1984, Скарлато, 1981, Starobogatov, 1992), которые разделили *Mytiloidea* на четыре отдельных семейства *Mytilidae*, *Crenellidae*, *Septiferidae*, и *Lithophagidae*. Последнему таксону также придется ранг семейства в недавнем обзоре двустворок северо-западной Пацифики (Coan et al, 2000). Далее, Скарлато и Старобогатов выделили дополнительно 13 подсемейств (см. Кафанов, 1987). Эта система подразумевает также полифилию семейства *Mytilidae sensu* Soot-Ryen. К сожалению, диагнозы их таксонов слишком кратки, а предложенная схема классификации лишена какой-либо аргументации.

1.2 Видовая принадлежность *Mytilus* ex gr. *edulis*, обитающих в водах Японского моря

Мидий группы *Mytilus* ex gr. *edulis*, обитающих на тихоокеанском побережье России, традиционно относили к виду *Mytilus edulis* (Скарлато, 1981; Скарлато и Старобогатов, 1979). Однако неоднократно высказывались сомнения в этом отношении, а также о таксономической неоднородности поселений этой мидии. Полагали, что в приазиатской части Тихого океана обитают три подвида *M. edulis edulis* Linnaeus, 1758, *M. e. zhurmunski* Scarlato et Starobogatov, 1979 и *M. e. kussakini* Scarlato et Starobogatov, 1979. О вероятном существовании в этом регионе двух форм «съедобной мидии» говорили Жирмунский и Писарева (1960). Кафанов и Ромейко (1987) на основании морфометрического анализа мидий из северо-западной части Японского моря приходят к иному выводу, они полагают неправомерным подразделять дальневосточных *M. edulis* на отдельные подвиды. Позже наличие таксономической гетерогенности в поселениях *Mytilus* в зал. Посыета отмечал Кепель (1983).

Главным образом, обсуждение таксономической принадлежности тех или иных популяций *Mytilus*, проводилось на основе конхиологических признаков, почти все из которых крайне изменчивы, что затрудняет систематику семейства митилид в целом (Seed, 1968; Gosling, 1984; Кафанов, Ромейко, 1987; Золотарев, Шурова, 1997). С развитием метода генетики изоферментов удалось прояснить некоторые особенности таксономии и

расселения мидий. Сходство аллозимных спектров показало, что средиземноморская мидия *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 также встречается в Японии (Wilkins et al., 1983), в Северной (Comesana et al., 1998) и в Южной Африке (Grant, Cherry, 1985; Beaumont et al., 1989), на Британских островах (Ahmad, Breadmore, 1976; Skibinsky et al., 1980) и в Южной Калифорнии (MacDonald, Koehn, 1988). Мидиям *M. desolationis* с архипелага Кергелен в южной части Индийского океана, был придан статус подвида *M. edulis* (Blot et al., 1988). На протяжении атлантического побережья Европы *M. edulis* и *M. galloprovincialis* встречаются совместно, иногда скрещиваются, но доля их гибридов варьирует от локальности к локальности (Skibinski et al., 1978, 1983; Skibinsky, 1983; Comesana, Sanjuan, 1997). Аллозимы позволили также идентифицировать третий вид мидий – *M. trossulus*, встречающийся на тихоокеанском побережье Северной Америки, который на южной границе своего ареала в центральной Калифорнии гибридизуется с *M. galloprovincialis* (McDonald, Koehn, 1988). *M. trossulus* также встречается в некоторых районах Канады, местами гибридизуясь с *M. edulis* (Koehn et al., 1984), на Дальнем Востоке России (Мак-Дональд и др., 1990) и в Балтийском море (Varvio et al., 1988). *M. trossulus* был также описан Гоулдом (Gould, 1851) как *M. glomeratus*, после чего Карпинтер (Carpenter, 1864) свел как *M. trossulus*, так и *M. glomeratus* в синонимы *M. edulis*. Также были описаны таксоны *M. septentrionalis* с острова Бэнкс в Канаде (Clessin, 1889) и *M. edulis diegensis* (Coe, 1945). В относительно недавнем обзоре Сут-Райэна (Soot-Ryen, 1955) все эти таксоны были приведены как подвиды *M. edulis*. Дальнейшее развитие методов молекулярной генетики позволило выяснить больше деталей в систематике мидий группы «*edulis*». Иноу с соавторами (Inoue et al., 1995, 1997) удалось выявить гибридные экземпляры среди *M. galloprovincialis* и *M. trossulus*, обитающих на побережье острова Хонсю в Японии.

Суммируя вышеизложенное, можно сделать заключение о том, что в соответствии с последними таксономическими данными (Коэн, Пудовкин, 1988; Мак-Дональд и др., 1990, McDonald et al., 1991; Ivanova, Lutaenko, 1999) в сублиторали залива Петра Великого Японского моря совместно обитают *Mytilus trossulus* Gould, 1850 и *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Адрианов, Кусакин, 1998).

Глава 2. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Молекулярная систематика и молекулярная филогенетика

В разделе кратко рассматривается история молекулярной систематики и филогенетики, обозначены основные открытия, обусловленные использованием методов молекулярной систематики (Nuttall, 1904; Wainwright et al., 1993; Kumar, Rzhetsky, 1996; Lang et al., 1997 и др.). Описано развитие основных используемых в этой области экспериментальных и математических методов (Wagner, 1962; Fitch, Margolish, 1967; Farris, 1970; Sober, 1988;

Swofford, Olsen, 1990, Harvey, Pagel 1991, Stewart, 1993, Nei, Kumar, 2000; Felsenstein, 2003 и др.)

2.2 Основные принципы кладистики

В разделе описано развитие идей кладистики, основоположником которой стал немецкий энтомолог В. Хенниг (Hennig, 1966). Кладистика лежит в основе анализа эмпирических данных в современной систематике, в том числе и молекулярной. Даны основные концепции кладистики, кратко рассмотрено современное развитие этой науки (Татаринов, 1977; Platnick, Gaffney, 1978; Красилов, 1989).

2.3 Использование аллозимов (изоферментов) в качестве генетических маркеров

Описывается становление и развитие генетики изоферментов как одного из широко распространенных методов молекулярной систематики (Tiselius, 1937; Dobzhansky, 1951; Smithies, 1955; Markert, 1957; Markert, Moller, 1959; Hunter, Schwartz, 1960; Hubby, Lewontin, 1966; Lewontin, Hubby, 1966; Майр, 1968; Корочкин, 1977; Manchenko, 1994). Даже с появлением в последнее время молекулярно-генетических маркеров и с развитием различных точных методов расшифровки первичной структуры ДНК электрофорез в ряде конкретных случаев остается конкурентоспособным из-за своей экспрессивности и дешевизны.

Глава 3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Материал исследования

Для проведения филогенетической части исследования, моллюски (13-32 особи) были собраны в августе 1998 г. в заливе (зал) Восток (залив Петра Великого Японского моря): *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853), *Mytilus trossulus* Gould, 1850, *Mytilus (Crassomytilus) coruscus* Gould, 1861, *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758), *Adula falcatoides* Habe, 1855, *Septifer keeni* (Nomura, 1936), и в 1998 г. в Bodega Bay (Калифорнийское побережье США): *Mytilus (Pacifymytilus) californianus* Conrad, 1837 и *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819.

Для популяционного анализа *Mytilus* группы *edulis* Японского моря были собраны одна выборка из залива Восток (120 экз.), одна выборка из окрестностей г. Нингата (поселок Камо, 70 экз.), одна из залива Ошика на Тихоокеанском побережье острова (о.) Хонсю (90 экз.), и пять выборок с побережья Южной Кореи (Сокчо – 30 экз., Кангпунг – 30 особей, Ульчин – 45 особей, Поханг – 30 экз., Онсан – 50 экз., Пусан – 80 экз.). По 70 экз. из зал. Восток и зал. Ошика (Япония) были также использованы для филогенетического анализа.

Для AFLP-теста, моллюсков *Mytilus trossulus* и *Mytilus galloprovincialis* собирали в июле-августе 1999 г. Было проанализировано 94 экз., из них 67 экз. собрано с марикультурного коллектора близ биологической станции «Восток» (ИБМ ДВО РАН) (зал Восток, восточная часть зал. Петра Великого, Японское море), 15 экз. в бухте Прибойной (зал Восток), 12 экз. на полуострове Островок Фальшивый (зал Посыет, юго-западная часть

зал Петра Великого) Особи *M. galloprovincialis* (49 экз.) собраны с плавника на полуострове Островок Фальшивый. Помимо этого, для контроля использованы 12 экз. *M. galloprovincialis*, собранных в ноябре 1999 г. на южном побережье Франции в г. Сет (Cete) и 12 экз. *M. edulis* в Северном море на побережье о. Гелголанд (Helgoland), Германия.

3.2 Генетико-биохимические методы исследования

Электрофорез белков в крахмальном геле, а также приготовление белковых экстрактов из замороженных, либо свежих тканей животных проводили по общепринятым методикам (Корочкин и др., 1977, Manchenko, 1994). Для обнаружения зон локализации ферментов использовали описанные методики гистохимического окрашивания (Корочкин и др., 1977, Manchenko, 1994).

Исследовано 26 ферментных локусов: 1) метилумбеллиферилдеацетилаза (локус *MAD*, КФ 3.1.1.1), 2) лейцинаминопептидаза (*LAP*, КФ 3.4.11.1), 3) глюкозо-6-фосфатизомераз (*GPI*, КФ 5.3.1.9), 4) октопиндегидрогеназа (*ONDH*, КФ 1.5.1.11), 5-6) фосfogлюкомутаза (*PGM-1* и *PGM-2*, КФ 5.4.2.2), 7) маннозофосфатизомераз (*MPI*, КФ 5.3.1.8), 8-9) НАД-зависимая малатдегидрогеназа (*MDH-1* и *MDH-2*, КФ 1.1.1.37), 10-11) НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа (*ME-1* и *ME-2*, КФ 1.1.1.40), 12) каталаза (*CAT*, КФ 1.1.1.6), 13) ксантиндегидрогеназа (*XDH*, КФ 1.1.1.204), 14-15) неорганическая пирофосфатаза (*PP-1*, *PP-2*, КФ 3.6.1.1), 16) глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (*G3PD*, КФ 1.1.1.8), 17) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (*G6PD*, КФ 1.1.1.49), 18) супероксиддисмутаза (*SOD-1*, КФ 1.15.1.1), 19) аргининкиназа (*ARGK*, КФ 2.7.3.3), 20) глутамат-пируваттрансаминаза (*GPT*, КФ 2.6.1.2), 21-22) изоцитратдегидрогеназа (*IDH-1* и *IDH-2*, КФ 1.1.1.41), 23-24) аспаратаминотрансфераза (*AAT-1* и *AAT-2*, КФ 2.6.1.1), 25) формальдегид дегидрогеназа (*FDH*, КФ 1.2.1.1), 26) альдолаза (*ALD*, КФ 4.1.2.13).

3.3 Популяционно-генетический и филогенетический анализ

Компьютерные расчеты базировались на программах Specstat (Картацев, Соловьев, 1992), BIOSYS (Swofford, Selander, 1981) и GENEPOP (Raymond, Rousset, 1995). При статистическом анализе тестировали несколько параметров аллозимной изменчивости: p_i – частота i -того аллеля; H_s – ожидаемая из соотношения Харди-Вайнберга гетерозиготность в одной выборке, H_o – наблюдаемая гетерозиготность в выборке и др. В качестве мер внутривидовой дифференциации использовали, в основном, F-статистики в символике Нея (Nei, 1977): F_{IS} – мера отклонения наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой из соотношения Харди-Вайнберга, F_{IT} – отклонение наблюдаемых и ожидаемых частот генотипов в совокупности выборок, F_{ST} – стандартизованная дисперсия частот аллелей; F'_{ST} – стандартизованная нормализованная дисперсия частот аллелей (Nei, 1987).

Кроме того, использовали: χ^2 – стандартный критерий хи-квадрат, D_m – минимальное генетическое расстояние Нея (Nei, 1978); D_N – стандартное генетическое расстояние Нея

(Nei, 1972) Помимо этого, производили вычисление стандартных генетических расстояний Роджерса (D_R) (Rogers, 1972), хордового расстояний Кавалли–Сфорца (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967) Построение дендрограмм осуществляли невзвешенным парно-групповым методом (НПГМ, UPGMA) (Бейли, 1970) или используя другие алгоритмы

Для получения статистической поддержки филограмм полученные данные по частотам аллелей были размножены на 10000 реплик методом бутстрепа при помощи программы “seqboot” из программного пакета PHYLIP 3.0. (Felsenstein, 1993) В качестве критерия достоверности во всех случаях применения бутстреп-теста был взят уровень поддержки выше 50% Далее, из реплицированных матриц частот аллелей, были рассчитаны генетические расстояния Нея (Nei, 1972) и на их основе проведена реконструкция методом наибольшего правдоподобия и кластеризации методом ближайшего соседства (Neighbor-Joining) (Saitou, Nei, 1987) при помощи программ пакета PHYLIP “gendist”, “contml” и “neighbor” Поиск консенсусного древа проводился при помощи программы “consense” из того же пакета

3.4 Метод AFLP

Тотальную ДНК выделяли из жаберных пластинок либо аддуктора, зафиксированных в 95° этиловом спирте при помощи стандартного метода экстракции фенол-хлороформом.

ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 60 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 25 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100, по 2,5 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 мкМ праймера Me 15, 0,5 мкМ праймера Me 16, 1 мкл экстракта тотальной ДНК (4-10 нг) и 1 ед TaqДНК-полимеразы. В качестве специфических праймеров использовали Me 15 5'- CCA GTA TAC AAA CCT-GTG AAA A -3' и Me16 5'-TGT TGT CTT AAT AGG TTT GTA AGA-3' Для полимеразной цепной реакции использовали следующие параметры 94° - 30 сек, 55° - 45 сек, 70° - 90 сек в течение 40 циклов Электрофорез продуктов амплификации проводили в 4,5% агарозном геле.

3.5 Морфометрический и комплексный статистический анализ

В ходе морфометрического анализа было использовано 10 конхиологических признаков, большая часть которых была предложена ранее Золотаревым и (1997) Измеряли левую створку раковины с точностью 0,1 мм

1) Длина раковины (L), 2) Высота раковины (HTG), 3) Длина лигамента (LIG), 4) Длина шарнирной пластинки (HP), 5) Длина отпечатка переднего аддуктора (WAR), 6) Длина отпечатка заднего аддуктора (ADB), 7) Расстояние между отпечатками передней части заднего ретрактора и внутренним краем зоны призматического слоя раковины (LPR); 8) Длина участка призматической зоны расположенного вдоль лигамента (LP), 9) Ширина

дистально-вентрального отпечатка заднего аддуктора (WMP), 10) Длина отпечатка заднего ретрактора (RTB).

Полученные морфометрические значения были модифицированы несколькими способами путем индексации их значений относительно длины раковины, и затем трансформированы посредством логарифмирования, либо извлечения квадратного корня (Afifi, Azen, 1979). На этом этапе анализировали также комплекс морфометрических признаков и индивидуальные генотипические значения посредством многомерного анализа (Afifi, Azen, 1979). Решение задач основывалось на каноническом, дискриминантом и факторном анализе (Afifi, Azen, 1979). Вычисления проводились с помощью программ STATISTICA (Statsoft, 1994), GENEPOP (Raymond, Rousset, 1995), BIOSYS-1 (Swofford, Selander, 1981), NTSYS-pc (Rohlf, 1988) и SPECSTAT (Картавцев, Соловьев, 1992).

Глава 4. ПОСТРОЕНИЕ ФИЛОГЕНИИ МИТИЛИД, ОСНОВАННОЕ НА ЧАСТОТАХ АЛЛЕЛЕЙ ИЗОФЕРМЕНТОВ

Данные о частотах аллелей легли в основу расчета коэффициентов генетического различия (Табл. 1). Первоначально были рассчитаны все коэффициенты сходства/различия, представленные в программных пакетах BIOSYS-1 и PHYLIP 3.0.

Полученные величины генетических расстояний минимальны для пары видов *M. trossulus* / *M. galloprovincialis*: $D_R = 0.111$, $D_N = 0.054$. В целом 6 видов из родов *Mytilus* и *Crenomytilus* имеют меньшие средние расстояния между собой - $D_R = 0.352$, $D_N = 1.416$, чем остальные три вида к этой группе - $D_R = 0.807$, $D_N = 2.243$ (Табл. 1).

Таблица 1. Генетические расстояния Роджерса, D_R (ниже диагонали) и Нея, D_N (выше диагонали) между выборками 9 исследованных видов митилид

Виды	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>M. trossulus</i>	—	0,078	0,070	1,384	1,409	2,608	2,369	1,741	2,207
2. <i>M. galloprovincialis</i>	0,147	—	0,054	1,434	1,273	2,671	2,197	1,473	2,767
3. <i>M. edulis</i>	0,134	0,111	—	1,428	1,202	2,650	2,224	1,545	2,707
4. <i>M. coruscus</i>	0,725	0,742	0,739	—	1,382	1,015	2,911	1,909	2,486
5. <i>M. californianus</i>	0,710	0,692	0,685	0,731	—	0,907	1,978	1,589	3,010
6. <i>C. grayanus</i>	0,867	0,883	0,891	0,630	0,587	—	2,248	2,486	2,466
7. <i>M. modiolus</i>	0,781	0,795	0,808	0,878	0,792	0,849	—	1,958	2,516
8. <i>A. falcatoides</i>	0,752	0,731	0,744	0,819	0,758	0,855	0,780	—	2,064
9. <i>S. keenae</i>	0,774	0,824	0,799	0,856	0,859	0,850	0,784	0,785	—

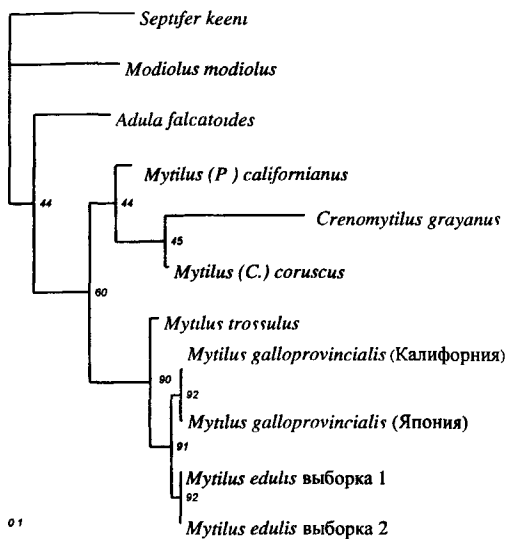


Рисунок 1 Бескорневое древо, построенное с помощью метода ближайшего соседства на основании расстояний Нея (Nei, 1972); индексы бутстрепа (n=10000) показаны возле внутренних узлов

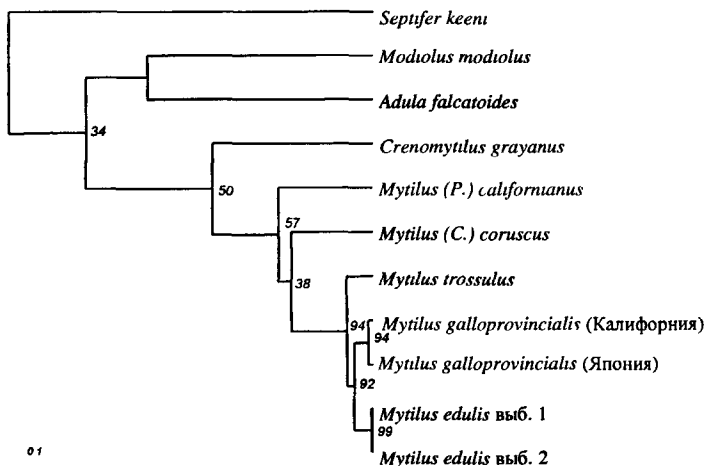


Рисунок 2 Бескорневое древо, построенное с помощью метода UPGM на основании расстояний Нея (Nei, 1972), индексы бутстрепа (n=10000) показаны возле внутренних узлов

Большинство использованных метрик сходства-различия дают одинаковую, в общих чертах, кластеризацию изученных видов митилид. В точности совпадают топологии 9 изученных видов, построенные на основе генетических расстояний Роджерса и Нея. При использовании этих подходов выявляются два кластера: 1) *M. trossulus* / *M. galloprovincialis* и 2) *C. coruscus* / *P. californianus* / *C. grayanus*, которые соединяются далее между собой, формируя третий самостоятельный кластер. В этот третий кластер входят все представители родов *Mytilus*, *Pacifimytillus*, *Crassimytillus* и *Crenomytillus* (см. Рис 1), что говорит о его соответствии монофилетическому подсемейству *Mytilinae*. Однако, только первый (*Mytilus*) и второй (*Mytilinae*) кластеры имеют хорошую поддержку бутстрепом (Рис 1), что служит свидетельством в пользу их монофилии. Более того, на кладограмме, построенной при помощи метода UPGM (Рис 2) на основе расстояния Нея, кластер *C. coruscus* / *P. californianus* / *C. grayanus* отсутствует вовсе. Сравнительно большое расстояние Нея (Nei, 1972) $D_N=0,731$ (Табл. 1), сопоставимое с расстояниями между хорошо дивергировавшими видами или подродами митилид и других морских беспозвоночных (Табл. 1; Thorpe, 1982; Thorpe, Sole-Cava, 1994) свидетельствует против гипотезы о конспецифичности видов *Mytilus californianus* и *M. coruscus* (Vermeij, 1991). В то же время, его порядок говорит о целесообразности рассмотрения их в составе монотипичных подродов *Pacifimytillus* и *Crassimytillus* соответственно (Кафанов, 1987).

Полученные индексы бутстреп-поддержки дают нам возможность выявить диапазон пригодности частот изоферментных аллелей для проведения филогенетических реконструкций. Согласно бытующему мнению специалистов, аллозимы пригодны лишь для выведения филогенетических взаимоотношений между таксонами ранга рода, либо ниже. Согласно полученным нами данным, метод хорошо работает при сравнении близких видов одного рода (индекс поддержки 90-99%). При сравнении видов, относящихся к близким таксонам подродового и родового рангов (в нашем случае это *Mytilus*, *Pacifimytillus*, *Crassimytillus*, *Crenomytillus*), индекс поддержки падает 38-57%, то есть колеблется около границы 50%-ной достоверности, порой оказываясь ниже нее. Тем не менее, использованный нами метод позволил с достаточной достоверностью сделать вывод о монофилии митилин, то есть таксона ранга трибы. Сравнения митилин с представителями других подсемейств не выявили достаточно достоверных филогенетических взаимоотношений между ними (поддержка не более 44%), что свидетельствует о непригодности использования аллозимных частот для выяснения филогенетических взаимоотношений между таксонами столь высокого ранга как подсемейства.

На основе генетических расстояний Нея (D_N) можно не только построить дендрограмму отношений сходства-родства девяти проанализированных таксонов мидий, но также оценить давность дивергенции между ними. Время дивергенции между *M. trossulus* / *M. galloprovincialis* в этой шкале составляет около 0,8-1,6 млн лет, между этой парой и

M. coruscus – 4-6 млн лет, между этими видами и парой *M. californianus* / *C. grayanus* – 10-12 млн лет. Таким образом, можно обратить внимание на то, что два представителя комплекса *Mytilus* ex gr. *edulis* обособились от группы крупных тихоокеанских видов *Mytilus* / *Crenomytilus* около 12 млн лет назад. Это хорошо согласуется с филогенетической схемой, построенной по палеонтологическим данным (Кафанов, 1987). Хотя, согласно последним, геологическая история рассмотренных таксонов примерно в 3-4 раза продолжительнее, обращает на себя внимание близость порядка величин.

Таким образом, полученные аллозимные данные вполне хорошо согласуются между собой, с палеонтологически продокументированной историей становления комплекса видов *Mytilus* ex gr. *edulis* и с большей древностью его тихоокеанских представителей (*M. trossulus*).

Глава 5. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ФАКТА ГИБРИДИЗАЦИИ *MYTILUS TROSSULUS* И *M. GALLOPROVINCIALIS* В РОССИЙСКИХ ВОДАХ ЯПОНСКОГО МОРЯ

Последовательности неповторяющейся области гена полифенольного белка, использующегося мидиями для прикрепления к субстрату (Inoue et al., 1995a) у трех близкородственных видов рода *Mytilus* очень похожи, но отличаются друг от друга небольшими вставками и делециями. Самая короткая последовательность характерна для *M. galloprovincialis* – она составляет 126 пар нуклеотидов (пн), у *M. trossulus* она имеет размер 168 пн и у *M. edulis* – 180 пн (Inoue et al., 1995a, b).

Все без исключения 49 экз *M. galloprovincialis*, собранных с плавника выброшенного волнами на берег мыса Островок Фальшивый, как и предполагалось, имели размер неповторяющейся области гена прикрепительного белка 126 пн, также как и 12 экз с южного побережья Франции. Представители *M. trossulus*, собранные на Островке Фальшивом, содержали фрагмент размером 168 пн. Среди 15 экз, собранных в бухте Прибойной оказалось 3 гибридных особи, содержащих два фрагмента (126 и 168 пн), а среди 67 экз, собранных с коллектора на биологической станции «Восток» гибридными оказались 6 особей.

Существование зон гибридизации между *M. trossulus*, аборигенным видом для Японского моря, и интродуцированным в недавнее время *M. galloprovincialis* обсуждается в ряде работ (Кепель, Озолиньш, 1992; Inoue et al., 1997; Ivanova, Lutaenko, 1998). Причем для залива Восток количество гибридов по морфологическим признакам в 1988 году оценивалось величиной 11% (Ivanova, Lutaenko, 1998). По нашим данным оно достигает близкой величины 9%, хотя согласно исследованиям Виарда с соавторами (Viard et al., 1994) условие стабильности генетической структуры популяций в гибридных зонах не всегда является обязательным и определяется результатом взаимодействия между потоком генов и отбором. Если на тихоокеанском побережье Америки и у берегов Японии

M. galloprovincialis образует поселения (McDonald, Koenh, 1988; McDonald et al., 1991; Inoue et al., 1997; Gosling, 1992), то в Российских прибрежных водах Японского моря его находят, главным образом, на плавнике (Кепель, Озолиньш, 1992, МакДональд и др., 1990) и лишь незначительное количество (2%) среди моллюсков из экспериментальной культуры, выращиваемой в центральной части залива Петра Великого близ островов Попова и Рейнике (1986 - 1989 гг.) определены морфологами как подлинные *M. galloprovincialis* (Ivanova, Lutaenko, 1998).

Как в работе Иноуэ с соавторами (Inoue et al., 1997), так и в нашей прослеживается удивительный факт - отсутствие одной из родительских форм *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* в районе обитания гибридных особей. Мы в своей работе находим в заливе Восток особей с гаплотипом *M. trossulus* и гибридную форму между *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*, однако чистая форма *M. galloprovincialis* здесь отсутствует. В этой ситуации, можно сделать предположение либо о том, что личинки этих гибридных особей были принесены морскими течениями в залив Восток, а здесь выжили и закрепились на субстратах совместно с *M. trossulus*, либо особи с таким гибридным геномом довольно длительное время существуют параллельно с *M. trossulus*, и в таком виде передают его своим потомкам, как и гибриды прибрежных вод Японии (Inoue et al., 1997). Без сомнения, в основе этого явления в любом случае лежат процессы гибридизации, а акватория залива Петра Великого является гибридной зоной этих видов. Основываясь на характере морских течений, омывающих побережье южного Приморья, можно предположить, что в залив Восток гибридные личинки мидий попадают из порта Находка, куда транспортируются судами в составе обрастаний и балластных вод из Японии или других регионов, подобно тому, как это происходит на западном побережье Канады (Heath et al. 1995).

Поскольку гибридные личинки имеют большую способность к выживанию в критических условиях (Seed, 1992), возможно, что и взрослые особи дольше сохраняются в заливе Восток в отличие от истинных *M. galloprovincialis*. Можно также допустить, что появление гибридных особей в заливе Восток посредством транспортировки личинок в балластных водах судов, не единственно возможный вариант. Не исключено, что мидии *M. galloprovincialis* попавшие в порт Находка в числе организмов, прикрепляющихся к днищам судов в качестве обрастателей, имеют возможность в период благоприятного температурного режима, наблюдающегося в июле-августе, приступить к нересту. Тогда гибридные личинки будут местного происхождения. Это предположение основывается на данных, в соответствии с которыми, сроки нереста как у *M. galloprovincialis*, так и *M. trossulus* растянуты во времени, а температуры, при которых происходит нерест, отчасти перекрываются (Seed, 1992; Seed, Suchanek, 1992; Sarver, Foltz, 1993; Rawson et al., 1999).

Глава 6. ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПОПУЛЯЦИЙ *MYTILUS*, НАСЕЛЯЮЩИХ ВОДЫ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ ЯПОНСКОГО МОРЯ

Нами была исследована генетическая и морфометрическая изменчивость в девяти выборках мидий группы «*edulis*» с побережий России, Японии и Южной Кореи. На основании генетических расстояний Роджерса (D_R), рассчитанных из частот аллелей, была построена кладограмма, иллюстрирующая филогеографические взаимоотношения между исследованными популяциями (Рис. 3).

Представленные на Рис. 3 взаимоотношения выборок *M. galloprovincialis* и выборки *M. trossulus* из зал. Восток могут быть объяснены с географической точки зрения. Так, географически удаленные популяции из Ошики (тихоокеанское побережье о. Хонсю, Япония) и Сокчо (северная часть Южной Кореи и граница распространения *M. galloprovincialis* в этом районе) являются внешними группами. Довольно неожиданным оказалось близкое родство популяций из Пусана (Япония) и Камо (Корея).

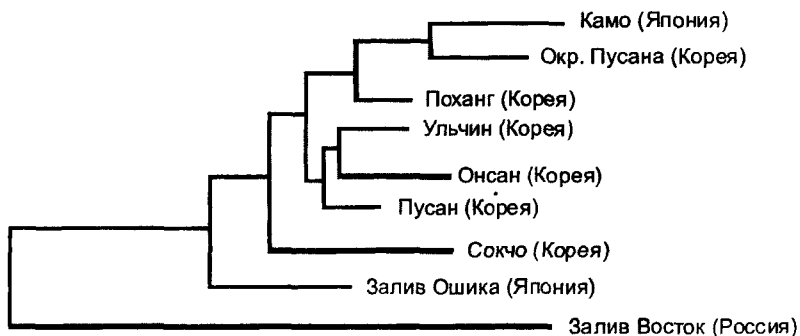


Рисунок 3. Древо Вагнера, основанное на генетических расстояниях Роджерса (Rogers, 1972) по 9 локусам двух видов *M. galloprovincialis* (Корея, Япония) и *M. trossulus* (зал. Восток).

Перед проведением многомерного статистического анализа все особи были классифицированы в соответствии с их генотипом по локусу *MPI*, который известен как видоспецифичный маркер для *Mytilus* spp (MacDonald et al., 1990; Penney, Hart, 1999; Чичвархин и др., 2000). Такая классификация делит исследованных особей на две группы: первая, с гомозиготами 2/2 - *M. trossulus*, и вторая с гомозиготами 3/3 - *M. galloprovincialis* (Рис. 4, кружки и треугольники). Гибриды первого поколения (F_1) легко распознаются по генотипу *MPI* 2/3, а вероятные потомки обратных скрещиваний (F_2) по генотипам 1/2 и 3/4. Среди всех исследованных особей можно идентифицировать несколько гибридов: F_1 – три особи из выборки в зал. Восток, для которой характерен *M. trossulus*, и одну особь из

окрестностей Пусана, где характерен *M. galloprovincialis*, F_b – пять особей из Камо и Ошика, где также характерен *M. galloprovincialis*. Также, отмечены две «нетипичные» особи типа “*trossulus*” из окрестностей Пусана (Рис 4). Строго говоря, как отмечено Кэмптоном (Campton, 1987), имеется возможность различать гибриды поколений F_1 и F_b если имеется не один дискриминирующий локус и частота встречаемости диагностических аллелей очень высока или они фиксированы. В нашем случае наблюдается небольшая доля единично встречающихся гибридов, поэтому наш вывод по поводу разделения F_1 и F_b в основном, верен и по одному локусу *MPI*.

Канонический анализ, проведенный по значениям генотипов по 10 локусам выявил две различные группы – в одной представлены только *M. galloprovincialis* и гибриды, а во второй – *M. trossulus* и гибриды. В первой группе присутствуют только две нетипичные особи с генотипами *MPI*, характерными для *M. trossulus*.

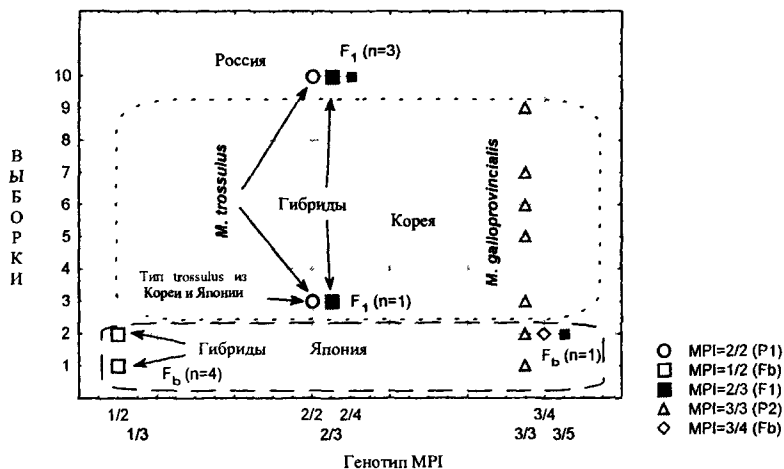


Рисунок 4. Распределение генотипов по локусу маннозофосфатизомеразы (MPI) в исследованных выборках *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*.

Многолокусные генотипы, в основном, хорошо различимы по значениям их канонических переменных (КП-факторов) для двух видов. Гибриды F_1 имеют промежуточные (средние) значения. Две особи типа “*trossulus*”, неспецифичные для Кореи, характеризуются значениями многолокусных генотипов, похожих на тип “*galloprovincialis*” и по распределению ЕП по главной компоненте 1 (ГК 1) в факторном анализе. Все три гибридные особи F_b , принадлежащие выборкам типа “*galloprovincialis*” явно отличаются от остальных генотипов этого вида.

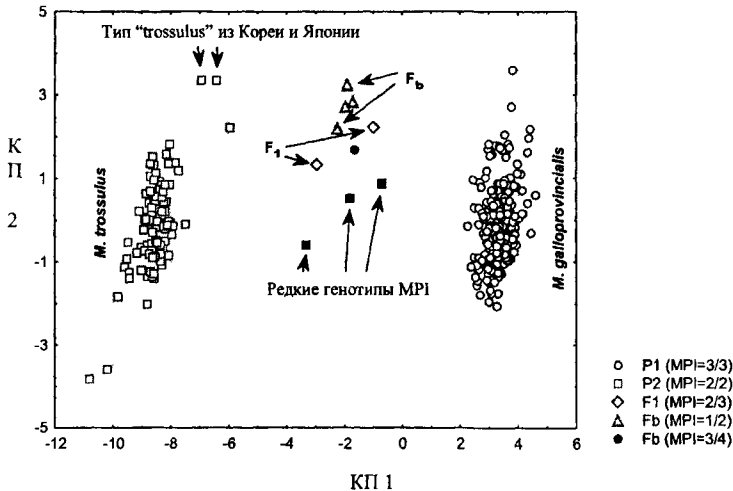


Рисунок 5 Дискриминантный анализ и классификация особей *M. galloprovincialis*, *M. trossulus* и их гибридов, основанные на аллозимных генотипах и морфологических признаках. На осях Y и X – значения канонических переменных (КП 1 и КП 2). Значимость Δ Уилкса = 0.032, $p < 0.00001$.

Приведенный выше анализ оставляет нерешенными вопросы о вкладе морфологических признаков в дифференциацию двух видов и их гибридов. Ответить на эти вопросы можно, проанализировав дискриминацию особей двух групп (видов) вместе с третьей группой (F_1 и F_b) по комбинированным морфометрическо-генетическим признакам, а затем попытаться выявить влияние определенных признаков на полученную дискриминацию.

Наиболее сильная дискриминация обнаружена для пяти локусов и 7 морфометрических индексов (Рис. 5). Статистически значимая дискриминация показана для следующих признаков: MPI, LP_L, PGM2, GPI, IDH1, ADB_L, ONDH, LPR_L, LTG_L, HP_L, HTG_L, и WAR_L. На графике видно четкое подразделение исследованных особей на две четкие группы-вида. Также на нем выделяются гибриды и «нетипичные» особи. Средняя точность классификации в этом случае составляет 98,6%, со значениями 98,4%, 98,9%, и 100% для «galloprovincialis», «trossulus», и гибридов, соответственно. Гибриды F_1 имеют промежуточные значения по КП 1, но не по КП 2, по которой две особи F_1 отличаются от двух основных групп, в то время как особи F_b классифицируются менее выражено (Рис. 5). По КП 1 наиболее значимыми переменными оказались MPI, LP_L, ONDH и LPR_L с корреляциями 0.894, -0.225, 0.156 и 0.151, соответственно. Во вторую КП существенный вклад вносят переменные ADB_L, WAR_L, LP_L, LPR_L и PGM2 с соответствующими

корреляциями 0 547, -0 467, -0 440, 0 397 и 0 358. Иначе говоря, в проведенном анализе классификация особей двух различных видов зависит как от генетических, так и от морфологических переменных. Однако относительно гибридов ситуация несколько иная. Один их гибридов F_1 найден в выборке типа «*trossulus*» из зал Восток а второй – из группы типа «*galloprovincialis*» из окрестностей Пусана, причем оба они выглядят как промежуточные особи, как по морфометрическим, так и по генетическим признакам. С другой стороны, гибриды F_2 и «неспецифичные» особи для группы типа «*galloprovincialis*» расположены в крайней верхней части оси Y (КП 1), что говорит, главным образом о сильном вкладе морфометрических признаков.

Как было отмечено выше, в местах симпатрического обитания, мидии группы «*edulis*» образуют несколько зон гибридизации. В водах Японского моря, существование зон гибридизации между аборигенным для северной Пацифики *M. trossulus* и интродуцированным в Японское море *M. galloprovincialis* обсуждается в ряде работ (Кепель, Озолиньш, 1992; Inoue et al. 1997; Ivanova, Lutaenko, 1998). Число гибридов в заливе Восток, являющегося частью залива Петра Великого в 1998 году составляло 11% согласно морфологическим критериям (Ivanova, Lutaenko, 1998). Судя по нашим молекулярно-генетическим данным (Скурихина и др., 2001), в 1999 году их число составляло $8.95 \pm 1.68\%$. Согласно данным наших последних исследований, проведенных в 2003 году, доля гибридов в заливе Восток снизилась до $1.6 \pm 0.9\%$, несмотря на то, что исследовались особи из той же локальности. Таким образом, можно прийти к выводу о том, что гибридная зона в этом районе только формируется и пока нестабильна.

Очевидно, что существуют, по меньшей мере, две области гибридизации *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* в Японском море: одна из них – в районе г. Пусан (выборка №3) вдоль корейского побережья, где мы обнаружили одну гибридную особь F_1 и две «неспецифичные» особи типа «*trossulus*». Вторая находится на побережье о. Хонсю, где были обнаружены гибриды поколений F_2 как на япономорском, так и на тихоокеанском побережьях. Это подтверждает более ранние находки гибридных особей вдоль япономорского побережья о. Хоккайдо и севера о. Хонсю (Inoue et al., 1997) и показывает, что в Японском море гибридная зона простирается на юг до порта Камо в префектуре Ямагата, и до залива Ошика на тихоокеанском побережье северо-востока о. Хонсю. Найденные гибриды могут возникать вследствие естественных скрещиваний, а также быть привезенными из других акваторий судами вместе с балластными водами. Первый путь наиболее вероятен, так как период нереста у съедобных мидий довольно продолжителен, и оптимальные температуры нереста у *M. galloprovincialis* и *M. trossulus* перекрываются (Seed, 1974; 1992; Seed, Suchanek, 1992). На первом этапе интродукции, новые поселенцы могут быть принесены в виде обрастаний судов и дрейфующего мусора, распространяемого штормами. В заливе Петра Великого были сделаны подобные находки *M. galloprovincialis*.

(МакДональд и др., 1990; Кепель, Озолиньш, 1992; Чичвархин и др., 2000; Скурихина и др., 2001). Помимо этого, похожие на этот вид особи были найдены на коллекторах марикультурных хозяйств залива Посьет и о. Попова (Кепель, Озолиньш, 1992; Ivanova, Lutaenko, 1998). В водах Японии и Кореи нетипичные особи типа “trossulus” были найдены как в выборках из естественных биотопов, так и марикультурных хозяйств (наши данные и Inoue et al., 1997). Эти факты приводят к выводу о том, что события интродукции имели место в обоих направлениях относительно зоны контактов двух видов.

В общем, уровень гибридизации у видов *Mytilus* ex gr. *edulis* различен в зависимости от той или иной локальности, а также от видовой принадлежности родительских форм (Koehn et al., 1984; Corte-Real et al., 1994; Innes, Bates, 1999). Обычно, для пары *M. trossulus* - *M. galloprovincialis* этот уровень ниже, чем для пар *M. edulis* - *M. trossulus* и *M. edulis* - *M. galloprovincialis*. В дополнение к этому отметим, что различия наблюдаются не только в уровне гибридизации, но и в том, что интрогрессия генов происходит асимметрично. Так, Penney и Hartle (1999) исследовали четыре аллозимных локуса (*MPI*, *PGM*, *LAP*, *GPI*) и морфометрические признаки мидий с побережья о. Ньюфаундленд – ими были обнаружены как очевидные гибридные особи, так и смешанные поселения *M. edulis* - *M. trossulus*. Судя по диагностичному локусу *MPI*, пропорция гибридных особей выше среди *edulis*-подобных (Е/Т), чем среди *trossulus*-подобных морфотипов (Т/Е) (Penney, Hartle, 1999). Молекулярно-генетические данные из других регионов подтверждают это наблюдение (Heath et al., 1995). Все эти факты могут быть объяснены как следствие интрогрессии, осуществляемой предпочтительно в направлении “trossulus” → “edulis”, “trossulus” → “galloprovincialis”. Наши данные также подтверждают эту точку зрения. В зал. Восток, районе обитания *M. trossulus* не найдены особи, характеризующиеся гибридным генотипом F₂, в то время, как они были найдены в локальностях, заселенных *M. galloprovincialis*.

С биологической точки зрения явление асимметричной интрогрессии вполне понятно. Исследования показывают, что *M. trossulus* филогенетически является базальным по отношению к другим видам *Mytilus* ex gr. *edulis*, то есть, наиболее древним (Кафанов, 1984; 1987; Kenchington et al., 1995; Чичвархин и др., 2000). Возможно, в ходе формирования этой группы видов имел место процесс географического видообразования. Причиной первой стадии видообразования могло послужить исчезновение Берингова пролива на протяжении длительного времени в плиocene-плейстоцене, приведшее к разделению *M. trossulus* - *M. edulis*, а второй стадии – изоляция Средиземного моря от Атлантического океана, приведшее к разделению *M. edulis* - *M. galloprovincialis* (Кафанов, 1984, 1987; Barsotti, Meluzzi, 1968). Таким образом, имея в своем распоряжении более длительный период аллопатрии, предок *trossulus* располагал большей возможностью для того, чтобы выработать более существенные репродуктивно изолирующие механизмы путем накопления большего числа мутаций, которые плейотропно воздействуют на изолирующий барьер.

Mytilus ex gr *edulis* является группой видов, генетически и эволюционно менее дифференцированной группой по сравнению с близкими им *M (C) coruscus* и *M (P) californianus*, для которых нами показаны существенные генетические расстояния, а также имеются палеонтологические находки (Кафанов, 1984; 1987, Чичвархин и др., 2000). Ряд авторов считает формы *Mytilus* ex gr *edulis* разными видами (MacDonald, Koehn, 1988, MacDonald et al., 1990; 1991, Koehn, 1991), в то время, как остальные либо не придерживаются определенного на этот счет мнения (Gosling, 1992a), либо предлагают придать им ранг полувида (Чичвархин и др., 2000). В своем обзоре по таксономии этой группы, Гослинг (Gosling, 1992b) склоняется считать подвидами *M edulis*. Тем не менее, мы полагаем, что эти таксоны ранга полувида находятся на более высокой ступени видообразования, вступив между собой во вторичный контакт. Согласно палеонтологическим данным и генетическим расстояниям, они были разделены приблизительно один миллион лет назад (Barsotti, Meluzzi, 1968; Skibinsky et al., 1983; Кафанов, 1984; 1987; Чичвархин и др., 2000).

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1 Подтверждена монофилия трибы *Mytilini*. В составе этой трибы выявлена монофилетическая группа видов *Mytilus* ex gr *edulis*, наряду с которой таксоны предположительно подродового ранга – *Crassimytilus* и *Pacifimytilus* формируют монофилетическую группу (род *Mytilus*).

2 Судя по значительным генетическим расстояниям между *Mytilus (P) californianus* и *M (C) coruscus*, сопоставимым с расстояниями между давно дивергировавшими видами, индивиды относимые к этим таксонам, не являются конспецифичными. Выделение монотипичных таксонов *Crassimytilus* и *Pacifimytilus* вполне обосновано.

3 Данные об аллозимной изменчивости пригодны для выведения филогении между таксонами митид в пределах рода, либо близких родов одной трибы. При сравнении видов, относящихся к разным трибам и подсемействам, данный метод оказывается непригодным из-за гомоплазии.

4 Исследованные популяции *Mytilus* ex gr *edulis*, из Японского моря относятся к двум сестринским видам *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*.

5 *Mytilus trossulus* и *M. galloprovincialis* способны к гибридизации на значительной части их Япономорского ареала, однако количество гибридов не превышает в среднем за несколько лет 1,5-9%, что значительно ниже численности гибридов, обнаруженных на северо-востоке Тихого Океана.

ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ РАБОТЫ:

1. **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.
2. **Chichvarkhin A.** Investigation of *Mytilus galloprovincialis* introgression into Russian waters of the Sea of Japan using species-specific PCR marker // International Symposium: Towards a Great Future of Aquatic Genomics Tokyo, Japan. 2000. November 10-12. P. P-24.
3. **Chichvarkhin A** Allozyme-inferred phylogenetic interrelations in marine mussels belonging to subfamily Mytilinae (Mollusca: Mytilidae) // Gene Families and Isozymes Bulletin. 2000. Vol. 33. P. 43.
4. Скурихина Л.А., Картавец Ю.Ф., Панькова М.В. **Чичвархин А.Ю.** Исследование двусторчатых 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.
5. Skurkhina L.A., Kartavtsev Y P, Pankova M.V., **Chichvarkhin A.Y.** Investigation of *Mytilus galloprovincialis* introgression into Russian waters of the Sea of Japan using species-specific PCR markers // MAPEEG, the 3rd International Symposium, Sep 24-27. 2001. P. 26.
6. **Chichvarkhin A.** Phylogeny and taxonomy of marine mussels· comments on the paper by Distel (2000) // Molecular Phylogenetics and Evolution 2002 V 22 №2 P 330-332.

ЧИЧВАРХИН АНТОН ЮРЬЕВИЧ

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ
СИСТЕМАТИКА МИТИЛИН ЯПОНСКОГО МОРЯ
(MOLLUSCA: MYTILIDAE, MYTILINAE)**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Изд. лиц. ИД № 05497 от 01.08.2001 г. Подписано к печати 26.10.2005 г.
Бумага офсетная. Формат 60х84/16. Печать офсетная.
Усл. п. л. 1,44. Уч.-изд. л. 1,3. Тираж 100 экз. Заказ 165.
Отпечатано в типографии ФГУП Издательство «Дальнаука» ДВО РАН
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 7.

05 - 2 2 6 1 9

РНБ Русский фонд

2006-4

28007