

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

МАСАЛЬКОВА Наталья Александровна

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФИЛОГЕНИИ МИДИЙ
(BIVALVIA, MYTILIDAE) ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ РОССИИ И
ОСОБЕННОСТЕЙ ДИВЕРГЕНЦИИ, ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И
МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИДОВ КОМПЛЕКСА
MYTILUS EX. GROUP *EDULIS***

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание учёной
степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор
Картавцев Юрий Федорович

Владивосток – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1. Характеристика объекта исследования.....	14
1.1.1. Современная таксономия семейства Mytilidae.....	14
1.1.2. Вопросы таксономического статуса видов	
<i>Mytilus</i> ex. group <i>edulis</i>	16
1.1.3. Морфология и биология видов семейства Mytilidae.....	19
1.1.3.1. Род <i>Mytilus</i>	22
1.2. Физико-географическая характеристика района исследования.....	27
1.3. Краткий обзор генетико-биохимических или аллозимных методов и	
молекулярно филогенетических подходов, используемых в	
работе.....	30
1.3.1. Генетико-биохимические методы, используемые в работе.....	30
1.3.2. Молекулярно-филогенетические методы, используемые в	
работе.....	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.1. Молекулярно-филогенетическое исследование семейства	
Mytilidae.....	53
3.2. Анализ гибридной зоны двух видов комплекса <i>Mytilus</i> ex. group <i>edulis</i> в	
северо-западной части Японского моря.....	64
3.2.1. Генетический анализ гибридной зоны <i>M. trossulus</i> – <i>M.</i>	
<i>galloprovincialis</i> в северо-западных акваториях Японского моря на	
основе выборок 2011 года.....	64
3.2.2. Генетический и морфологический анализ гибридной зоны <i>M.</i>	
<i>trossulus</i> – <i>M. galloprovincialis</i> в северо-западной части Японского моря	
в 2012 – 2013 гг.....	76

3.2.3. Комплексный анализ гибридной зоны <i>M. trossulus</i> – <i>M. galloprovincialis</i> в северо-западной части Японского моря, по материалам за весь период исследования.....	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	101
ПРИЛОЖЕНИЯ	119

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Б, б. – бухта

В.Д. – восточной долготы

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Зал., зал. – залив

зал. П. Великого – залив Петра Великого

ЗПВ – залив Петра Великого

Млн. – миллион

Пос. – поселок

ПП – программный пакет

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная РНК

С.Ш. – северной широты

Тыс. – тысяча

яДНК – ядерная ДНК

мтДНК – митохондриальная ДНК

BI, BA – Bayesian inference method, метод Байеса

ITS – internal transcribed spacer, внутренний транскрибируемый спейсер

Me-5 или GLU-5 – ген прикрепительного белка нитей биссуса

GBL – гибридный индекс

ML – maximum likelihood method, метод максимального правдоподобия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Митилиды (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) являются сложным и обширным по своему составу семейством. По оценкам разных авторов они представлены разнообразием от 250 (Boss, 1971) до 400 видов, которые, в свою очередь, объединяются в более чем 50 родов (Huber, 2010). Вместе с вымершими формами выделяют 57 таксонов родового ранга (Kafanov, Drozdov, 1998). Некоторые митилиды, в том числе почти все представители подсемейства Mytilinae, имеют ценность как объекты промысла и марикультуры (Bayne, 1964; Скарлато, 1981).

Ископаемые находки мидий значимы для биостратиграфии, так как являются связующим звеном между биологией и геологией (Bayne, 1964; Скарлато, 1981), имея практическую значимость в разведке минеральных ресурсов. Эти находки также могут быть реперными точками для молекулярных датировок, представляя материал для фундаментальных общебиологических обобщений: эволюции, видообразования, понимания сущности вида и его интегрированности. Митилиды входят в состав различных биологических сообществ водной биоты, а некоторые из них, включая исторически молодой комплекс видов *Mytilus* ex. group *edulis*, играют важнейшую роль в формировании самих этих сообществ (Скарлато, Старобогатов, 1979; Seed, 1992).

Распространены мидии от литоральной зоны, (как, например, подавляющее большинство митилин, являющихся объектом данного исследования) до глубин в несколько километров. Они формируют поселения на каменистых и галечных грунтах, сверлят камни, поселяются в илах (Bayne, 1964; Скарлато, 1981), а также в районах глубоководных гидротермальных источников и на выходах холодных минерализованных вод (Lutz, Kennish, 1993; Distel, et al., 2000).

Эволюционные и таксономические исследования на митилидах проводили многократно. Однако, большинство филогенетических гипотез, выдвинутых в течение последнего столетия на основе классических морфологических работ для *Mytilidae* в целом, а также для таких подсемейств как *Mytilinae* и *Modiolinae*, весьма противоречивы.

Одним из родов, вызывающих большое число вопросов по поводу таксономического статуса, является род *Mytilus*, включающий три основных таксона *M. trossulus*, *M. edulis* и *M. galloprovincialis*. Причиной нерешенных таксономических вопросов в данном роде является генетическая близость видов, а также их морфологическая пластичность. Так, например, в большинстве современных работ *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* (таксоны, которые наиболее полно представлены в данном исследовании) рассматриваются как отдельные виды. Тем не менее, высказываются мнения о том, что только один из видов комплекса *M. trossulus* является видом, а остальные следует рассматривать в ранге полувидов (Kartavtsev et al., 2005). По другим воззрениям, оба вида являются подвидами (Gardner, 1992) или экотипами *M. edulis* (Hummel et al., 2001). Несмотря на то, что морфологические признаки на протяжении долгого времени являлись основным диагностическим инструментом систематики митилин (включая *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*), на их основе достаточно сложно сделать таксономически оправданное заключение по причине высокой фенотипической пластичности особей разных таксонов (Seed, 1968; Gosling, 1992), обусловленной экологическими факторами, а не их историческо-генеалогической и, соответственно, наследственно обусловленной разобщенностью (Kartavtsev et al., 2005).

Осложняет ситуацию то, что все три основных вида комплекса *Mytilus* ex. group *edulis* могут образовывать симпатричные популяции, с наличием гибридных особей, в различных районах Мирового океана. В частности, в заливе Петра Великого Японского моря образована гибридная зона *M.*

trossulus и *M. galloprovincialis*. Исследование этой зоны является отдельным предметом диссертационной работы. В настоящее время признается, что генетико-биохимические и молекулярно-генетические признаки являются наиболее эффективными для идентификации видов, а также для изучения изменчивости и дивергенции как мидий комплекса *Mytilus* ex group *edulis*, так и многих других таксонов гидробионтов (McDonald, Koehn, 1988; Скурихина et al., 2001; Hilbish et al., 2002; Kartavtsev et al., 2005; 2018). Несмотря на то, что молекулярно-генетические и генетико-биохимические методы имеют свои недостатки, именно они позволяют выявлять гибридных особей мидий с наибольшей точностью. Эволюционно-филогенетические реконструкции на основе генных маркеров, как отмечено выше, также более оправданы. Именно при использовании популяционно- и эволюционно-генетических подходов достоверно доказана гибридизация видов комплекса *Mytilus* ex group *edulis* в разных частях Мирового океана, что не удавалось ранее, при использовании только морфологических признаков и соответствующих методов анализа (Skibinski et al., 1978; McDonald, Koehn, 1988; Скурихина et al., 2001; Hilbish et al., 2002; Smietanka et al., 2014; Kartavtsev et al., 2005; 2018).

Есть и другие вопросы, связанные с экспериментальным анализом сущности вида, генетических основ видообразования и формирования количественной теории видообразования, которые пока слабо проработаны. Работа в этом направлении значительно продвинет существующие обобщения в мировой литературе и по оценке значения молекулярного полиморфизма для эволюционной биологии.

Исходя из представленного рассмотрения предметной области, ясно, что комплексное популяционно-генетическое, морфометрическое и молекулярно-филогенетическое исследование с применением методов биохимической и молекулярной генетики, а также современных многомерных статистических подходов при анализе изменчивости

морфологических и других признаков, является крайне актуальным и имеет как важное фундаментальное значение, так и потенциальные приложения в марикультуру и рыбохозяйственную практику в целом.

В данной работе комплексное исследование проводилось на основе 4 – 8 аллозимных локусов, двух маркеров ядерной ДНК: *Me-5 (GLU-5)* и *ITS-1,2* и 11 морфологических признаков. Для молекулярно-филогенетического исследования использовались три молекулярных маркера ядерной ДНК (яДНК), кодируемых генами: *28S рРНК*, *18S рРНК* и гистона *H3*.

Степень разработанности темы. Исследованию систематики мидий (*Bivalvia*, *Mytilidae*), которая постоянно пересматривалась и дополнялась в течение десятков лет, посвящено большое число работ (Soot-Ryen, 1955; Seed, 1968; Newell, 1969; Boss, 1971; Habe, 1977; Скарлато, Старобогатов, 1979; Bernard, 1983; Moore, 1983; Kafanov, Drozdov, 1997; Higo et al., 1999; Distel, 2000; Chichvarkhin, 2002).

Большинство этих работ основано на морфологии. Подсемейства и рода, в основном, описывались по форме и признакам створок, отпечатков мускулов замыкателей и особых образований – «зубов» раковин (Soot-Ryen, 1955; Seed, 1968; Newell, 1969; Boss, 1971). Наиболее известной, основанной на палеонтологических данных, классификацией является так называемая «сут-райэновская» (Soot-Ryen, 1969). Помимо нее было предложено еще несколько схем классификации митилид. Более поздние классификации (Bernard, 1983; Moore, 1983) выделяли те же подсемейства, что и Сут-Райэн (Soot-Ryen, 1955), но с отличным составом (Kafanov, 1987). Позже Хабэ (Habe, 1977) выделил пятое подсемейство, *Musculinae* Iredale, 1939, а Хиго с соавторами (Higo et al., 1999) дополнили список подсемейств сравнительно недавно описанными *Dacrydiinae* Ockelmann, 1983 и *Bathymodiolinae* Kenk et Wilson, 1985.

Одним из родов, вызывающих большое число вопросов по поводу таксономического статуса видов, является род *Mytilus*, с тремя общепризнанными видами: *M. trossulus* Gould, 1850, *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *M. edulis* Linnaeus, 1758. (Heath et al., 1995; Inoue et al., 1997; Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005). Систематика видов мидий рода *Mytilus* традиционно основывалась на морфологических признаках. Наиболее подходящим признаком для дифференциации пары видов *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* был признан характер развития наружного призматического слоя на внутренней поверхности раковины (Золотарев, 1989; Золотарев, Шурова, 2008). Более широко взглянуть на проблему удалось с развитием генетико-биохимических методов и появившихся на их основе многочисленных новых данных, которые расширили представления о популяционно-генетических процессах и о систематике группы видов *Mytilus* ex. group *edulis*. Выявились отчетливые различия *M. galloprovincialis*, *M. edulis* и *M. trossulus* по генотипам ряда аллозимных локусов (Koehn, 1991; Gosling, 1992; Hummel et al., 2001; Kartavtsev et al., 2005), а также, по полиморфным маркерам яДНК и мтДНК (Heath et al., 1995; Rawson et al., 1996; Inoue et al., 1997; Hilbish et al., 2000; Скурихина и др., 2001).

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является исследование внутривидовой и межвидовой изменчивости и дивергенции мидий, преимущественно подсемейства *Mytilinae*, на основе генетико-биохимических и молекулярных маркеров генов, а также с использованием морфологических признаков, и приложение полученных данных в эволюционную генетику и систематику таксона.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести молекулярно-генетическое исследование изменчивости и дивергенции нуклеотидных последовательностей трех генов – 28S рРНК, 18S

рРНК, а также гистона H3, и на этой основе выполнить реконструкцию филогении мидий (Mytilidae) и уточнить систему таксона.

2. На основе генетико-биохимических и молекулярно-генетических маркеров генов, а также используя морфологические признаки, провести популяционно-генетическое и морфометрическое исследование зоны гибридизации между двумя представителями рода *Mytilus* – аборигенным для Японского моря *M. trossulus* и интродуцированным (инвазивным) *M. galloprovincialis*.

3. Выполнить исследование сопряженности аллозимной, молекулярно-генетической и морфологической изменчивости.

4. Оценить наличие и уровень интрогрессивной гибридизации пары видов *M. trossulus* – *M. galloprovincialis* в заливе Петра Великого на основе комплексного популяционно–генетического и морфометрического анализа.

Научная новизна. Впервые, для анализа внутривидовой и межвидовой изменчивости и дивергенции видов мидий комплекса *Mytilus* ex. group *edulis* (в данном случае *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*) в зал. Петра Великого и близлежащих акваториях был использован комплекс генетико-биохимических, молекулярно-генетических и морфометрических признаков. На основе точной генотипической идентификации с использованием молекулярных маркеров в проведенном исследовании впервые доказано существование обособленных поселений вида-интродуцента *M. galloprovincialis*, расположенных в районе пос. Зарубино в зал. Посьета и в б. Киевка. В данной работе доказано, что признаки морфологии лигамента (LP_L) и положения заднего ретрактора (LPR_L) не могут считаться абсолютно диагностическими для идентификации особей видов *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*, как это предполагалось ранее. Установлена монофилия семейства Mytilidae и подсемейства Mytilinae, первое из которых ранее было признано полифилитичным. Подтверждено выделение таксонов Modiolinae

G. Termier & H. Termier, 1950 и Bathymodiolinae Kenk & Wilson 1985 в ранге подсемейств внутри семейства Mytilidae.

Теоретическое и практическое значение работы. Данные, полученные в ходе настоящей работы, могут быть полезны для понимания систематики Mytilidae и истории их эволюции. А результаты исследования гибридизирующих видов *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* помогут лучше идентифицировать особей этих видов и их гибридов друг от друга, что может быть полезным для хозяйств, занимающихся их разведением. Многие виды семейства Mytilidae являются важными промысловыми объектами, культивируемыми в разных странах. Очевидно, что исследование таких видов необходимо с практической точки зрения.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной работе традиционный генетико-биохимический и морфологический методы анализа использованы наравне с современными молекулярно-генетическими методами. Фрагменты ДНК для молекулярно-генетического анализа получали посредством выделения методом HotSHOT. Амплификацию осуществляли про помощи ПЦР. Филогенетические деревья реконструировались с использованием подходов максимального правдоподобия (ML), Байесовского (BA), максимальной парсимонии (MP) и ближайшего соседства (NJ) в программном пакете MEGA.

Морфометрическое исследование основано на широко используемых многомерных подходах (Sokal, Sneath, 1963; Afifi, Azen, 1979; Андреев, 1980). Особи проанализированы по 11 основным мерным признакам и 10 индексам.

Анализ изменчивости частот генотипов и аллелей проведен по 6–8 аллозимным локусам, которые являются полудиагностическими для дискриминации видов *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*. Для оценки видовой принадлежности отдельных особей по мультилокусным генотипам применяли программу Structure (Pritchard et al., 2000).

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведены сбор, идентификация, фиксация и первичная обработка материала для анализа гибридной зоны *Mytilus* ex. group *edulis* и часть материала для филогенетического анализа, сравнительно-морфологический и молекулярно-генетический анализ собранного материала, обработка данных. Автор принимала участие в подготовке материалов для публикаций и предоставления результатов исследования на конференциях.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Семейство Mytilidae и подсемейство Mytilinae являются монофилитичными по своей структуре.

2. Морфологические признаки LP и LP_L, которые ранее считались полностью диагностическими для дискриминации видов рода *Mytilus*, не могут считаться таковыми.

3. Инвазия вида *M. galloprovincialis* на территорию залива Петра Великого продолжается. Граница ареала этого вида протекает севернее районов, документированных ранее в генетических исследованиях, в б. Киевка и б. Лазурная.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена использованием комплекса традиционных и современных молекулярно-генетических подходов и статистической обработкой полученной информации. Различные подходы и методы анализа позволили всесторонне взглянуть на проблему, проанализировать ее и получить более точные результаты. Все полученные результаты и выводы подкреплены данными, приведенными в рисунках и таблицах.

Апробация результатов работы. Результаты работы представлены на годичных конференциях ННЦМБ ДВО РАН (Владивосток, 2014 – 2018), на международном симпозиуме «Modern Achievements in Population,

Evolutionary, and Ecological Genetics» (Владивосток, 2015, 2017, 2019) и на международном семинаре по биоразнообразию и эволюции моллюсков «International Seminar on Biodiversity and Evolution of Mollusks» (Владивосток, 2019).

Публикации. По результатам исследования опубликовано 10 научных работ: 4 – статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, 6 – тезисы научных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 118 страницах, содержит 13 рисунков и 7 таблиц. Работа состоит из Введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», а также «Заключения», «Выводов», «Списка литературы» и 4 Приложений. Список литературы содержит 154 источник, из них 109 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю Картавцеву Юрию Федоровичу за постановку задач и, всестороннюю помощь и поддержку в ходе подготовки настоящей работы, Католиковой Марине Викторовне за предоставленный материал и помощь в подготовке диссертации, Лутаенко Константину Викторовичу и Чичвархину Антону Юрьевичу за помощь в определении материала, а также коллективам Лаборатории генетики и Лаборатории молекулярной систематики за помощь в формировании экспериментальных навыков и содействие в работе.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика объекта исследования

1.1.1. Современная таксономия семейства *Mytilidae*

Систематика мидий (*Bivalvia*, *Mytilidae*), хоть и разрабатывается давно, имеет немало сложностей. Семейство включает в себя 250 видов, относящихся к 33 родам (Boss, 1971) и 4 подсемействам (Newell, 1969). Подсемейства и рода, в основном, описаны по форме и признакам створок, отпечатков мускулов замыкателей и особых образований – «зубов» раковин.

Согласно одному из наиболее ранних обобщений системы мидий (Soot-Ryen, 1955), виды, у которых вершина раковины смещена на её передний край и занимает терминальное или субтерминальное положение, а сама раковина заостренная, треугольной или веерообразной формы, относят к подсемейству *Mytilinae*, в то время как виды, у которых макушка и передний конец раковины не совпадают, а раковина имеет более округлую форму, относят к *Modiolinae*. Моллюсков с формой тела *Modiolinae* с ярко выраженной постериорной и антериорной радиальной скульптурой раковины разделенными гладким центральным регионом относят к *Crenellinae*. А виды бурящие камни, кораллы или живущие в иле, имеющие вытянутую цилиндрическую раковину относят к подсемейству *Lithophaginae*. Некоторые таксоны, тем не менее, имеют промежуточные формы и места обитания или могут меняться в течение жизни. Более того, форма раковины может очень сильно зависеть от условий окружающей среды и от возраста животного. (Seed, 1968).

Эволюционные и таксономические исследования на митилидах проводили многократно. Однако, большинство филогенетических гипотез, выдвинутых в течение последнего столетия на основе классических морфологических работ для *Mytilidae* в целом, а также для таких

подсемейств как *Mytilinae* и *Modiolinae*, весьма противоречивы. Наиболее полную на сегодняшний день молекулярно-филогенетическую гипотезу относительно митилид предложил Дистел в своей работе, основанной на нуклеотидной последовательности гена *18S* рРНК (Distel, 2000). Эта филогения включала только 12 видов, относящихся к шести родам митилид, 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. Также Дистел отметил схожую скорость дивергенции гена *18S* рРНК у исследованных им родов митилид, причем уровень этой дивергенции был приблизительно равен различиям между представителями различных семейств *Bivalvia*. Помимо этого, Дистел предложил гипотезу о неоднократном возникновении модиолоидного и митилоидного строения тела митилид. Однако эта гипотеза была поставлена под сомнение (Chichvarkhin, 2002), так как в исследование Дистела не были включены иные митилоидные формы, кроме *Mytilinae*, а также вследствие того, что раковина представителей рода *Normomys*, оказавшегося причиной полифилии *Mytilinae sensu* Newell в действительности вряд ли может быть классифицирована как митилоидная. Отметим и тот факт, что филогения Дистела имела существенные разногласия с результатами исследований морфологии спермиев митилид (Kafanov, Drozdov, 1997) и генетико-биохимических признаков (Чичвархин и др., 2000).

Помимо наиболее известной, основанной на палеонтологических данных, так называемой «сут-райэновской» классификации (Soot-Ryen, 1969), последовательно использованной Ньюэллом и Дистелем, было предложено еще несколько схем классификации митилид. После первого обзора Сут-Райэна (Soot-Ryen, 1955) стало обычной практикой выделять среди митилид четыре подсемейства: *Mytilinae* Soot-Ryen, 1955, *Crenellinae* Gray, 1840, *Lithophaginae* H.Adams et A.Adams, 1857, и *Modiolinae* Keen, 1958. Более

поздние классификации (Bernard, 1983; Moore, 1983) выделяли те же подсемейства, что и Сут-Райэн, но с отличным составом (Kafanov, 1987). Позже Habe (1977) выделил пятое подсемейство, Musculinae Iredale, 1939, а Higo et al. (1999) дополнили список подсемейств сравнительно недавно описанными Dacrydiinae Ockelmann, 1983 и Bathymodiolinae Kenk et Wilson, 1985.

Совсем иную систему предложили Скарлато и Старобогатов (Скарлато, Старобогатов, 1979; Скарлато, 1981; Starobogatov, 1992), которые разделили Mytiloidea на четыре отдельных семейства: Mytilidae, Crenellidae, Septiferidae и Lithophagidae. Последнему таксону также придается ранг семейства в обзоре двустворок северо-западной Пацифики (Coan et al., 2000), хотя позднее такой таксон не рассматривается (Carter et al., 2011). Скарлато и Старобогатов выделили дополнительно 13 подсемейств (Kafanov, 1987). Эта система подразумевает также полифилию сут-райэновского семейства Mytilidae. К сожалению, диагнозы таксонов в описаниях Скарлато и Старобогатова слишком кратки, а предложенная схема классификации лишена какой-либо аргументации.

1.1.2. Вопросы таксономического статуса видов *Mytilus* ex. group *edulis*

Одним из родов, вызывающих большое число вопросов по поводу таксономического статуса видов, является род *Mytilus*, с тремя общепризнанными видами: *M. trossulus* Gould, 1850, *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *M. edulis* Linnaeus, 1758. Причиной большинства таксономических споров в данной группе видов является генетическая и морфологическая близость трех номинально признаваемых видов таксона. Осложняет исследования также то, что особи этих видов имеют зоны симпатрии и дают гибридные формы друг с другом в различных районах мирового океана (Heath et al., 1995; Inoue et al., 1997; Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005).

Систематика видов мидий рода *Mytilus*, как и других, традиционно основывалась на морфологических признаках. Точность диагностики, однако, осложняется высокой фенотипической пластичностью видов рода по этим признакам. Что выражается в сильном морфологическом сходстве моллюсков разных видов и значительном перекрывании вариационных рядов ключевых диагностических морфологических признаков.

Наиболее подходящим признаком для дифференциации пары видов *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* является характер развития наружного призматического слоя на внутренней поверхности раковины (Золотарев, 1989). Для большинства особей *M. trossulus*, в том числе для моллюсков, обитающих в заливе Петра Великого Японского моря, характерны раковины с непрерывным призматическим слоем (Золотарев, 1989; Золотарев, Шурова, 2008). Для особей *M. galloprovincialis*, наоборот, характерно отсутствие призматического слоя под лигаментом или он может заходить только под заднюю часть лигамента (Золотарев, Шурова, 1997).

На практике, виды этого рода обладают высокой фенотипической пластичностью, так что ни один отдельно взятый морфологический признак не может обеспечить надежное разделение видов (McDonald et al., 1991; Kartavtsev et al., 2005; Шурова, 2013). В этом случае больше шансов отличить один вид от другого дает использование многомерного морфометрического анализа с расчетами индексов, определяющих морфологические признаки этих видов. Но даже при помощи данного анализа сложно достоверно различить *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*, в виду того, что канонические функции для этих двух видов также частично перекрываются и это приводит к ошибкам классификации (MacDonald et al., 1991; Kartavtsev et al., 2005).

Отсутствие четких морфологических диагностических признаков для разделения видов естественным образом определяет разнообразие взглядов о

видовом составе и таксономическом ранге представителей рода (Kartavtsev et al., 2005, 2018; Картавец и др., 2014; Zbawicka et al., 2018).

Развитие генетико-биохимических методов и появившиеся на их основе многочисленные новые данные расширили представления о популяционно-генетических процессах и о систематике группы видов *Mytilus* ex group *edulis*. Выявились отчетливые различия *M. galloprovincialis*, *M. edulis* и *M. trossulus* по генотипам ряда аллозимных локусов (Koehn, 1991; Gosling, 1992; Hummel et al., 2001; Kartavtsev et al., 2005), а также, по полиморфным маркерам яДНК и мтДНК (Heath et al., 1995; Rawson et al., 1996; Inoue et al., 1997; Hilbish et al., 2000; Скурихина и др., 2001, Масалькова и др., 2016; Kartavtsev et al., 2018). На основе этих молекулярных маркеров генов появилась возможность не только идентификации представителей трех таксонов, но обнаружения и гибридных особей. Помимо этого, с использованием генетико-биохимических методов, а позже с применением и ДНК-маркеров, было показано, что гибридизация между этими тремя видами мидий распространена значительно шире, чем предполагалась ранее, при использовании только лишь морфологических признаков (McDonald, Koehn, 1988; Скурихина et al., 2001; Hilbish et al., 2002; Kartavtsev et al., 2005). Но, даже не смотря на новые данные и немалое число исследований, вопрос о таксономии *Mytilus* ex group *edulis* продолжает дискутироваться, развиваются новые идеи.

1.1.3. Морфология и биология видов семейства *Mytilidae*

Тип *Mollusca* Cuvier, 1797

Класс *Bivalvia* Linne, 1758

Надотряд *Autobranchia* Grobben, 1894

Отряд *Mytiliformes* Ferussac, 1822

Подотряд *Mytiloidei* Ferussac, 1822

Надсемейство *Mytiloidea* Rafinesque, 1815

Семейство *Mytilidae* Rafinesque, 1815

Мидии – типичные обитатели прибрежной зоны, где они часто образуют массовые поселения, обычно прикрепляются к твердым субстратам, таким как камни и кораллы. Однако, виды предпочитающие другие места обитания обычно живут по одиночке, например, большинство *Modiolinae* обитают в мягком иле (Yonge, 1976).

Раковина у мидий удлинённая и клиновидная, суженная спереди и расширенная сзади. Макушка сдвинута на передний (приостренный) конец раковины. Передний мускул-замыкатель, у всех представителей семейства, маленький и узкий, а задний – большой, округлый. Окраска раковины темная, часто иссиня-черная, внутренняя поверхность имеет тонкий перламутровый слой. Имеется несколько мелких замковых зубчиков; хорошо развит биссус (Newell, 1969).

Краткое изложение биологии представлено ниже на основе сводки Зенкевича (1968). «Железа, выделяющая биссусные нити, лежит у мидий в маленькой пальцевидной ноге, которая у взрослых мидий благодаря их неподвижному образу жизни почти полностью утратила свою двигательную функцию. Молодые мидии (менее 1 – 2 см длиной) могут хорошо передвигаться, что можно видеть, наблюдая их в аквариуме. Взрослые же мидии меняют свое место обитания лишь при очень неблагоприятных условиях, обрывая биссус и переходя на новое место. Крепкие нити биссуса дают им возможность выдерживать действие даже сильного прибоя, и только

удары волн самого сильного шторма могут обрывать связки мидий, опустошая их поселения. Лишь сеть из остатков биссусных нитей на скалах, остатки раковин да битая ракушка указывают на места их недавних густых поселений.

Биссусная железа состоит из двух частей: одна лежит в глубине ноги, у ее основания, а другая – на ее переднем конце. Выделенное первой частью железы вещество нити попадает в бороздку, идущую вдоль нижней поверхности ноги до ее вершины. Здесь она и приклеивается к субстрату особым прикрепительным диском, который выделяется другой частью железы. Нити биссуса прикрепляются к субстрату в определенном порядке и своим натяжением, как якорями, удерживают животное. Кроме того, у мидий для втягивания ноги имеется несколько пар мускулов, прикрепленных изнутри к створкам. При их сокращении; моллюск подтягивается и прижимается к субстрату, а не просто болтается на нитях биссуса, поэтому даже при очень сильном прибое мидии не разбиваются о скалы. Мидии раздельнополы, но пол их можно определить лишь у молодых форм по цвету их созревающих половых желез, частично залегающих в складках мантии: у самцов обыкновенной съедобной мидии мантия имеет кремовый, а у самок – оранжевато-красный цвет, а у дальневосточной гигантской мидии – соответственно белый и розовый цвет. Размножаются мидии в наиболее теплое время года. Оплодотворение яиц происходит в воде, куда выбрасываются половые продукты.

Плодовитость мидий очень велика и повышается с возрастом. Обычно во время каждой кладки самка мидии выбрасывает от 5 до 12 млн. яиц, а крупные экземпляры – до 25 млн. Самка гигантской мидии начинает размножаться на шестом году жизни (продолжительность жизни этой мидии около 20 лет), откладывая каждый раз около 20 млн. яиц. Примерно через 20 часов после оплодотворения из яйца появляется личинка трохофора, которая дня через два плавания в толще воды превращается в личинку парусник (велигер). При неблагоприятных для оседания условиях продолжительность

планктонной (плавающей) стадии жизни личинки парусника может сильно затягиваться от нескольких дней до нескольких месяцев. При размере 0,2 – 0,3 мм велигер оседает на дно, имея уже по 2 пары жаберных нитей. Некоторое время молодая мидия еще ползает по дну, но потом прикрепляется биссусом. Молодь мидий в большом количестве обычно встречается в зарослях литоральных водорослей, которые предохраняют их от высыхания во время отлива.

К концу первого года жизни молодь мидии у берегов Европы достигает 3 – 4 см длины, а в Белом море – всего 0,5 см; живет мидия до 13 – 14 лет. Пищей мидий является детрит (остатки водных растений и животных), а также живущие в толще воды одноклеточные водоросли, мелкие планктонные животные и бактерии. При температуре около 20°C одна мидия (в 5 – 6 см длины) может профильтровать около 3 л воды в час; плотное же поселение мидий на банке может профильтровывать за сутки от 50 до 280 м³ воды. Таким образом, большие поселения мидий представляют собой мощный биофильтр, высасывающий из окружающей воды большое количество взвеси, как минеральной, так и органической, и мелкого планктона. Пищевые частицы при этом отсортировываются и направляются в ротовое отверстие, а более тяжелые и минеральные удаляются в виде псевдофекалий. Таким образом, мидии, как и многие другие двустворчатые моллюски (связочнозубые, подавляющее большинство разнозубых и гребенчатозубых), – активные фильтраторы. Они не только очищают окружающую воду от взвеси, но своими псевдофекалиями и фекалиями принимают участие в образовании илистых грунтов. Мидии обычно питаются круглый год, но зимой менее интенсивно.

У мидий множество врагов среди морских рыб, птиц и млекопитающих. Птицы охотятся на них во время отлива на литорали. Мидиевые банки в мелководных районах сильно страдают от скатов, камбал и трески, а в Черном море – от осетровых рыб. Но постоянным их врагом, обитающим обычно в районах поселений мидий, являются крупные морские

звезды, которые ими питаются, как, например, в Атлантике – *Asterias rubens*, а в дальневосточных морях – *Asterias amurensis*, *Patiria pectinifera* и другие. Одна звезда съедает ежедневно в среднем одну – две мидии размером до 2 см. Охотятся на них также крабы, крупные брюхоногие моллюски и другие.

К семейству Mytilidae относится много массовых видов: мидий, модиолусов, мускулюсов, митилястеров и другие, являющихся широко распространенными в морях земного шара, преимущественно в мелководных их районах. Наиболее широко известны мидии, многие виды которых являются съедобными и промысловыми: обыкновенная съедобная мидия (*M. edulis*), дальневосточная гигантская мидия, или черная ракушка (*Crenomytilus grayanus*), средиземноморско-черноморская мидия (*M. galloprovincialis*), калифорнийская (*M. californianus*), мидия Магеллана (*M. magellanicus*) и другие»

1.1.3.1. Под *Mytilus*

Виды рода *Mytilus* широко распространены по всему миру и играют важную роль в биоценозах. Они являются очень важным и распространенным ресурсом промысла (Иванов, 1989). Мидии, как уже было отмечено ранее, обладают высоким фильтрационным потенциалом и способны фильтровать от 50 до 280 кубических метров воды за час (Моисеев и др., 1985). Высоко ценятся в медицине, так как обладает лечебными качествами, их ткани содержат природные антиоксиданты и более 30 полезных микроэлементов (Супрунович, Макаров, 1990).

Раковина у мидий комплекса *Mytilus* ex. group *edulis* с симметричными створками клиновидно овальной формы и синим перламутром. Передний край раковины заостренный, в отличие от округленного заднего. Спинной, обычно, более выпуклый, чем брюшной.

Стенки раковины состоят из трех слоев: конхиолинового периостракума (наружный слой), известкового остракума (внутренний слой) и перламутрового гипостракума (нижний слой). Наружный слой, обычно,

блестящий и гладкий, но у старых мидий может разрушаться. Наружная поверхность раковины мидии покрыта концентрическими линиями роста и радиальными ребрами.

Одной из черт этого рода являются слабо развитые или же полностью отсутствующие зубы замка. Задний аддуктор крупного размера занимает центральное положение, в то время как передний очень мал. Нога языкообразная и удлинённая, хорошо развит биссус.

Цвет раковины варьирует, поскольку, так же как и его форма, зависит от места обитания моллюска. Чаще всего раковина черного цвета, но не исключены особи с темно-коричневым и темно-оливковым окрасом (Догель, 1981; Иванов и др., 1989).

Основным источником пищи для представителей этого рода является фитопланктон, который они добывают посредством фильтрации толщи воды (Newell, 1989). Но помимо планктона, мидии способны питаться зоопланктоном мелкого размера, детритом и бактериями. Органические частицы они используют в пищу, а крупные и минеральные удаляют в виде псевдофекалий в мантийную полость и через сифон выводят наружу (Моисеев и др., 1985).

Распределение, численность и рост моллюсков рода *Mytilus* в различных биотопах зависят от множества факторов, среди которых важную роль имеют температура, соленость, характер грунта, течения, волновое воздействие, наличие подходящего субстрата и пищи (Сое, Фох, 1942; Фох, Сое, 1943; Seed, 1968; Селин, Лысенко, 2006).

Вид *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819

Этот вид широко распространен в Европе и Северной Америке. Был описан Ламарком в 1819 году. Обитает в Средиземном море и у южного побережья Африки, от Намибии до Порты Альфреда, в Чёрном и Азовском морях.

M. galloprovincialis можно обнаружить на различных грунтах от открытых каменных пляжей, до песочного дна (Ceccherelli, 1984). Особи вида предпочитают дно с песчаным, илисто-песчаным, гаечным, гравийным грунтом. Как интродуцент моллюск обычно заселяет каменистые пляжи с высокой частотой колебания воды. В отличие от остальных азиатских и атлантических моллюсков, представленных в тихоокеанском регионе, только один вид, а именно *M. galloprovincialis*, заселяет открытые пляжи, остальные предпочитают заливы и эстуарии (Carlton, 1992). Крепится к прибрежным камням пучками очень крепких нитей – биссусом, но глубже живет на илах, сцепляясь друг с другом, или запуская биссус, как корни, глубоко в ил. На скалах и камнях образует щётки, а на мягких грунтах прикрепляется к мелким камешкам и пустым створкам и образует друзы. Часто встречаются на морских инженерных сооружениях разного типа, например, на волнорезах, пирсах, дамбах. Массовые скопления мидий наблюдаются на глубине 1-20 метров. Оптимальная температура воды для роста и развития этой мидии 15-18°C, с соленостью 16-18‰. Раковина у этой мидии умеренно выпуклая, четырёхугольно-клиновидной формы. Окрас раковины, обычно, черный или черно-фиолетовый, встречаются и светло-коричневые особи. Цвет перламутра синий или сине-коричневый. Достигают длины до 140 мм, высота – до 75 мм, ширина – до 52 мм.

Половая зрелость средиземноморской мидии наступает на первом году жизни, когда длина створок 20 – 25 мм. Размножение у средиземноморских мидий круглогодичное. Плодовитость средиземноморских мидий составляет 2 – 10 млн. яйцеклеток. (Монин, Монина, 1987). Наиболее высокая плодовитость отмечена при высокой температуры воды (Bayne, 1976). В северо-западной части Черного моря мидии достигают половой зрелости в 3,5 месяца, после оседания на субстрат, при выращивании на коллекторах. Высокие темпы роста мидий наблюдаются в три первых года жизни. Продолжительность жизни средиземноморских мидий колеблется около 20

лет. Максимальный возраст мидии, найденной в Черном море, достигает 28 лет (Шурова, 2013).

Вид *Mytilus trossulus* Gould, 1850

Амфибореальный вид мидий, широко распространенный как в Атлантическом (Балтийское, Баренцево и Белое моря), так и в Тихом (дальневосточные моря России и западное побережье Северной Америки) океанах (Коэн, Пудовкин, 1988; Мак-Дональд и др., 1990; Koehn, 1991; Gosling, 1992; Toro et al., 2004; Väinölä, Strelkov, 2011; Brooks, Farmen, 2013). Столь широкое распространение тихоокеанской мидии обусловлено её относительной древностью, представляющей предковый элемент комплекса *Mytilus* ex group *edulis* (Кафанов, 1991), эврибионтностью, а также, очевидно, следствием различных инвазий благодаря обрастанию судов и интенсивному судоходству.

Впервые вид был описан в 1991 году Мак-Дональдом и Коэном на Тихоокеанском побережье штата Орегон (США) (McDonald, Koehn, 1991). Ведет прикрепленный образ жизни. Преимущественно встречается на скалистых и каменистых грунтах, нередко можно обнаружить в скалистых ваннах верхней литорали. Так же селится, хоть и реже, на песчаных, галечно-гравийных и песчано-илистых грунтах, где прикрепляется к отдельно лежащим камням и к раковинам других моллюсков, образуя друзы – плотно скрепленное между собой поселение. Поселения мидий обнаружены до глубины 40 метров (Кафанов, 1991). В северных районах этот вид встречается до глубины 10 метров (Ошурков, Буяновский, 1986). В дальневосточных морях, он обитает в литорально-сублиторальной зоне, до глубины 2,5 – 3 метров (Селин, 1990).

Основным морфологическим отличием тихоокеанской мидии от остальных видов *Mytilus* ex. group *edulis*, в согласии с представленным ранее описанием, является наличие вдоль лигамента участка, где перламутровый слой не выражен, и на внутреннюю поверхность раковины выходит

призматический слой (Золотарев, Шурова., 1997). К сожалению, этот признак не является абсолютно диагностическим и его анализ отдельно от других признаков не дает 100% гарантированной идентификации особей. Для более точной идентификации особей вида по морфологическим признакам требуется использовать комбинацию всех признаков, включая молекулярные маркеры генов (Kartavtsev et al., 2005).

Половая зрелость наступает на первом году жизни. В первую очередь, сроки и активность нереста зависят от температуры воды и запускаются при достижении водой определенной температуры (Seed, 1976; Seed, Suchanek, 1992; Архипова, 1998). По этой причине, время нереста в различных морях дальневосточного региона разнится. Например, около берегов Камчатки нерест продолжается с июля и до второй половины августа, при температуре поверхностного слоя воды в 10 – 13°C (Архипова, 1998). В то время как в Японском море, у берегов Приморья, нерест начинается со второй половины мая, при достижении температуры поверхностного слоя воды в 10°C, и по сентябрь (Брыков и др., 2004; Омеляненко et al., 2004). Плодовитость одной самки варьирует от 300 тыс. до 2 млн. яйцелеток (Буяновский, 1987а).

Личиночный рост тихоокеанской мидии происходит летом, в течении июня – августа, примерно за 30 суток при температуре прибрежных вод в 12 – 15°C (Шепель, 1986). Однако, из-за последовательного вступления в нерест особей, обитающих на разной глубине в одной локальной акватории и заносом личинок из других регионов (Брыков и др., 1996), личинки мидий в планктоне могут появляться на протяжении 2,5 – 3 месяцев (Буяновский, Куликова, 1984; Шепель, 1986; Брыков и др., 1996).

1.2. Физико-географическая характеристика района исследования

Основным районом исследования в настоящей работе является залив Петра Великого – самый крупный залив Японского моря, который находится в северо-западной части моря между параллелями $42^{\circ}17'$ и $43^{\circ}20'$ с. ш. и меридианами $130^{\circ}41'$ и $133^{\circ}02'$ в. д. Залив занимает площадь в 9 тысяч квадратных километров и тянется 1500 километров вдоль береговой линии (включая острова). Воды залива Петра Великого ограничены со стороны моря линией, соединяющей устье реки Туманная (Тюмень-Ула) с мысом Поворотный. (Ростов, 2005). Самый крупный полуостров залива, Муравьева-Амурского, делит акваторию залива Петра Великого на две большие части, занимаемые Амурским и Уссурийским заливами.

В западный берег южной части Амурского залива вдаются Славянский залив, бухты Табунная, Нарва и Перевозная. Береговая линия северо-восточной части Амурского и северо-западной части Уссурийского залива относительно слабо изрезана. На восточном берегу Уссурийского залива выделяются бухты Суходол, Андреева, Теляковского, Вампаусу и Подъяпольского.

Помимо Уссурийского и Амурского заливов наиболее значительными являются – заливы Посъета, Стрелок, Восток и Находка.

Следующая информация дана на основе данных Ростова и других (2005):

«Циркуляция вод в заливе Петра Великого формируется под влиянием постоянных течений Японского моря, приливо-отливных, ветровых и стоковых течений. В открытой части залива отчетливо прослеживается Приморское течение, которое распространяется в юго-западном направлении со скоростями 10 – 15 см/с. В юго-западной части залива оно поворачивает к югу и дает начало Северо-Корейскому течению, наиболее выраженному на подповерхностных горизонтах. В Амурском и Уссурийском заливах влияние Приморского течения отчетливо проявляется только при отсутствии ветра,

когда в Уссурийском заливе формируется антициклоническая циркуляция вод, а в Амурском - циклоническая. Ветер, приливо-отливные явления и сток реки Раздольная (в Амурском заливе) вызывают существенную перестройку поля течений. Схемы основных составляющих суммарных течений Амурского и Уссурийского заливов, приведенные в атласе, показывают, что наибольший вклад вносят ветровые течения, которые в зимний сезон усиливают антициклонический круговорот в Уссурийском заливе, а летом изменяют круговорот на циклонический. При прохождении циклонов скорости суммарных течений на поверхности могут достигать 50 см/с.

Температура воды на поверхности испытывают существенную сезонную изменчивость, обусловленную, главным образом, взаимодействием поверхностного слоя с атмосферой. Весной температура воды в поверхностном слое на акватории залива изменяется в пределах 4 – 14°. В вершинах Амурского и Уссурийского заливов она достигает соответственно 13 – 14° и 12°. В целом Амурский залив характеризуется более высокими температурами, чем Уссурийский. Летом воды залива хорошо прогреваются. В это время в вершинах Амурского и Уссурийского заливов она достигает 24 – 26°, а в открытой части залива – 17°. Осенью происходит понижение температуры до 10 – 14° во вторичных заливах и до 8 – 9° в открытой части. Зимой вся масса вод охлаждается, температура ее колеблется от 0 до – 1,9°. Отрицательные температуры имеют место по всему мелководью, а также во вторичных заливах. Положение изотермы 0° примерно совпадает с 50-метровой изобатой. В это время воды открытой части залива теплее прибрежных вод и характеризуются положительными значениями температуры. С увеличением глубины диапазон изменения температуры уменьшается и уже на глубине 50 м не превышает 3°, а на глубинах более 70 метров сезонные изменения почти не проявляются.

Зимой ряд заливов и бухт покрывается льдом. Но некоторые заливы, например, Уссурийский и Восток, замерзают лишь в вершинной части, тогда

как другие, такие как Амурский и б. Троицы, покрываются льдом почти полностью.

Орографические условия залива и влияние материкового стока создают своеобразный режим распределения и изменчивости солености. Вода в некоторых прибрежных районах залива распресняется до солоноватой, а в открытых районах она, близка к солености прилегающей части моря. Годовой ход солености характеризуется минимумом летом и максимумом зимой. Весной на поверхности минимальные значения солености приурочены к вершине Амурского залива, где они составляют 28‰. В вершине Уссурийского залива соленость равна 32,5‰, а на остальной акватории повышается до 33 – 34‰. Летом поверхностный слой подвергается наибольшему распреснению. В вершине Амурского залива соленость составляет 20‰, а в целом в прибрежных водах и вторичных заливах она не превышает 32,5‰ и увеличивается в открытых районах до 33,5‰. Осенью горизонтальное распределение солености подобно весеннему типу. Зимой на всей акватории залива соленость близка к 34‰. На глубинах более 50 метров соленость изменяется в пределах акватории залива в интервале 33,5 – 34,0‰.» (Ростов и др., 2005).

1.3. Краткий обзор генетико-биохимических или аллозимных методов и молекулярно филогенетических подходов, используемых в работе

1.3.1. Генетико-биохимические методы, используемые в работе

Как уже было отмечено в разделе 1.1.1, генетико-биохимические методы и отдельный анализ аллозимной (аллельной) изменчивости ферментных генов позволяют различать *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* по ряду локусов, включающих частично диагностические аллели. Ввиду этого значительная часть диссертационной работы посвящена изучению двух упомянутых выше видов мидий именно на основе этой методики.

Альтернативные формы фермента, кодируемые различными аллелями одного и того же гена, называются аллозимами (Корочкин и др., 1977) которые, даже несмотря на интенсивное внедрение в популяционную генетику методов молекулярной биологии, продолжают оставаться распространенными генетическими маркерами, используемыми в популяционной генетике и таксономии.

История аллозимных исследований началась более пятидесяти лет назад, в 1966 году, с работ Левонтина, Харриса и других (Lewontin, Hubby, 1966; Harris, 1966), которые использовали метод электрофореза для разделения различных вариантов белков в геле и генотипирования особей на этой основе. Впоследствии, аллозимная изменчивость была выявлена для всех изученных групп организмов, а метод стал широко распространенным и популярным в популяционно-генетических исследованиях и исследованиях, связанных с задачами систематики. (Алтухов, 2003)

Основной причиной такой популярности метода является его дешевизна и простота использования. Помимо этого, аллозимный анализ отличается своей производительностью, благодаря которой не сложно

получить необходимые сведения о генотипическом составе популяций различных видов живых организмов. Каждый организм, при этом, может быть охарактеризован сразу по нескольким локусам.

Метод основывается на разделении белков в полиакриламидном, крахмальном или агарозном геле под действием электрического поля. Разделение происходит за счет отличий в заряде и в массах молекул, которые, в зависимости от заряда (обычно заряд зависит от pH среды) молекулы двигаются к аноду или катоду. Оценка размеров молекул происходит на основе маркеров молекулярных масс (Картавец, 2009)

Для распознавания тихоокеанской и средиземноморской мидий, а также их гибридов, на протяжении всего времени исследований, применяли электрофоретическое разделение в геле нескольких разных белков – ферментов. Используемые в работе ферменты подробнее представлены в главе 4. Различия частот аллелей между популяциями по каждому из них составляют 57 – 87%. В комплексе аллозимные локусы позволяют достаточно надежно дискриминировать особей комплекса *Mytilus ex. group edulis* (Gosling, 1992).

1.3.2. Молекулярно-филогенетические методы, используемые в работе

Молекулярная филогенетика, это один из методов установления родственных связей различных живых организмов путем изучения структуры ДНК, РНК или белков (Лукашов, 2009). Сегодня, без использования молекулярных методов уже практически невозможно представить ни одно филогенетическое таксономическое исследование. Они отлично зарекомендовали себя в исследованиях по систематике, поскольку позволяют решать спорные вопросы, вызванные сложностями в традиционном подходе по морфологическим и анатомическим признакам в связи с их частой

зависимостью от условий обитания. На основании молекулярных данных до сих пор пересматривается старая систематика животных и растений, и с каждым годом число подобных исследований только растет (Лукашов, 2009).

Результатом молекулярно-филогенетического анализа является построение филогенетического дерева. В настоящей работе для построения деревьев использовали следующие подходы: максимального правдоподобия (ML), Байесовского (BA), максимальной парсимонии (MP) и ближайшего соседства (NJ).

Одним из старейших методов, разработанным в 60-х годах второй половины двадцатого века, является метод максимальной парсимонии (экономии) (Eck, Dayhoff, 1966). В основе метода лежит принцип экономичности. Метод подбирает наиболее вероятный эволюционный сценарий (филогенетическое дерево) содержащий минимальное число эволюционных изменений и используется для поиска дерева, которое наилучшим образом отражало бы анализируемые данные (Nei, Kumar, 2000). Длина ветвей при использовании данного метода, как правило, не вычисляется, поскольку изначально он создавался исключительно для выяснения топологии (Картавцев, 2009).

Несмотря на то, что этот метод, на данный момент, является одним из самых популярных в молекулярной филогенетике, он имеет свои отрицательные стороны и при ряде условий способен привести к ошибочным результатам (Felsenstein, 1978b).

Следующим, использованным в этой работе методом, является метод максимального правдоподобия, который впервые был использован Кавали-Сфорца и Эдвардсом в 60х годах прошлого века (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967). Впоследствии, метод набрал популярность и стал использоваться всеми. Метод основан на том, что при наличии определенных данных об

изучаемых организмах можно рассчитать вероятность различных эволюционных моделей и выбрать на этой основе наиболее правдоподобную топологию (Nei, Kumar, 2000; Felsenstein, 2004). Присваивая различные значения параметрам модели (топология дерева, длина ветвей и другие) возможно сделать предположение об их правдоподобии.

Байесовский метод построения филогенетического дерева также основан на знании модели эволюции и позволяет, при заданных исходных данных исходных организмов, получить наиболее вероятное филогенетическое дерево. С помощью теоремы Байеса по известному факту события можно вычислить вероятность того, что оно было вызвано определённой причиной (Felsenstein, 2004). Расчет апостериорной вероятности реализуется специфическими алгоритмами, относящимися к категории «machine learning», изучения вероятности эволюционного сценария при помощи компьютера. Для облегчения вычислительной сложности алгоритмов, используется метод Монте-Карло для цепей Маркова (MCMC) (Ronquist et al., 2009). Плюсами баесовского подхода, выделяющими его на фоне других, являются высокая скорость и эффективность вычислений, способность работы со сложными моделями эволюции и возможность интеграции с методами MCMC.

Еще одним методом, использованным в данной работе, является метод ближайшего соседства, который базируется на способе расчета единственно верного дерева на основе матрицы генетических расстояний (Saitou, Nei, 1987). Этот метод строит наикратчайшее дерево с длинами ветвей, значения которых согласуются с матрицей попарных расстояний (Felsenstein, 2004). Метод ближайшего соседства, аналогично с методом парсимонии, является методом минимальных длин ветвей или эволюционных изменений, но он не гарантирует построения дерева с наименьшим общим расстоянием и не указывает на вероятные последовательности замен в филогенетических линиях

(Картавец, 2009). Есть мнения, что лучший вариант использования этого метода, заключается в базировании на NJ деревьях остальных методов, основанных на предопределенных моделях нуклеотидных замен (Hillis et al., 1996; Swofford et al., 1996). Но несмотря на это, более поздние работы показывают, что он сам способен давать хорошую реконструкцию филогенетических связей (Kartavtsev et al., 2007b).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Филогенетический анализ

Материал исследования составили особи, отловленные в 2011 – 2016 гг. в нескольких локальностях Приморского края, в Черном и Белом морях РФ, а также особи из сборов в других точках Мирового океана (Таблица 2.1).

Таблица 2.1. Материал молекулярно-филогенетического исследования митилид (*Bivalvia*, *Mytilidae*)

Лаборатор- ный номер/ Номер в ген. банке	Таксон, источник ДНК	Место сбора (отлова)	Год
1	<i>Musculus senhousei</i>	Префектура Томиока, Япония	2009
2	<i>Musculus senhousei</i>	То же	2009
3	<i>Musculus senhousei</i>	То же	2009
4	<i>Musculus senhousei</i>	То же	2009
5	<i>Musculus senhousei</i>	То же	2009
6	<i>Modiolus modiolus</i>	Белое море	2014
7	<i>Modiolus modiolus</i>	Белое море	2014
8	<i>Modiolus modiolus</i>	Белое море	2014
9	<i>Modiolus modiolus</i>	Белое море	2014
10	<i>Modiolus modiolus</i>	Белое море	2014
11	<i>Septifer virgatus</i>	Южная Корея	Сент. 2013
12	<i>Septifer virgatus</i>	То же	Сент. 2013
13	<i>Septifer virgatus</i>	То же	Сент. 2013

Продолжение таблицы 2.1

14	<i>Septifer virgatus</i>	То же	Сент. 2013
15	<i>Septifer virgatus</i>	То же	Сент. 2013
16	<i>Septifer bilocularis</i>	г. Ширикава, Япония	1999
17	<i>Septifer bilocularis</i>	То же	1999
18	<i>Septifer bilocularis</i>	То же	1999
19	<i>Septifer bilocularis</i>	То же	1999
20	<i>Septifer bilocularis</i>	То же	1999
21	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	-	1999
22	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	-	1999
23	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Японское море, Приморский край	1999
24	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	То же	1999
25	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	То же	1999
26	<i>Perna viridis</i>	Филиппины	-
27	<i>Perna viridis</i>	То же	-
28	<i>Perna viridis</i>	То же	-
29	<i>Perna viridis</i>	То же	-
30	<i>Perna viridis</i>	То же	-
31	<i>Limnoperla fortunei</i>	Brasil, Sao paulo	2012
32	<i>Limnoperla fortunei</i>	Brasil, Sao paulo	2012
33	<i>Limnoperla fortunei</i>	Brasil, Sao paulo	2012
34	<i>Limnoperla fortunei</i>	Brasil, Sao paulo	2012

Продолжение таблицы 2.1

35	<i>Limnoperna fortunei</i>	Brasil, Sao paulo	2012
36	<i>Lithophaga curta</i>	Chiba	
37	<i>Mytilus trossulus</i>	Японское море, зал. П. Великого, Мыс Шефнера	2014
38	<i>Mytilus trossulus</i>	То же	2014
39	<i>Mytilus trossulus</i>	То же	2014
40	<i>Mytilus trossulus</i>	То же	2014
41	<i>Mytilus trossulus</i>	То же	2014
42	Не определен	Сахалин, озеро Изменчивое	2014
43	Неопределен	Желтое море	20.11.2009
44	<i>Modiolus elongatus</i>	Желтое море	21.11.2009
45	<i>Amygdalum watsonii</i>	Восточно-Китайское море	2009
46	<i>Amygdalum watsonii</i>	Восточно-Китайское море	2009
47	<i>Mytilus coruscus</i>	Университет Тохоку, Япония, побережье	2002
48	<i>Mytilus coruscus</i>	То же	2002
49	<i>Mytilus coruscus</i>	То же	2002
50	Не определен	То же	2002
51	<i>Septifer virgatus</i>	Префектура Мие, Япония, побережье	19.07.2010
52	<i>Septifer virgatus</i>	То же	19.07.2010
53	Не определен	Префектура Вакаяма, Япония, побережье	20,07

Продолжение таблицы 2.1

54	<i>Mytilus edulis</i>	Белое море	2014
55	<i>Mytilus edulis</i>	Белое море	2014
56	<i>Mytilus edulis</i>	Белое море	2014
57	<i>Mytilus edulis</i>	Белое море	2014
58	<i>Mytilus edulis</i>	Белое море	2014
59	<i>Mytilus edulis</i>	Белое море	2014
60	<i>Septifer keenae</i>	Японское море, зал. П. Великого, зал. Восток	2014
61	<i>Septifer keenae</i>	Японское море, зал. П. Великого, зал. Восток	2014
62	<i>Septifer keenae</i>	Японское море, зал. П. Великого, зал. Восток	2014
63	<i>Septifer keenae</i>	Японское море, зал. П. Великого, зал. Восток	2014
64	<i>Septifer keenae</i>	Японское море, зал. П. Великого, зал. Восток	2012
65	<i>Septifer keenae</i>	Японское море, зал. П. Великого, зал. Восток	2012
66	<i>Septifer keenae</i>	Японское море, зал. П. Великого, зал. Восток	2012
67	<i>Septifer keenae</i>	Японское море, зал. П. Великого, зал. Восток	2012
68	<i>Septifer keenae</i>	Японское море, зал. П. Великого, зал. Восток	2012
69	<i>Musculus laevigatus</i>	Камчатка, о. Старичков	02.08.2015

Продолжение таблицы 2.1

70	<i>Musculus laevigatus</i>	Камчатка, о. Старичков	02.08.2015
71	<i>Musculus laevigatus</i>	Камчатка, о. Старичков	02.08.2015
72	<i>Xenostrobus</i> sp.	Токио, Япония, побережье	-
73	<i>Xenostrobus</i> sp.	То же	-
74	<i>Xenostrobus</i> sp.	То же	-
75	<i>Xenostrobus</i> sp.	То же	-
76	<i>Mytilus chilensis</i>	Филе мидии мороженное, магазин «Рыбный остров», Владивосток, РФ	2016
77	<i>Mytilus chilensis</i>	То же	2016
78	<i>Mytilus chilensis</i> ?	То же	2016
79	<i>Mytilus chilensis</i>	То же	2016
80	<i>Mytilus chilensis</i>	То же	2016
1.1	<i>Mytilus coruscus</i> 1 (?), мускул- замыкатель	Зал. Восток	Июль 2016
1.2	<i>Mytilus coruscus</i> 2 (?), мантия	Зал. Восток	Июль 2016
1.3	<i>Modiolus modiolus</i> , замыкатель	Зал. Восток	Июль 2016
1.4	<i>Modiolus modiolus</i> , мантия	Зал. Восток	Июль 2016
1.5	<i>Mytilus trossulus</i> , замыкатель	Зал. Восток	Июль 2016
1.6	<i>Mytilus trossulus</i> , мантия	Зал. Восток	Июль 2016
1.7	<i>Mytilus trossulus</i> , нога	Зал. Восток	Июль 2016
1.8	<i>Septifer keenae</i> , замыкатель	Зал. Восток	Июль 2016
1.9	<i>Septifer keenae</i> , мантия	Зал. Восток	Июль 2016

Продолжение таблицы 2.1

1.10	<i>Musculus koreanus</i> , мантия	Зал. Ольги	Июль 2016
1.11	<i>Musculus koreanus</i> , жабры	Зал. Ольги	Июль 2016
1.12	<i>Crenomytilus grayanus</i> , мантия	Зал. Восток	Июль 2016
AB105357	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Япония	-
AB103129	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Япония, Хонсю.	-
Z29550	<i>Mytilus edulis</i>	-	-
KC429424	<i>Mytilus edulis</i>	-	-
KJ598046	<i>Perumytilus purpuratus</i>	Чили	Апрель 2010
KJ453824	<i>Perumytilus purpuratus</i>	Аргентина	Июль 2011
KJ598044	<i>Perumytilus purpuratus</i>	Чили	Апрель 2010
AB103126	<i>Septifer virgatus</i>	Япония, Хонсю.	-
KJ453832	<i>Septifer virgatus</i>	Китай, Гонконг	Июнь 2012
AY825098	<i>Septifer virgatus</i>	-	-
KJ453833	<i>Septifer virgatus</i>	Япония	Июль 2012
KJ453830	<i>Septifer bifurcatus</i>	-	Июнь 2012
KJ453831	<i>Septifer bifurcatus</i>	-	Июнь 2012
KT192114	<i>Mytilaster solisianus</i>	Бразилия	Апрель 2011
KT192113	<i>Mytilaster solisianus</i>	Бразилия	Апрель 2012
KF611698	<i>Benthomodiulus sp.</i>	Юг Атлантического океана	2009
KF611699	<i>Benthomodiulus sp.</i>	Север Тихого океана	-
HF545022	<i>Benthomodiulus sp.</i>	Тихий океан	-
HF545023	<i>Benthomodiulus geikotsucola</i>	Япония	-

Продолжение таблицы 2.1

HF545039	<i>Bathymodiolus japonicus</i>	Япония	-
HF545045	<i>Bathymodiolus sp.</i>	Папуа Новая Гвинея	-
AY825100	<i>Brachidontes adamsianus</i>	-	-
AJ307536	<i>Brachidontes variabilis</i>	Египет, Красное море	-
KT192128	<i>Brachidontes darwinianus</i>	Бразилия	Апрель 2012
KC429331	<i>Mytilus edulis</i>	-	-
AY527062	<i>Mytilus edulis</i>	Германия	2001
L33448	<i>Mytilus edulis</i>	Австралия	-
L24489	<i>Mytilus edulis</i>	-	-
DQ640516	<i>Mytilus trossulus</i>	Канада	-
L33453	<i>Mytilus trossulus</i>	США, шт. Вашингтон	-
L33454	<i>Mytilus trossulus</i>	Канада	-
L33455	<i>Mytilus trossulus</i>	Канада, Ванкувер	-
L24490	<i>Mytilus trossulus</i>	-	-
JQ611492	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Хорватия	Сент. 2009
DQ640507	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Южная Африка	-
DQ640506	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Южная Корея	-
L33451	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	-	-
L33452	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	-	-
DQ640508	<i>Mytilus chilensis</i>	Чили	-
EF613242	<i>Mytilus coruscus</i>	-	-
DQ640513	<i>Mytilus californianus</i>	США, Калифорния	-

Продолжение таблицы 2.1

L33449	<i>Mytilus californianus</i>	США, шт. Вашингтон	-
AJ389645	<i>Septifer bilocularis</i>	Египет, Красное море	-
AF229622	<i>Septifer bilocularis</i>	Филлипины	-
KJ453814	<i>Septifer bifurcatus</i>	США	Июнь 2012
KJ453817	<i>Septifer virgatus</i>	Япония	Июль 2012
DQ640533	<i>Perumytilus purpuratus</i>	Чили	-
KT192092	<i>Mytilaster solisianus</i>	Бразилия	-
KT192093	<i>Mytilaster solisianus</i>	Бразилия	-
KF611718	<i>Bathymodiolus manusensis</i>	-	-
AY649823	<i>Bathymodiolus thermophilus</i>	-	-
AY649822	<i>Bathymodiolus azoricus</i>	-	-
AY649818	<i>Bathymodiolus marisindicus</i>	-	-
AY649820	<i>Bathymodiolus sp.</i>	-	-
AY649819	<i>Bathymodiolus sp.</i>	-	-
AF221641	<i>Bathymodiolus childressi</i>	-	-
KF611702	<i>Benthomodiolus sp.</i>	Северо-восток Тихого океана	-
KF611703	<i>Benthomodiolus sp.</i>	Юг Атлантического океана	2009
AB679345	<i>Benthomodiolus geikotsucola</i>	Япония, Токио	Июль 2005
KJ453819	<i>Brachidontes purpuratus</i>	Аргентина	Июль 2010
KJ453820	<i>Brachidontes purpuratus</i>	Чили	Апрель 2010
AF117736	<i>Hormomya domingensis</i>	-	-
AB201233	<i>Hormomya domingensis</i>	Япония, Окинава	-

Примечание. Прочерк – нет данных. Сент. – сентябрь.

Для выделения ДНК использовали фрагменты мышечной ткани ноги или других тканей. Фиксация материала проводилась в 95% этиловом спирте. При выделении геномной ДНК использовался метод HotSHOT (Truett, 2006). В данной работе для анализа использовались три маркера ядерной ДНК: 28S рРНК, 18S рРНК и гистона *H3*. Фрагменты генов 18S рРНК и *H3* были получены посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием универсальных праймеров. Для 18S рРНК: 1F (TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG), 5R (CTTGGCAAATGCTTTTCGC) (Colgan et al., 1998) для *H3*: *H3af* (ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC), *H3ar* (ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC) (Colgan et al., 1998). Для амплификации фрагмента гена 28S рРНК были использованы пары праймеров C1 /C2r и C2/LSU-rev1 (Bellocq et al., 2001; Sonnenberg et al., 2007), где C2r является обратно-комплиментарной последовательностью C2.

Реакционная смесь ПЦР для генов 18S и *H3* (25 мкл) включала: дистиллированная вода – 17,4 мкл; 10× буфер (Evrogen) – 2,5 мкл; смесь dNTP (концентрация каждого трифосфата – 2,5 мМ, Evrogen) – 2,0 мкл; праймеры (5 пикомоль/мкл) – по 1 мкл каждого; Taq-полимераза (5 единиц/мкл, Evrogen) – 0,1 мкл; ДНК – 1 мкл. ПЦР для этих двух генов проводилась при следующих условиях: предварительная денатурация 94°C – 3 мин.; далее для 30 циклов: 94°C денатурация – 45 сек., отжиг 49 °C – 90 сек., 72°C синтез – 120 сек.; заключительный цикл 72°C – 5 мин. ПЦР для гена 28S рРНК проводилась в 20 мкл реакционной смеси, состоящей из 50 мкМ KCl, 10 мкМ Tris, 2 мкМ MgCl₂, 0.2 мкМ дНТФ, 0.2 мкМ каждого из праймеров, 1 ед. Taq-полимеразы и 1 мкл матрицы ДНК. Условия реакции были следующими: 3 мин. первичная денатурация при 95°C; 30 циклов 94°C / 30 секунд, (денатурация), 50°C / 30 секунд (отжиг), 1 мин / 68 – 72°C (элонгация), и финальная элонгация 72°C / 7 мин. 3 мкл продукта были помещены в планшет для ПЦР GeneAmp 96-well PCR reaction plate (Applied Biosystems, №4306737) и очищены путем преципитации этанолом.

Секвенирование проводили с использованием тех же праймеров, что и для ПЦР, и набора реактивов «Bright Dye Terminator» V. 3.1 (Nimagen) согласно методике производителя. Условия ПЦР включали: предварительная денатурация при 96°C – 1 мин.; далее для 25 циклов амплификации: денатурация при 96°C – 10 сек., отжиг праймеров на матрице 49 °C – 10 сек. и элонгацию при 60°C – 4 мин. Определение нуклеотидной последовательности осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI-3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABI, США) на базе ННЦМБ ДВО РАН. Последовательности выверяли и редактировали вручную при помощи программного обеспечения BioEdit (Hall, 1999) или ChromasPro 1.34 (<http://www.techneleysium.com.au/ChromasPro.html>).

Последовательности ДНК были выравнены с помощью программы Clustal-W, интегрированной в пакет MEGA-6 (Tamura, 2013). На основе выравненного набора последовательностей строили филогенетические деревья. Для этого использовали следующие подходы: максимального правдоподобия (ML), Байесовского (BA), максимальной парсимонии (MP) и ближайшего соседства (NJ) (Hall, 2001). ML-, BA- и NJ-деревья строили, используя TrN93+G или K2P+G модели нуклеотидных замещений. Для массива нуклеотидов каждого гена оптимальную модель замен подбирали с помощью программного пакета (ПП) MEGA-6. В этом же ПП выполнен расчет генетических расстояний и реконструкция генных деревьев ML, MP, NJ. BA-деревья реконструированы с использованием ПП MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012).

Полученные деревья были топологически схожи друг с другом, поэтому, для удобства были объединены в одно дерево. За основу использовали BA-филограмму с моделированием 10^6 генераций и вычислением постериорных вероятностей (%) для оценки надежности (повторяемости) узлов дерева. Совпадение остальных трех реконструкций ML, MP, NJ для краткости продемонстрировано поддержками реплик

бутстрепа с $n = 1000$ повторностей. Поддержки с повторяемостью менее 50% не считаются надежными и в соответствующих узлах отмечены прочерками. В качестве внешней группы выбрали представителей семейства *Septiferidae*.

Для построения объединенного дерева использовались последовательности 28s рРНК и *H3*, последовательности гена 18s рРНК не использовались по причине его консервативности.

Исследование гибридной зоны двух видов мидий

Материал для изучения гибридной зоны был собран в 2011, 2012, 2013 гг. Общее число особей, отловленных в зал. Петра Великого и близлежащих бухтах Киевка и Преображение, составило 908 (327 за 2011 г. и 581 за 2012-2013 гг.) (Рисунок 2.1).

Исследование морфологических признаков основывалось на:

- 1) корректном описании индивида по набору признаков, которые должны представлять различные морфофункциональные системы организма;
- 2) представительной характеристике отдельных групп, которые нужно исследовать;
- 3) правильном осуществлении выборочной процедуры в пространственно-временном измерении, чтобы получить количественно определяемую матрицу данных;
- 4) адекватном статистическом анализе.

Морфометрическое исследование основано на широко используемых многомерных подходах (Sokal, Sneath, 1963; Afifi, Azen, 1979; Андреев, 1980). Особи проанализированы по 11 основным мерным признакам (Таблица 2.2) и 10 индексам. Индексы получали нормированием (делением) значений 10 признаков на длину раковины. Затем индексы преобразовывали по формуле (Рокицкий, 1973; Лакин, 1980): $2\arcsin\sqrt{p}$, 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.

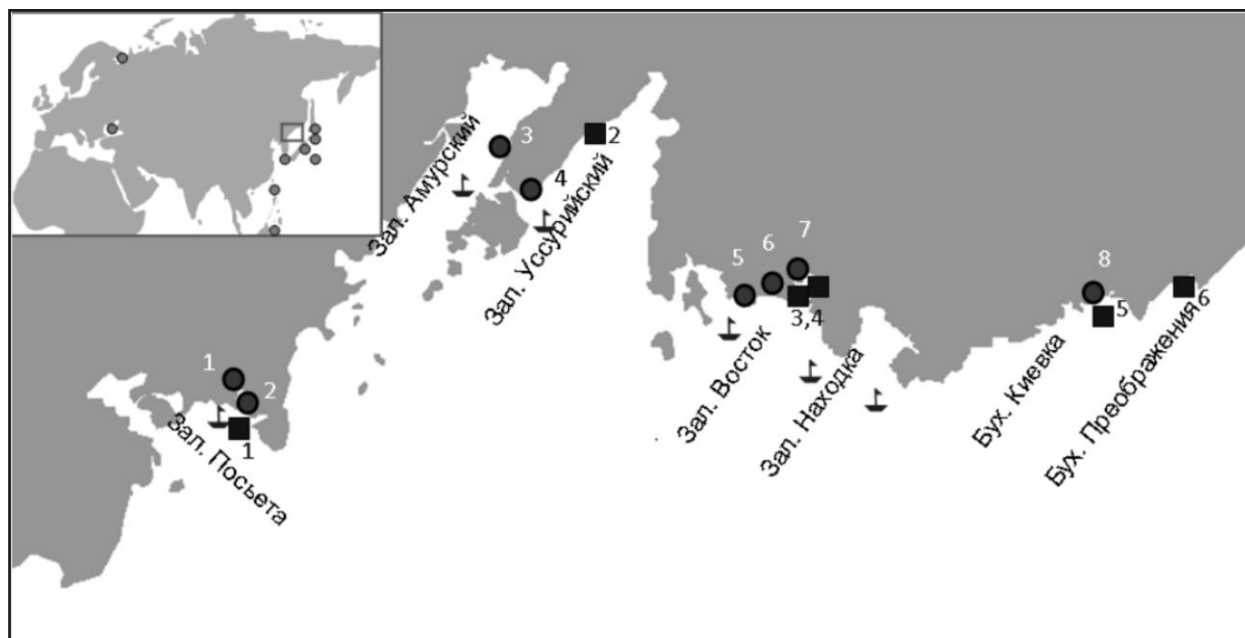


Рисунок 2.1. Карта сбора материала. 2011: 1) Зал. Посъета, рядом с Зарубино; 2) Зал. Посъета, б. Витязь; 3) Амурский зал.; 4) Уссурийский зал., б. Соболев; 5) зал. Восток, Ливадия; 6) зал. Восток, б. Подсобная; 7) Зал. Восток, МБС Восток; 8) Б. Киевка. 2012 – 2013: 1) Зал. Восток, НБС Восток; 2) Зал. Восток, Ливадия; 3) Зал. Посъета, Зарубино; 4) Б. Киевка; 5) Уссурийский зал., б. Лазурная; 6) б. Преображение.

Таблица 2.2. Морфометрические признаки особей мидий (*Mytilus*),
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

Анализ аллозимных локусов

Анализ изменчивости частот генотипов и аллелей проведен по 6–8 аллозимным локусам. Исследованы следующие маркеры ферментных (аллозимных) локусов: фосфоглюкомутаза (ФГМ, *PGM-1**, КФ 5.4.2.2), глюкозофосфатизомераза (ГФИ, *GPI**, КФ 5.3.1.9), аспаратаминотрансфераза (ААТ, *AAT-1** и *AAT-2**, КФ 2.6.1.1), октопиндегидрогеназа (ОНДГ, *ODH**, КФ 1.5.1.11), маннозофосфатизомераза (МФИ, *MPI**, КФ 5.3.1.8), аланинаминопептидаза (ААП, *AAP**, КФ 3.4.11.2.) и лейцинаминопептидаза (ЛАП, *LAP**, КФ 3.4.11.1). Указанные локусы являются полудиагностическими для дискриминации видов *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* (МакДональд и др., 1990; Gosling, 1992).

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 (pH 7,4) и трис-цитратную (pH 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 гистохимическое окрашивание ферментных фракций в геле проводилось по описанным в литературе методикам (Nei, 1978; Heath et al., 1995) с небольшими модификациями.

Для оценки видовой принадлежности отдельных особей по мультилокусным генотипам применяли программу Structure, использующую описанные ранее алгоритмы (Pritchard et al., 2000). При расчетах использовали следующие параметры модели: admixture, correlated allele frequencies, k: 1 – 5, burnin: 30000, MCMC: 50000–500000; 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 (Стрелков и др., 2008). 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 гибридный 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).

Анализ индивидуальных индексов позволяет проводить классификацию особей на группы родительских видов и гибридов (Стрелков и др., 2008; Roberts et al., 2010). Как показано в литературе, границы значений индексов для разделения самих видов и гибридов могут быть выбраны субъективно в пределах 0,08–0,95 (Roberts et al., 2010, Śmietanka et al., 2014). В данной работе особь относили к *M. trossulus*, если ее индекс по Structure попадал в диапазон значений 0,6–1,0, то есть 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 рассчитывали частоты родительских и гибридных генотипов в исследованных выборках.

Анализ ДНК-маркеров

Изучены два маркера ядерной ДНК (яДНК): *Me-5* или *GLU-5* (ген прикрепительного белка нитей биссуса) и *ITS-1,2* (внутренний транскрибируемый спейсер рРНК). Маркеры яДНК, *Me-5* и *ITS-1,2*, являются диагностическими для дискриминации этих видов. На основании генотипирования особей по GBL-локусам и яДНК маркерам оценены доли

встречаемости аборигенного вида, гибридов и интродуцентов (*M. galloprovincialis*) в выборках из исследованных районов.

Для анализа яДНК-маркеров использовали следующие методики. Тотальную ДНК выделяли из жаберных пластинок, зафиксированных в 95% этиловом спирте по стандартной методике (Маниатис и др., 1984) с небольшими модификациями, состоящими в удалении фенола из протокола и добавлении рибонуклеазы или методом HotSHOT (Alasaad et al., 2008). Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей дистиллированную воду – 2,3 мкл; 10× буфер (Evrogen) – 1 мкл; смесь dNTP (концентрация каждого трифосфата – 2,5 мМ, Evrogen) – 1,0 мкл; 25 mM MgCl₂ – 0,6 мкл; праймеры (5 пикомоль/мкл) – по 1 мкл; Taq-полимераза (5 единиц/мкл, Evrogen) – 0,1 мкл; ДНК – 1 мкл. ПЦР проводилась при следующих условиях: предварительная денатурация 94°C – 1 мин.; далее для 30 циклов: 92°C денатурация – 30 сек., 53°C отжиг – 60 сек., 75°C синтез – 1 мин.; заключительный цикл реакции 75°C – 5 мин. В качестве специфических праймеров использовали праймеры для гена *Me-5* прикрепительного белка (прикрепительный полифенольный белок, образующий клеящие нити биссуса у мидий): *Me15* 5'-CCAGTATACAAACCTGTGAAAA-3' и *Me16* 5'-TGTTGTCTTAATAGGTTTGTAAGA-3' (Inoue et al., 1995). Для идентификации *ITS* ядерной рРНК использовали условия амплификации и последовательности праймеров, представленные в статье (Скурихина и др., 2001). Методические условия позволяют амплифицировать фрагмент ДНК, включающий оба внутренних транскрибируемых спейсера – *ITS*, *ITS-1* и *ITS-2* (для краткости – *ITS-1,2*). Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2% агарозном геле. Таким образом, идентификацию особей и классификацию генотипов по диагностическим ДНК-маркерам проводили электрофоретически.

Классификация генотипов по ДНК-маркерам, имеющим только два аллеля, каждый из которых типичен для одного из родительских видов (условно, аллель 1 и аллель 2), проводилась следующим образом: генотип 1-1

– *M. trossulus*, 1-2 – гибриды и 2-2 – *M. galloprovincialis*. На основании полученных данных были рассчитаны доли встречаемости аборигенного вида, гибридов и интродуцентов.

Данные, полученные по разным типам маркеров, были сопоставлены. Для сопоставления оценивали стандартные ошибки средних значений и, соответственно, отклонения в пределах доверительных интервалов. С использованием пакета программ Statistica 6 (StatSoft, 2001) выполнены также дискриминантный и дисперсионный анализы. Анализ изменчивости частот аллелей, генетических расстояний и F-статистик выполнен в ПП Specstat (Картавцев, Соловьев, 1992; Kartavtsev, Soloviev, 1993).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3.1. Молекулярно-филогенетическое исследование семейства *Mytilidae*

Для сопоставления представителей видов семейства были определены неполные первичные последовательности трех генов яДНК: 28S рРНК, 18S рРНК и гистона *H3*. Последовательности 28S рРНК составили 398 пар нуклеотидов (пн) для представленного набора 77 образцов, после удаления начальных и конечных фрагментов в зоне прикрепления праймеров («хвостов»), выравнивания и вырезания обнаруженных инделов (Рисунок 3.1). После аналогичных процедур адаптации 48 последовательностей 18S рРНК составили 766 пн (Рисунок 3.2), 43 последовательностей *H3* яДНК составили 338 пн.

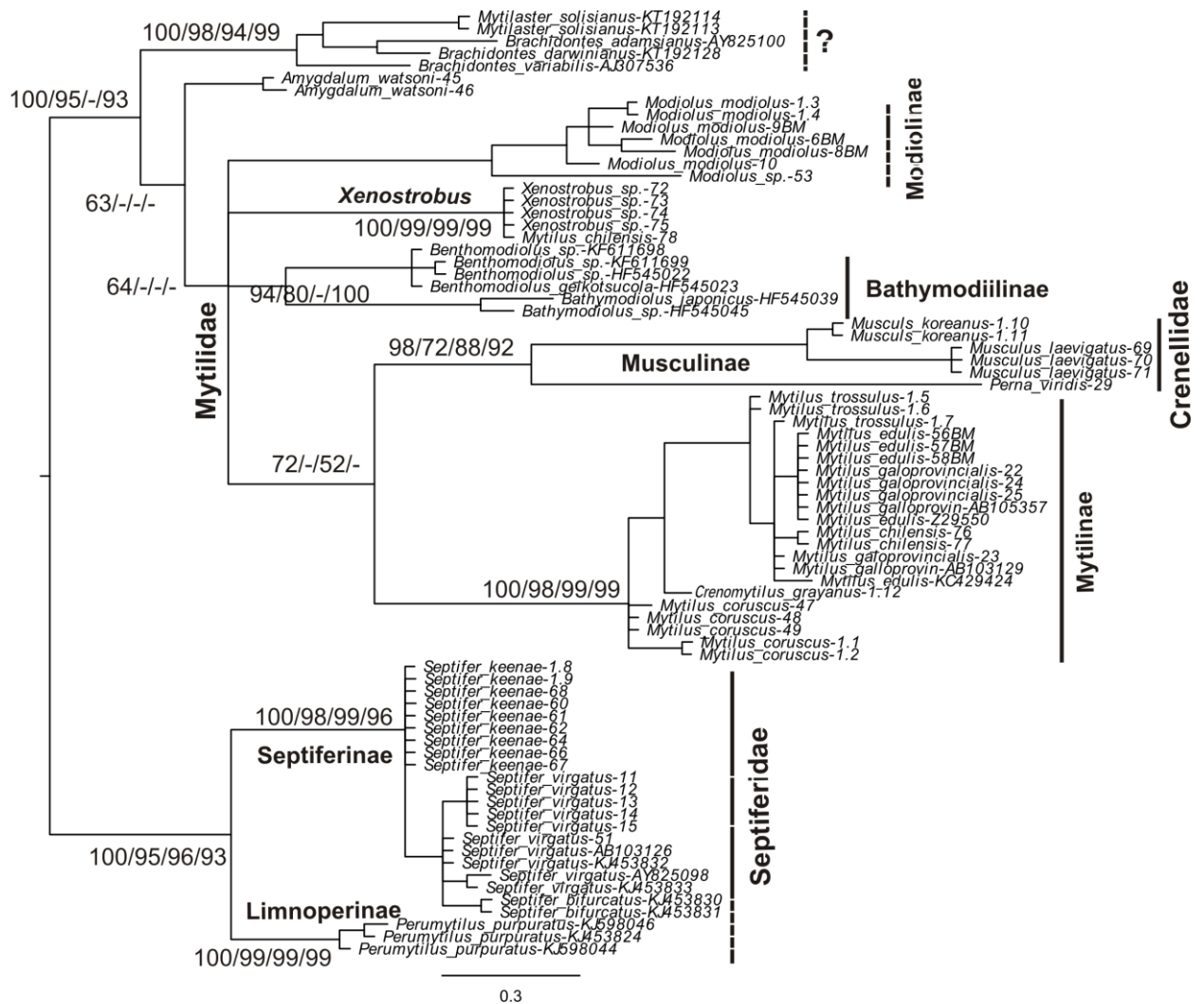


Рисунок 3.1. Укорененное консенсусное Байесовское (БА) дерево, показывающее филогенетические взаимосвязи на основе 77 последовательностей нуклеотидов гена 28S рРНК мидий (Mollusca, Mytilidae).

В узлах дерева показаны поддержки (%) для четырех методов реконструкции. Последовательность поддержек: ВА/ML/MP/NJ. Расшифровка сокращений дана в разделе Материалы и методы. Прочерк означает уровень поддержки менее 50% для узла в соответствующем методе. Деревья здесь и далее укоренены с использованием в качестве внешнего таксона представителей семейства Septiferidae. Линия внизу – показывает масштаб длины ветвей представленной филограммы.

Генное дерево 28S рРНК обнаруживает три основных ветви (узла) с уровнями иерархии в виде семейств: Mytilidae, Septiferidae, Crenellidae и шесть ветвей уровня подсемейств: 1) Mytilinae, 2) Bathymodiolinae, 3) Modiolinae, 4) Musculinae, 5) Septiferinae, 6) Limnoperninae (1-4 – таксоны Mytilidae, 5 и 6 – Septiferidae) с входящими в них родами и видами (Рисунок 3.1). Род *Xenostrobus* представлен неразрешенным узлом и поэтому судить о его принадлежности невозможно. На дереве наблюдается отчетливая кластеризация отдельных видов внутри исследованных родов, кроме рода *Mytilus*, в котором 2 вида группы *Mytilus* ex. group *edulis*, *M. edulis* и *M. galloprovincialis*, не дифференцируются, а *M. trossulus* занимает по отношению к ним внешнюю позицию (Рисунок 3.1). Дополнительно стоит отметить виды *C. grayanus* и *M. coruscus*, которые образуют внешнюю группу к остальным видам рода *Mytilus*. Базальное положение на дереве занимают представители семейства Septiferidae, использованные как указано выше в качестве внешней группы. Далее для остальных реконструкций эта особенность топологии повторяться не будет. Наиболее отчетливо в генном дереве 28S рРНК поддержана монофилия семейства Septiferidae (93 – 100% поддержки), тогда как по этим данным ветвь Musculinae-Crenellidae занимает внутреннюю позицию в пределах Mytilidae, которое выявляется только в BA-реконструкции и слабо поддержано (64%). Из подсемейств, представленных несколькими видами, наиболее надежно поддержаны топологически два – Mytilinae и Septiferinae: 99 – 100% и 96 – 100% поддержки, соответственно. На дереве есть несколько неразрешенных и слабо поддержанных топологически узлов (Рисунок 3.1). В частности, на генном дереве 28S рРНК не полностью разрешенной является топология Mytilidae и Mytilinae. Некоторые ветви не имеют таксономического обозначения (Рисунок 3.1, показано вопросом).

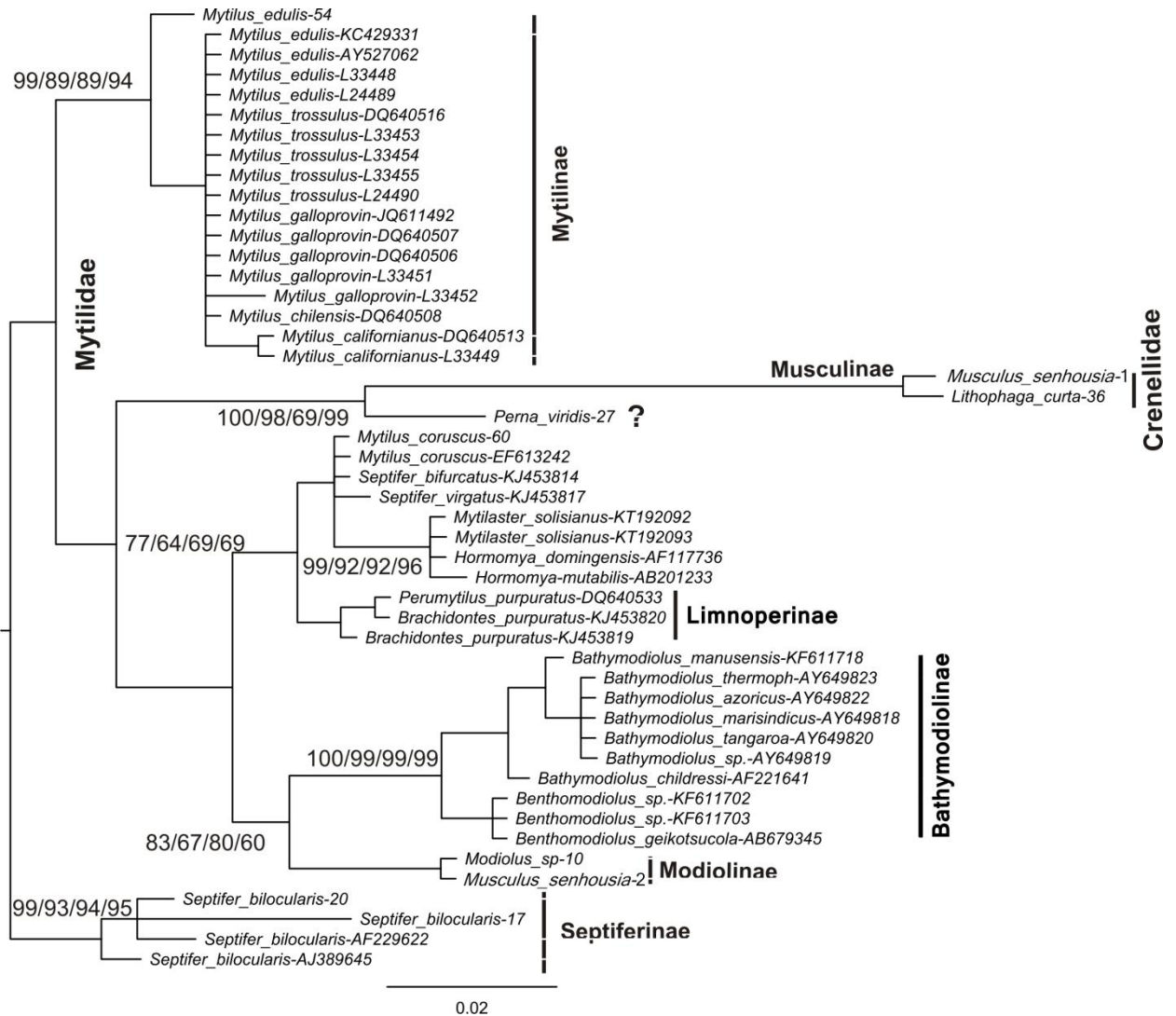


Рисунок 3.2. Укорененное консенсусное Байесовское (БА) дерево, показывающее филогенетические взаимосвязи на основе 48 последовательностей нуклеотидов 18S рНК мидий (Mollusca, Mytilidae). Обозначения и сокращения аналогичны рисунку 3.1.

Генное дерево 18S рНК обнаруживает также три основных ветви с семействами: Mytilidae, Septiferidae, Crenellidae, шесть ветвей с подсемействами: 1) Mytilinae, 2) Modiolinae, 3) Musculinae, 4) Bathymodiolinae, 5) Septiferinae, 6) Limnoperinae, с входящими в них родами и видами (Рисунок 3.2). Дерево гена 18S показывает очень слабую кластеризацию отдельных видов в пределах рода. Наиболее отчетливо в генном дереве 18S поддержана монофилия семейства Septiferidae (93-99%

поддержки), ветвь Crenellidae занимает внутреннюю позицию в пределах Mytilidae, последнее, как и для деревьев 28S и H3, поддержано только в ВА-реконструкции (98%), но к тому же, является парафилетичным. Из подсемейств, представленных несколькими видами, наиболее надежно поддержаны топологически два – Mytilinae и Bathymodiolinae: 89 – 99% и 99 – 100% поддержки, соответственно. На дереве 18S рРНК многие ветви являются неразрешенными и слабо поддержанными топологически, не исключая топологии Mytilidae и Mytilinae (Рисунок 3.2). Одна из ветвей, включающая представителя *Perna*, имеет обособленное положение на дереве с представителями Crenellidae, что также, возможно, требует таксономического обоснования (Рисунок 3.2, показано вопросом). По этой особенности дерево 18S сходно с 28S и H3.

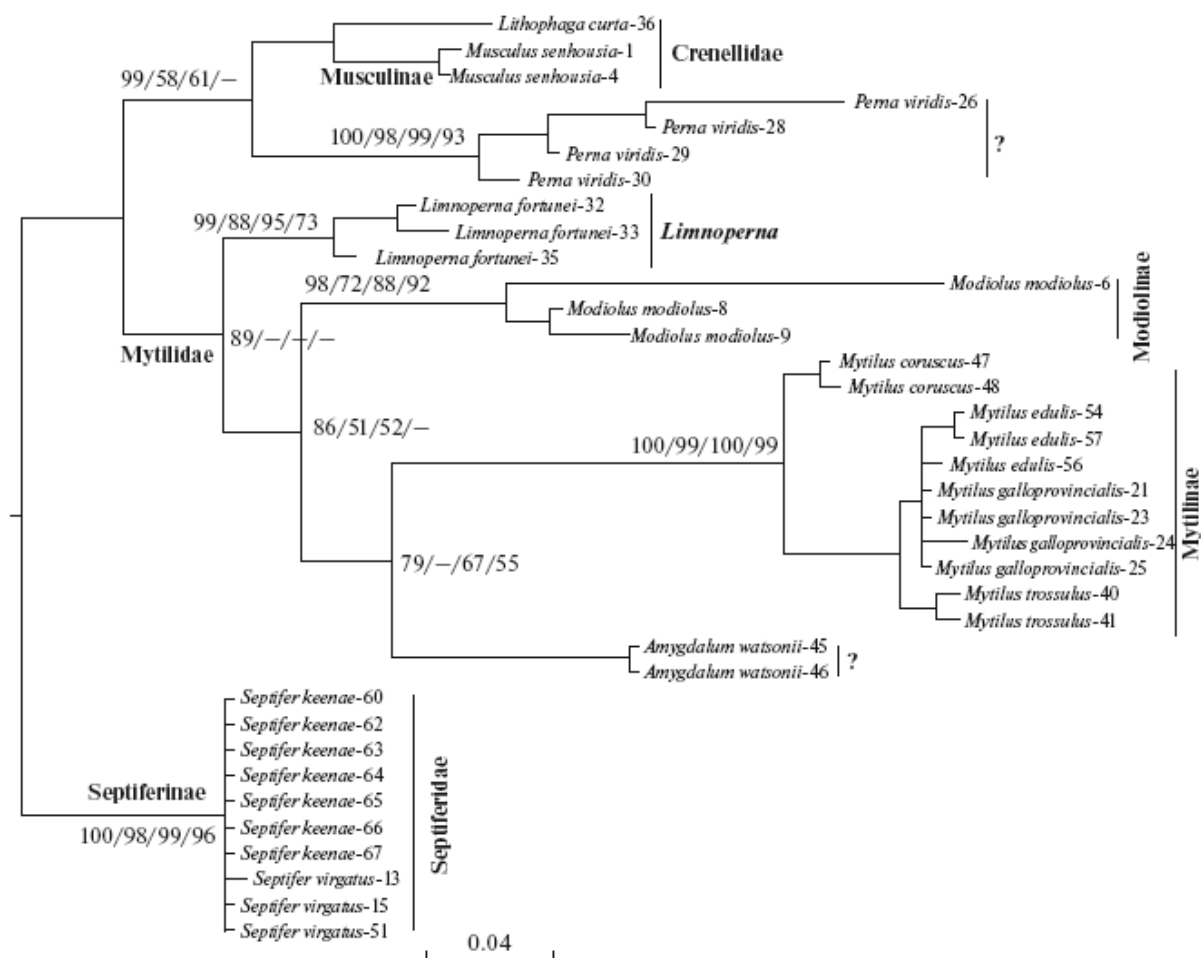


Рисунок 3.3. Консенсусное ВА-дерево мидий (*Mollusca*, *Mytilidae*), построенное на основе последовательностей нуклеотидов гистона *H3*, с использованием методов реконструкции ВА/ML/MP/MJ. Поддержки даны в указанной последовательности.

Филогенетическое дерево гистона *H3* яДНК обнаруживает три основных ветви с семействами *Mytilidae*, *Septiferidae* и *Crenellidae*. И четыре ветви с подсемействами *Mytilinae*, *Modiolinae*, *Musculinae* и *Septiferinae*. Дерево *H3* показывает отчетливую кластеризацию отдельных видов в пределах рода, кроме рода *Mytilus*, в котором 2 вида группы *Mytilus* ex. group *edulis* не дифференцируются, а *M. coruscus* занимает по отношению к ним внешнюю позицию (Рисунок 3.3). Наиболее отчетливо в геномном дереве *H3* поддержана монофилия семейства *Septiferidae*, ветвь *Crenellidae* занимает внешнюю позицию по отношению к *Mytilidae*, последнее поддержано только

в ВА и ML-реконструкциях (Рисунок 3.3, поддержка 98% и 54%, соответственно). Из подсемейств, представленных несколькими видами, наиболее надежно поддержанным топологически является подсемейство Mytilinae (99 – 100%). Однако на генном дереве *НЗ* яДНК топология Mytilidae и Mytilinae (кроме *Mytilus*) является полностью разрешенной. Одна из ветвей, включающая представителей *Perna*, имеет обособленное положение на дереве с представителями Crenellidae, и, возможно, требует таксономического обоснования.

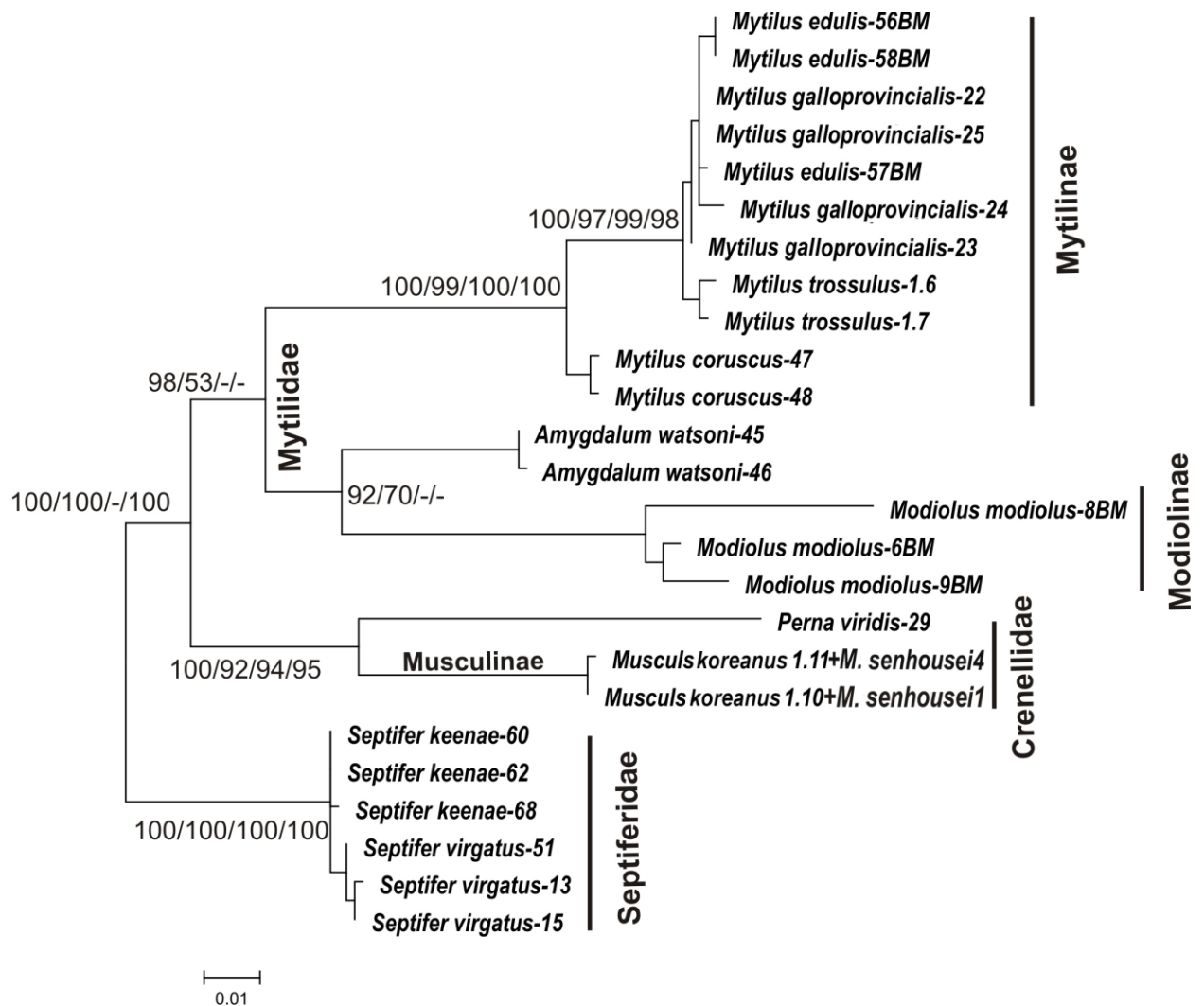


Рисунок 3.4. Укорененное консенсусное ВА-дерево мидий (*Mollusca*, *Mytilidae*) , построенное на основе 25 объединенных последовательностей нуклеотидов генов 28S рРНК и гистона *H3*, с использованием методов реконструкции ВА/ML/MP/MJ. Поддержки даны в указанной последовательности. Пары последовательностей *M. koreanus* и *M. senhousei* были объединены для полноты анализа топологии, учитывая их идентичность (образцы 1.11+4 и 1.10+1, соответственно).

Генное дерево 25 объединенных последовательностей 28S рРНК и *H3* яДНК обнаруживает также три основных ветви с семействами: *Mytilidae*,

Septiferidae, Crenellidae, а также три ветви с подсемействами: 1) Mytilinae, 2) Modiolinae, 3) Musculinae, с входящими в них родами и видами.

Дерево показывает более отчетливую кластеризацию отдельных видов в пределах рода *Mytilus*, в котором, как ранее, 2 вида группы *Mytilus* ex. gr. *edulis* не дифференцируются, но *M. trossulus*, а затем *M. coruscus* занимают по отношению к ним внешнюю позицию. Наиболее отчетливо в объединенном генном дереве 28S и H3 поддержана монофилия семейства Septiferidae (100% поддержки), ветвь Crenellidae занимает внешнюю позицию по отношению к Mytilidae, но последнее, как и для отдельных деревьев 28S и H3, поддержано только в BA- и ML-реконструкциях. Из подсемейств, представленных несколькими видами, наиболее надежно поддержаны топологически два – Mytilinae и Septiferinae: 99 – 100% и 96 – 100% повторяемости, соответственно. На дереве нет неразрешенных топологий, но слабо поддержанные топологически узлы есть. Однако на объединенном генном дереве 28S рРНК и гистона H3 топология Mytilidae и Mytilinae (кроме *Mytilus* ex. gr. *edulis*) является полностью разрешенной, а *M. trossulus* занимает по отношению к двум другим видам комплекса внешнюю позицию. Одна из ветвей, включающая представителей *Perna* и *Musculus*, имеет обособленное положение на дереве с представителями Crenellidae, и, соответственно, в связи с ранее изложенным, требует таксономического обоснования. По этой особенности дерево 28S рРНК и гистона H3 сходно со всеми остальными деревьями.

По совокупности полученных молекулярно-филогенетических данных, была уточнена систематика одного из крупнейших таксонов двустворчатых моллюсков, семейства Mytilidae и решена важная проблема систематики митилид. В частности, полученные данные определенно указывают на монофилию семейства Mytilidae и подсемейства Mytilinae (Рисунки 3.1, 3.3, 3.4), что опровергает заключение о полифилетичности подсемейства Mytilinae Rafinesque, 1815. В представленной работе не удалось полностью

разрешить топологию видов *Mytilus* ex. group *edulis*. На это есть несколько причин. Во-первых, этот таксон относительно молод. Во-вторых, из-за многочисленных инвазий в Мировом океане появилось несколько гибридных зон с интрогрессией генов в генофонды видов этой группы. Наконец, в этом исследовании использовались неполные, относительно короткие последовательности генов, которые имеют ограниченную информационную емкость для полного разрешения топологии дерева. Самая низкая интрогрессия встречается в направлении *M. trossulus* (Kartavtsev et. al., 2005; Картавцев и др., 2014), что полностью согласуется с результатами, полученными в данной работе, которые представлены в недавних публикациях (Kartavtsev et al., 2018). На филогенетических деревьях ветвь этого вида имеет внешнее положение относительно двух других видов группы (Рисунки 3.1, 3.3, 3.4). Это подтверждают более ранние исследования, проведенные с использованием генетико-биохимических маркеров (Чичвархин и др., 2000), а также данные, основанные на изучении полных митохондриальных геномов с реконструкцией филогенетического дерева для *Mytilus*, дающей полное топологическое разрешение для этого рода (Zbawicka et al., 2014). Хотя даже для данного дерева была обнаружена парафилия. Вероятно, это связано с высоким уровнем гибридизации и генетической интрогрессией между видами *Mytilus* в Балтийском море, где было собрано большинство образцов для этого исследования (Zbawicka et. al. 2014).

Помимо этого, результаты диссертационной работы поддерживают выделение таксонов *Modiolinae* G. Termier & H. Termier, 1950 и *Bathymodiolinae* Kenk & Wilson 1985 в ранге подсемейств (Carter et. al. 2011; Bieler et. al., 2010) внутри семейства *Mytilidae*, также, как и семейство *Septiferidae* Scarlato et Starobogotov, 1979b и подсемейство *Septiferinae* Scarlato et Starobogotov, 1979b (Рисунки 3.1 и 3.2).

Дополнительный интерес вызывают виды *C. grayanus* и *M. coruscus*, которые образуют внешнюю группу к остальным видам рода *Mytilus*, что говорит о необходимости пересмотреть систематику этих видов и их отношение к роду *Mytilus*, на что систематики уже обращали внимание ранее (Кафанов, 1991).

3.2. Анализ гибридной зоны двух видов комплекса *Mytilus* ex. group *edulis* в северо-западной части Японского моря

3.2.1. Генетический анализ гибридной зоны *M. trossulus* – *M. galloprovincialis* в северо-западных акваториях Японского моря на основе выборок 2011 года

Первая работа по этому направлению проведена на основе выборок мидий объемом от 50 до 128 особей, взятых в 2011 году в разных районах российского побережья Японского моря.

Для каждого из 8 исследованных локусов выявлено от 4 до 14 аллелей.

Частоты аллелей, ранжированные согласно их относительной подвижности в геле, для всех выборок представлены в таблице 3.1. Частоты генотипов *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* и гибридов, полученные для разных типов маркеров, представлены отдельно для каждой из трех групп на рисунке 3.5.

Таблица 3.1. Частоты аллелей 8 проанализированных аллозимных локусов в выборках мидий комплекса *Mytilus* из залива Петра Великого Японского моря

Локусы	Аллели*, размер выборки особей, N	Киевка	Восток МБС	Восток	Гайдамак	Соболь	Нефтебаза	Витязь	Зарубино
	N	50	60	60	56	58	111	58	124
PGM-1*	80 – 87	0,09	0,04	0,03	0,21	0,03	0,05	0,08	0,27
PGM-1*	92 – 96	0,30	0,32	0,32	0,08	0,16	0,34	0,30	0,22
PGM-1*	100	0,52	0,52	0,50	0,53	0,61	0,42	0,50	0,25
PGM-1*	103 – 105	0,07	0,00	0,08	0,03	0,03	0,09	0,02	0,06
PGM-1*	>105	0,01	0,11	0,06	0,15	0,16	0,08	0,09	0,14
	N	50	60	60	56	58	111	58	118
GPI*	<80	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,04
GPI*	82 – 89	0,32	0,35	0,42	0,35	0,28	0,27	0,30	0,10
GPI*	93 – 96	0,04	0,12	0,28	0,22	0,06	0,05	0,04	0,04
GPI*	100	0,46	0,48	0,26	0,34	0,53	0,59	0,59	0,35
GPI*	105	0,15	0,04	0,04	0,07	0,06	0,06	0,01	0,06
GPI*	110	0,02	0,00	0,00	0,01	0,06	0,04	0,06	0,39
GPI*	>110	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
	N	50	60	60	56	58	111	57	127
MPI*	66	0,02	0,01	0,00	0,04	0,03	0,02	0,00	0,00
MPI*	84	0,15	0,02	0,01	0,12	0,02	0,00	0,03	0,39
MPI*	100	0,81	0,96	0,97	0,79	0,96	0,95	0,97	0,61
MPI*	115	0,02	0,02	0,02	0,04	0,00	0,03	0,00	0,00
MPI*	131	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	N	50	60	59	55	57	111	58	127
ODH*	<80	0,07	0,06	0,01	0,05	0,02	0,06	0,07	0,12
ODH*	79 – 82	0,05	0,03	0,08	0,00	0,04	0,02	0,03	0,07
ODH*	89	0,00	0,10	0,00	0,05	0,15	0,07	0,02	0,07
ODH*	95	0,08	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02

Продолжение таблицы 3.1.

ODH*	100 – 102	0,61	0,72	0,76	0,86	0,74	0,82	0,84	0,53
ODH*	107	0,14	0,05	0,00	0,03	0,05	0,03	0,03	0,23
ODH*	>107	0,05	0,08	0,08	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
	N	50	60	60	56	28	82	27	70
AAT-1*	75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
AAT-1*	100	0,96	0,97	0,93	0,98	0,95	0,95	0,96	0,94
AAT-1*	120	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
AAT-1*	150	0,04	0,03	0,08	0,02	0,05	0,03	0,04	0,05
	N	50	60	60	56	28	82	57	100
AAT-2*	75	0,00	0,01	0,02	0,02	0,00	0,03	0,02	0,02
AAT-2*	100	0,98	0,99	0,98	0,97	1,00	0,96	0,96	0,98
AAT-2*	105	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AAT-2*	135	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01
	N	50	60	60	56	58	108	58	123
LAP*	>77	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02	0,00	0,04	0,01
LAP*	77 – 84	0,06	0,07	0,25	0,09	0,13	0,08	0,09	0,09
LAP*	90 – 96	0,36	0,51	0,26	0,34	0,37	0,44	0,42	0,24
LAP*	100 – 104	0,45	0,39	0,44	0,50	0,47	0,44	0,41	0,49
LAP*	107	0,00	0,03	0,02	0,00	0,01	0,00	0,01	0,06
LAP*	111	0,12	0,00	0,00	0,06	0,01	0,04	0,03	0,09
LAP*	124	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
	N	48	54	0	55	57	0	24	36
AAP*	>91	0,15	0,15		0,18	0,27		0,15	0,10
AAP*	91 – 96	0,32	0,41		0,35	0,28		0,54	0,24
AAP*	100 – 103	0,44	0,43		0,42	0,43		0,29	0,26
AAP*	109	0,03	0,02		0,05	0,02		0,02	0,13
AAP*	>109	0,06	0,00		0,00	0,00		0,00	0,28

Примечание. (*) Аллели обозначали в согласии с электрофоретической подвижностью по отношению к наиболее частым аллозимам, принятым за 100. Соответственно, аллоферменты мигрирующие дальше к аноду имеют значения > 100 и наоборот более медленные имеют значения < 100. Если

указаны диапазоны, то в этих случаях аллоферменты близкие по подвижности объединяли в один аллельный класс.

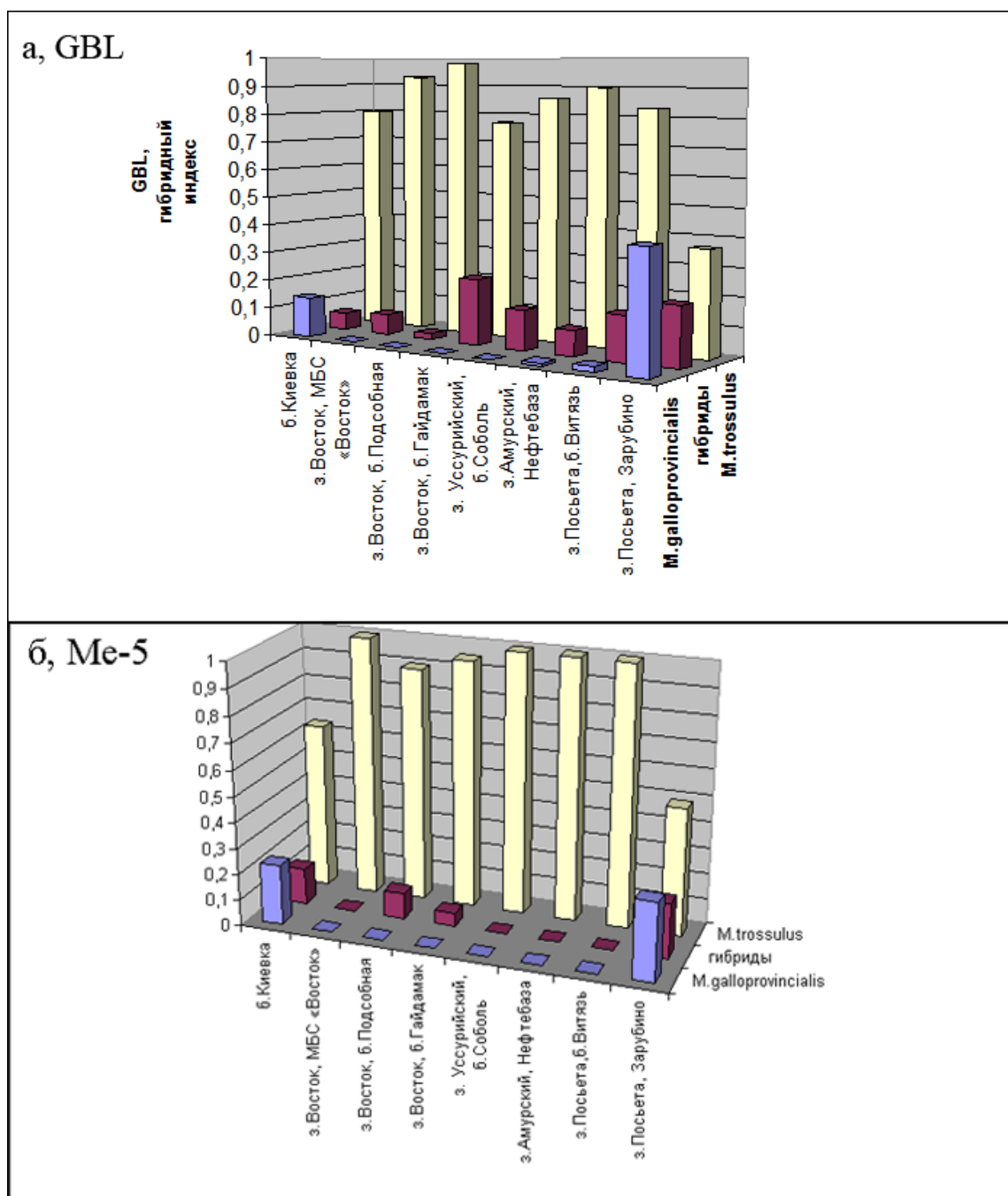


Рисунок 3.5. Гистограмма распределения частоты интродуцентов (*M. galloprovincialis*), гибридов и местного вида (*M. trossulus*) в исследованных выборках мидий в зал. Петра Великого и в б. Киевка (Японское море).

Гистограммы построены по данным таблицы 3.2. По оси Z – частоты встречаемости особей трех проанализированных групп.

На основе визуального анализа генотипической идентификации исследованных мидий можно говорить о хорошей воспроизводимости данных по всем трем группам маркеров (Таблица 3.2.): 1. GBL (генетико-биохимические маркеры, идентификация по гибриднему индексу), 2. *Me-5* и 3. *ITS-1,2*. Средние частоты встречаемости показывают, что в выборках преобладают особи одного вида (*M. trossulus*): $80\pm 7\%$, $87\pm 7\%$ и $88\pm 7\%$, соответственно – для GBL, *Me-5* и *ITS-1,2* (таблица 3.2.; после знака « $\pm$ » приведена стандартная ошибка доли).

Средняя частота встречаемости генотипов *M. trossulus* составила $80\pm 7\%$. Доля генотипов *M. trossulus* в большинстве выборок находится в диапазоне 77 – 98% (Таблица 3.2, Рисунок 3.5, а). Выборка из зал. Посъета, пос. Зарубино, является исключением. В этом районе доля генотипов вида *M. trossulus* оказалась относительно низка: 37 – 49% (Таблица 3.2). Данная выборка, помимо этого, характеризуется максимальной среди всего материала долей генотипов *M. galloprovincialis*: 30 – 42%. Еще одной выборкой с неожиданно высокой долей генотипа *M. galloprovincialis* стала выборка из бухты Киевка: 14%. В большинстве же выборок доля *M. galloprovincialis* либо очень низкая – 1 – 2% (б. Витязь, зал. Амурский), либо представители этого вида вообще отсутствовали (выборка из зал. Уссурийский и две выборки из зал. Восток).

Таблица 3.2. Доля генотипов родительских видов и гибридов в исследованных выборках при оценке по комплексу аллозимных локусов (GBL, гибридный индекс) и по двум молекулярным маркерам (*Me-5* и *ITS-1,2*)

Поселения	<i>M. trossulus</i>			Гибриды			<i>M. galloprovincialis</i>		
	<i>GBL</i>	<i>Me-5</i>	<i>ITS</i>	<i>GBL</i>	<i>Me-5</i>	<i>ITS</i>	<i>GBL</i>	<i>Me-5</i>	<i>ITS</i>
1. Б. Киевка	0,80 ±0,02	0,64 ±0,05	0,64 ±0,05	0,06 ±0,01	0,14 ±0,02	0,14 ±0,02	0,14 ±0,02	0,23 ±0,04	0,23 ±0,04
2. Зал. Восток, МБС «Восток»	0,93 ±0,01	1 -	1 -	0,07 ±0,01	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
3. Зал. Восток, Б.Подсобная	0,98 ±0,002	0,90 ±0,03	1 -	0,02 ±0,002	0,10 ±0,03	0 -	0 -	0 -	0 -
4. Зал. Восток, б.Гайдамак	0,77 ±0,02	0,95 ±0,01	0,95 ±0,01	0,23 ±0,02	0,05 ±0,01	0,05 ±0,01	0 -	0 -	0 -
5. Зал. Уссурийский, б.Соболь	0,86 ±0,02	1 -	1 -	0,14 ±0,02	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
6. Зал.Амурский, Нефтебаза	0,90 ±0,01	1 -	1 -	0,09 ±0,01	0 -	0 -	0,01 ±0,001	0 -	0 -
7. Зал. Посьета, Б. Витязь	0,83 ±0,02	1 -	1 -	0,16 ±0,02	0 -	0 -	0,02 ±0,003	0 -	0 -
8. Зал.Посьета, Зарубино	0,37 ±0,02	0,49 ±0,03	0,49 ±0,03	0,21 ±0,01	0,21 ±0,02	0,19 ±0,02	0,42 ±0,02	0,30 ±0,02	0,31 ±0,02
Средняя ± ошибка	0,80 ±0,07	0,87 ±0,07	0,88 ±0,07	0,12 ±0,03	0,06 ±0,03	0,05 ±0,03	0,07 ±0,05	0,07 ±0,04	0,07 ±0,04

Примечание. В левом столбце (*GBL*) для каждой из анализируемых групп – доли особей, оцененные на основе гибридных индексов, рассчитанных для 8 условно диагностических аллозимных локусов с помощью программы Structure по результатам классификации комплексного генотипа (пояснения в тексте). *Me-5* и *ITS* – доли, оцененные по генотипам диагностических ДНК-маркеров, *Me-5* и *ITS-1,2*. После знака «±» приведена стандартная ошибка доли. Прочерк – нет данных.

На основе представленной информации можно сделать вывод о возможном нарастании инвазии вида *M. galloprovincialis* в северо-западную часть Японского моря. Так, в заливе Восток, доля гибридных особей доходит до $23 \pm 3\%$ (см. таблицу 3.6, б. Гайдамак). Этот показатель был значительно ниже в прошлых работах: $8,95 \pm 1,68\%$ в 1999 г. (Скурихина и др., 2001) и $1,60 \pm 0,90\%$ в 2003 г. (Kartavtsev et al., 2005). Помимо этого, были впервые обнаружены постоянные поселения вида-интродуцента в районе пос. Зарубино в зал. Посъета. В данном районе до этого обнаруживали только единичных особей вида *M. galloprovincialis*, которые в основном были прикреплены к плавающим предметам, переносимым течениями со стороны Кореи и Японии (Кепель, Озолинш, 1992; Ivanova, Lutaenko, 1998; Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005). Но нельзя отрицать вероятность того, что подобные выводы связаны с недостаточной изученностью региона в предыдущие годы, так как поселения непосредственно из порта Зарубино залива Посъета и б. Гайдамак зал. Восток ранее не были изучены. Также с осторожностью следует относиться к выводу об экспансии зоны инвазии на север, в б. Киевка, где генетические исследования ранее также не выполнялись, хотя, гидробиологические находки этого вида с севера Приморья известны (Лутаенко, Колпаков, 2016).

На основе данных популяционно-генетического анализа, можно предположить, что распространение двух видов в масштабе региона является мозаичным. Возможно, мозаичность обусловлена векторами расселения *M. galloprovincialis*. Зарубино – международный порт и поэтому возможен занос мидий в качестве обрастателей судов из зон постоянного обитания *M. galloprovincialis*. Заметим, правда, что источник инвазии *M. galloprovincialis* в бухту Киевка до сих пор неясен. Там нет активного пассажирского судоходства. Однако инвазия или непреднамеренная интродукция сюда возможна посредством рыболовецких судов, посещающих Японию и Корею, где есть постоянные местообитания вида-интродуцента.

Распространение *M. galloprovincialis* может быть ограничено температурным фактором (Hilbish et al., 2010). Также по результатам предыдущих исследований (Кепель, Озолинш, 1992; Ivanova, Lutaenko, 1998; Скурихина и др., 2001) можно предположить, что южная часть зал. Петра Великого является северной границей распространения этого вида в западной части Японского моря. Однако генетического анализа проб из районов, расположенных к северо-востоку от зал. Восток, до сих пор не проводилось. Таким образом, представленные здесь данные показывают, что граница ареала *M. galloprovincialis* протекает севернее, чем считалось ранее.

Доминирование особей родительских видов над гибридами во всех выборках позволяет описать гибридную зону как бимодальную (Barton, Hewitt, 1985). Предположительно, гибридизация между аборигенным видом и интродуцентом до определенной степени ограничена какими-то изоляционными механизмами. Кроме этого, анализ соотношений родительских и гибридных генотипов в выборках из разных районов показал, что в среднем доля гибридов в выборках снижается в направлении от юго-запада к северо-востоку: от 19 – 21% в заливе Посыета, в районе пос. Зарубино, до 2 – 10% в зал. Восток (б. Подсобная и МБС «Восток») и 6 – 14% в б. Киевка (Таблица 3.2, Рисунок 3.5, а). Отчасти, такая тенденция может быть связана с общим снижением доли одного из родительских видов в выборках северных поселений мидий. В то же время, интересно следующее сравнение. В более южных выборках доля «чистых» *M. galloprovincialis* колеблется от 30 – 42% в Зарубино и до 0 – 2% в б. Витязь. В контрасте с этим, в Амурском заливе доля интродуцентов и гибридов, в свою очередь, колеблется от 0 – 1% до 0 – 9%, соответственно. В выборках, в которых чистые *M. galloprovincialis* в принципе отсутствуют (Уссурийский залив, Гайдамак, Подсобная, МБС «Восток»), доля гибридов составляет от 2% до 23%. В то же время, в б. Киевка, несмотря на то что доля *M. galloprovincialis* достигает 14 – 23%, гибридов всего 6 – 14% (Таблица 3.2, Рисунок 3.5, а). По-

видимому, в разных районах степень репродуктивной изоляции между родительскими видами может быть различной. Схожие результаты получены в работах по исследованию зон гибридизации *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* на острове Хоккайдо (Brannock et al., 2009), причем дифференциация по степени гибридизации также обнаружена между северными и южными районами острова. Факторы, влияющие на степень гибридизации, однако, до конца не ясны, это могут оказаться как климатические особенности районов, так и история инвазии. В представленном выше материале интересной является также выборка из б. Гайдамак, содержащая большую долю гибридов (5 – 23%) при полном отсутствии инвазивных *M. galloprovincialis*. Причины, обуславливающие такое соотношение генотипов, пока остаются неясными. Стоит также отметить, что гибридов в этом районе находили и ранее (в конце 1990-х годов), только определяли их по морфологическим признакам. Возможно, что гибридные особи возникают в этом районе как результат размножения *M. galloprovincialis* из обрастаний судов, приходящих в судоремонтный завод, расположенный в этой бухте. При подходящих условиях, размножение инвазивных судовых обрастателей (*M. galloprovincialis*) с местными особями (*M. trossulus*) может происходить. Суда затем уходят, и в бухте обнаруживается только один из родительских видов, местный *M. trossulus* и гибриды. Очевидно, что необходимы дальнейшие генетические исследования в этой акватории, чтобы прояснить этот вопрос.

Анализ данных по ядерным ДНК-маркерам *Me-5* и *ITS-1,2* выявил те же тенденции, что описаны и по 8 аллозимным локусам. Обнаружено преобладание в изученных выборках генотипов местного вида – тихоокеанской мидии *M. trossulus* (Таблица 3.2, Рисунок 3.5, б). Также выявлена относительно высокая доля вида-интродуцента *M. galloprovincialis* и наибольшее число гибридов в заливе Посьета, вблизи пос. Зарубино, с международным судоходством (Таблица 3.2, Рисунок 3.5, б). Если учесть ошибки выборочности, то следует, что в среднем доли гибридов и двух

исследуемых родительских видов, определенные по трем различным группам маркеров статистически значимо не отличаются (Таблица 3.2, Рисунок 3.5, б): $P < 0.2$. Однако стоит отметить, что, хотя доли гибридов, определенные по аллозимным локусам и по двум различным молекулярным маркерам, статистически значимо не отличаются, полудиагностические GBL-маркеры в сравнении с диагностическими я-ДНК маркерами дают несколько завышенную долю гибридов и заниженную долю *M. trossulus* (Таблица 3.2, рисунок 3.1, б). В целом различия оценок долей гибридов, выявленные по разным типам маркеров, ожидаемы. GBL-маркеры являются полудиагностическими и частоты гибридов оценены посредством цифрового моделирования. Диапазон значений индекса для оценки гибридного статуса особи взят произвольно, основываясь на предыдущем опыте или из эвристических соображений. Имеются и другие погрешности этого подхода, связанные с неизвестностью точных значений некоторых параметров при выполнении моделирования, о чем уже упоминалось. Оценки по ДНК-маркерам, являющимися диагностическими, получены по фактическим численностям гибридных генотипов. При этом, как оказалось, совпадение оценок вполне приличное, что говорит о надежности полученных фактов.

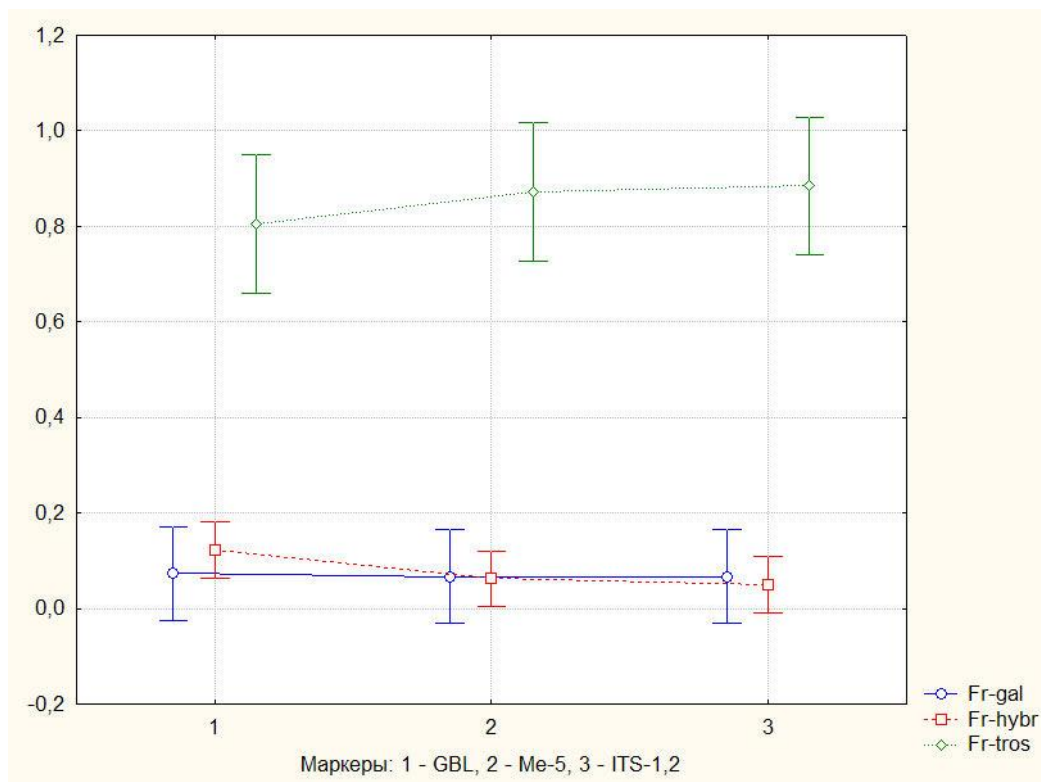


Рисунок 3.6. Однофакторный дисперсионный анализ частот встречаемости в выборках *M. galloprovincialis* (Fr-gal), гибридов (Fr-hybr) и *M. trossulus* (Fr-tros) при оценке по трем группам маркеров: GBL, Me-5 и ITS-1,2.

Различия частот при оценке совокупно по трем маркерам не значимы: Wilks lambda = 0,6536, $F = 1,5004$, d.f. = 6; 38, $P < 0,2044$. Вертикальные линии – 95% доверительный интервал.

Исследование и сопоставление данных по разным типам маркеров является важным аспектом представленной работы, так как показано, что при гибридизации у мидий разные генетические компоненты могут вести себя несогласованно. Такая ситуация описана для Балтийского моря, где длительная активная гибридизация привела к интрогрессии генов североморской *M. edulis* в геном балтийской *M. trossulus*. Однако это выявлено только по митохондриальным генам и, в меньшей степени, по неаллозимным ядерным локусам (Borsa et al., 1999; Riginos, Cunningham, 2005). Обнаружение согласованной изменчивости по разным типам маркеров у гибридизующих мидий из Японского моря – одно из свидетельств невысокого уровня гибридизации *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* в этом регионе.

В целом ясно, что генотипическая дифференциация в изученных поселениях мидий невысока. Так, для GBL суммарное минимальное несмещенное расстояние Нея, $Dm^* = 0,025288 \pm 0,004150$. Это показывает небольшую, но статистически значимую генетическую дивергенцию поселений мидий в заливе Петра Великого. Хотя отдельные локусы демонстрируют очень большую гетерогенность частот генотипов и аллелей. Усредненная по 8 локусам и взвешенная по проанализированному на данный момент варианту из 6 выборок стандартизированная, нормализованная дисперсия частот аллелей $F'st$ (Nei, 1978) составила $0,047305 \pm 0,055929$. Такого рода факты об относительно низкой генетической дифференциации поселений мидий в заливе Петра Великого были известны и ранее (Картавцев, 1981; Картавцев, Заславская, 1982). Это связано с большим потоком генов между поселениями, представляющими собой субпопуляции подразделенной популяции за счет длительно планктонирующих личинок и их разноса течениями на большие расстояния (Картавцев, 1981; Картавцев, Заславская, 1982; Картавцев, 2009).

3.2.2. Генетический и морфологический анализ гибридной зоны *M. trossulus* – *M. galloprovincialis* в северо-западной части Японского моря в 2012 – 2013 гг.

В этом разделе представлен анализ изменчивости 6 аллозимных локусов и ДНК-маркера *Me-5* в изученных нами выборках, собранных в 2012 – 2013-х годах, а также изменчивости морфологических признаков (Масалькова и др., 2016). По аллозимным локусам выявлено наличие до 7 аллелей, по *Me-5* внутривидовой изменчивости не обнаружено.

Полученные доли генотипов представлены в таблице 3.3 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* ($91 \pm 3 \%$), тогда как по оценке на основе GBL доля этого вида равна $45 \pm 2 \%$.

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, стандартизированная и нормализованная дисперсия частот аллелей F'_{st} (Nei, 1977, 1978, 1987) в 2011 г. составляла $0,0473 \pm 0,0559$, 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 статистически значимая генетическая дифференциация поселений мидий все же наблюдается, пусть и небольшая. В тесте хи-квадрат значимой является гетерогенность частот аллелей трех из шести локусов. Эта дифференциация имеет сложную природу и неодинакова для разных локусов. По-видимому, она складывается из генетического дрейфа,

характерного для любых природных популяций, и дифференцирующего естественного отбора, двух факторов, которые могут частично нивелироваться миграцией между поселениями. При этом отдельные локусы демонстрируют значительную гетерогенность частот генотипов и аллелей. Причиной гетерогенности является большой поток 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 (Картавец, 1981, Картавец, Заславская, 1982).

Анализ морфологических признаков показывает, что, в основном, вариационные ряды значительно не отклоняются от нормального распределения (Таблица 3.4, см. коэффициенты эксцесса, асимметрии и их стандартные ошибки). Преобладает и доля индексов, имеющих нормальное распределение или близкое к нему распределение.

Наглядно о соотношении морфологических различий поселений мидий можно судить по итогам дискриминантного анализа. Распределение особей во всех исследованных выборках по значениям канонических переменных (КП: КП 1, КП 2 и КП 3), оценивающих в дискриминантном анализе интегральную картину дифференциации, показано на рисунках 3.7 и 3.8. В случае 6 выборок анализ включал 11 признаков, 10 индексов и значений генотипов по 4 локусам: *PGM-1**, *ODH**, *MPI**, *LAP**, а особи соответственно группировались по принадлежности к 6 различным выборкам (Рисунок 3.7).

По значениям комплекса признаков для 5 выборок, 10 индексов и векторов значений для 6 локусов выявлены кластеры особей, которые пересекаются (на Рисунках 3.7 и 3.8 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, и бухты Преображение (Рисунок 3.7).

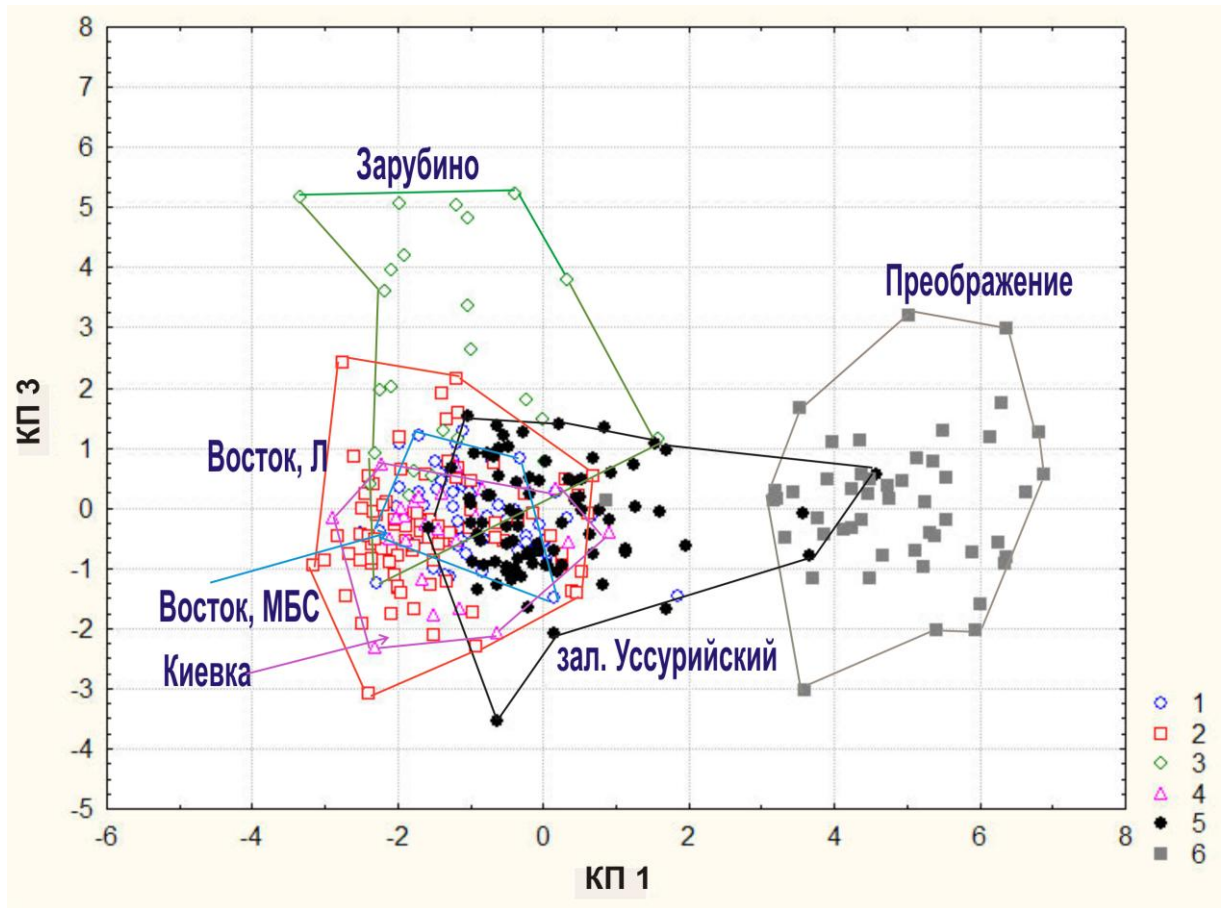


Рисунок 3.7. График распределения значений координат для двух канонических переменных (КП, КП 1 и КП 3) из 6 поселений мидий Японского моря, изученных по комплексу 11 признаков, 10 индексов и генотипических значений 6 локусов.

Если исключить выборку мидий из поселения близ пос. Преображение, представленную на Рисунке 3.7, то дифференциация по комплексным переменным, включающим значения КП по 10 индексам и 6 локусам, принципиально не меняется, хотя точность дискриминации немного снижается (Рисунок 3.8). Для 6 выборок и большего числа анализируемых морфологических признаков и индексов она составила 87 %. Как видно из Рисунка 3.9, 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 Разделе 3.2.3.

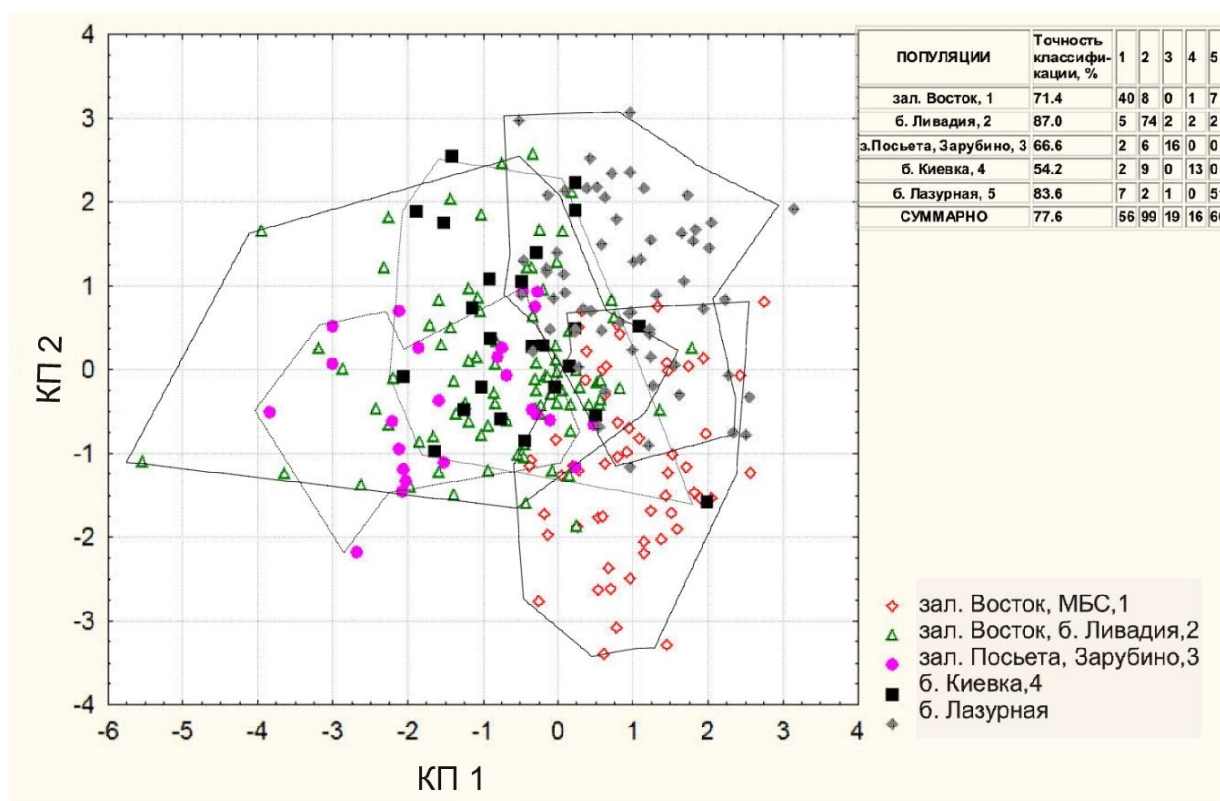


Рисунок 3.8. График распределения значений координат двух канонических переменных (КП 1 и КП 2) для модифицированных значений генотипов 6 аллозимных локусов и 10 морфологических индексов исследованных мидий 5 выборок. В таблице сверху справа показана точность дискриминации выборок по комплексу представленных признаков.

Полученные результаты в целом соответствуют данным предыдущих исследований 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 (Таблица 3.3, Рисунок 3.9).

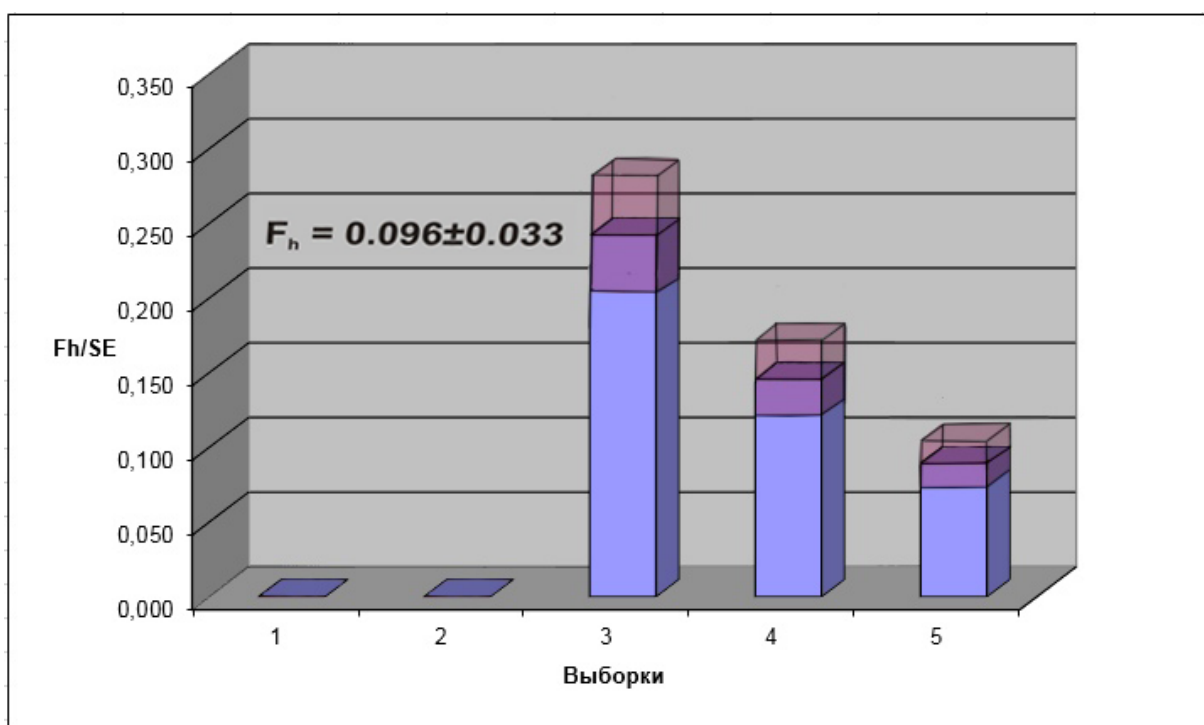


Рисунок 3.9. Распределение доли гибридных особей (F_h) в 5 исследованных выборках мидий по ДНК-маркеру Me-5. По оси X – номера выборок, по оси Y – значения F_h по локусу Me-5 в выборках 2012 г. Нумерация выборок: 1. зал. Восток, МБС «Восток», 2. зал. Восток, б. Ливадия, 3. зал. Посъета, пос. Зарубино, 4. б. Киевка, 5. б. Лазурная. Отдельными секторами на гистограммах показаны стандартные ошибки (SE) для F_h . На графике отмечено среднее значение $F_h = 9,6\%$ с SE для всех пяти выборок.

Данные анализа подтверждают высказанное в предыдущем разделе предположение о мозаичном характере распределения исследуемых видов мидий. Несмотря на то, что по литературным данным северной границей ареала этого вида в западной части Японского моря является южная часть зал. Петра Великого (Кепель, Озолинш, 1992; Скурихина и др, 2001; Kartavtsev et al., 2005), результаты, полученные в данной работе, тем не менее показывают, что граница ареала *M. galloprovincialis* протекает севернее (б. Киевка) и что появился новый очаг инвазии (б. Лазурная). Очевидно, что интенсивность инвазии год от года различается, изменяются также и доли гибридов в общей структуре комплекса *Mytilus* ex. group *edulis*.

Таблица 3.3. Экспериментальная оценка доли генотипов двух видов *Mytilus* ex. group *edulis* и их гибридов в исследованных выборках по комплексу аллозимных локусов (GBL) и по молекулярному маркеру (Me-5)

Поселения	<i>M. trossulus</i>		Гибриды	
	<i>GBL</i>	<i>Me-5</i>	<i>GBL</i>	<i>Me-5</i>
1. зал. Восток, МБС «Восток»	0,810 ±0,050	1 -	0,190 ±0,050	0 -
2. зал. Восток, б. Ливадия	0,990 ±0,010	1 -	0,010 ±0,010	0 -
3. зал. Посьета, пос. Зарубино	0,030 ±0,030	0,758 ±0,030	0,970 ±0,030	0,242 ±0,002
4. б. Киевка	0,410 ±0,070	0,854 ±0,051	0,590 ±0,070	0,146 ±0,051
5. б. 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

Таблица 3.4. Характеристики вариационных рядов морфометрических признаков, использованных в работе

Признак	N	M	Доверительный интервал, %		Минимум	Максимум	s_x	SE для M	Асимметрия (As)	SE, As	Эксцес (Ex)	SE, Ex
			-95	+95								
LENGTH	330	41,42	40,31	42,52	17	73	10,2	0,56	0,28	0,28	0,08	0,27
HEIGHT	330	21,51	20,99	22,04	11	39	4,82	0,27	0,69	0,69	0,85	0,27
LIG_LN	330	17,4	16,9	17,91	6	32	4,68	0,26	0,21	0,21	-0,13	0,27
PERL_L	330	12,13	11,55	12,71	0	29	5,36	0,29	0,35	0,35	0,08	0,27
LIG_T	330	2,3	2,2	2,41	0,5	7	0,97	0,05	1,02	1,02	2,1	0,27
DENT_PL	330	3	2,9	3,11	1	6	1	0,05	0,57	0,57	0,02	0,27
ADR_FR	330	5,02	4,8	5,24	1	15	2,03	0,11	0,93	0,93	1,74	0,27
BAC_RT	330	10,15	9,83	10,47	3	20	2,92	0,16	0,49	0,49	0,33	0,27
SINUS	330	4,97	4,82	5,11	2	11	1,36	0,08	0,75	0,75	1,42	0,27
ADR_BAC	330	1,61	1,55	1,68	0,5	4	0,61	0,03	0,62	0,62	0,2	0,27
RETR_MIN	330	4,41	4,25	4,57	1	18,5	1,47	0,08	3,13	3,13	25,15	0,27
IND1	330	0,67	0,66	0,67	0,37	1,11	0,08	0	0,56	0,56	2,53	0,27
IND2	330	0,4	0,39	0,4	0,19	0,62	0,08	0	0,34	0,34	-0,26	0,27
IND3	330	0,71	0,7	0,71	0,55	0,86	0,06	0	0,19	0,19	-0,21	0,27
IND4	330	1,03	1,02	1,04	0,67	1,3	0,08	0	-0,2	-0,20	2,31	0,27
IND5	330	0,71	0,69	0,72	0,31	1,18	0,14	0,01	0,36	0,36	0,13	0,27

Продолжение таблицы 3.4.

IND6	330	0,54	0,54	0,55	0,35	0,74	0,07	0	0,18	0,18	0,01	0,27
IND7	330	0,47	0,46	0,48	0,2	0,9	0,09	0,0 1	0,46	0,46	1,24	0,27
IND8	330	1,13	1,1	1,16	0	1,85	0,28	0,0 2	-1,19	- 1,19	3,11	0,27
IND9	330	1,41	1,4	1,42	1,04	1,85	0,08	0	0,28	0,28	3,29	0,27
IND10	330	1,62	1,61	1,63	1,23	2,07	0,1	0,0 1	0,73	0,73	2,37	0,27

Примечание. Обозначение признаков дано в разделе 2. N – численность особей в выборке, M – средняя арифметическая, s_x – стандартное отклонение, SE – стандартная ошибка.

3.2.3. Комплексный анализ гибридной зоны *M. trossulus* – *M. galloprovincialis* в заливе Петра Великого и сопредельных акваториях, по материалам за весь период исследования

В данном разделе представлены результаты работы, проведенной на основе 8 выборок, 2011 г. и 6 выборок 2012 – 2013 годов. Анализ включал 6 – 8 аллозимных локусов, 1 – 2 ядерных ДНК маркеров (*Me-5*, *ITS-1,2*), 11 морфометрических признаков и 10 индексов.

Генетический анализ

Для избегания дублирования материалов, в Разделе 6.3 даны первичные данные о генотипической изменчивости поселений, обследованных по 6 GBL маркерам в 2012 – 2013 гг. и не представленные ранее Разделе 3.2.1. Также в приложении I приведены частоты аллелей и их изменчивость для каждого из 6 аллозимных локусов. Сводный анализ, представленный в данном разделе, изложен ниже в тексте и суммирован в приложениях II – IV и на рисунках 3.10 – 3.11.

Значительных различий по уровню гетерозиготности среди 8 исследованных локусов в выборках не обнаружено. Как и у многих других видов мидий, наблюдается дефицит гетерозигот по отношению к ожидаемым частотам по Харди-Вайнбергу (Приложение I). Тем не менее, средние значения для F_{is} -статистики, измеряющие отклонения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, незначительны; если судить по значению хи-квадрат, присутствует значительный дефицит только в некоторых выборках по локусам *PGM** и *ODH** (Приложение I). Дефицит гетерозигот в поселениях, обследованных в 2012 – 2013 гг., увеличивается на обследованном участке ареала для всех локусов, как следует из существенно большего значения второй из двух сопоставленных F-статистик, F_{is} и F_{it} ($F_{is} = 0,1358 \pm 0,0454$, и $F_{it} = 0,1816 \pm 0,0490$) (Таблица 3.5, А). Для данных 2011 г. такая тенденция тоже наблюдается. Даже при сравнении F_{is} и F_{it} особей одного вида, что может быть индикатором наличия внутривидовой подразделенности на субпопуляции: $F_{is} = 0,1042 \pm 0,0406$, и $F_{it} = 0,2587 \pm 0,1061$, хотя в данном случае значения двух F-статистик различаются не значимо (Таблица 3.5, С).

Таблица 3.5. F-статистика и минимальное несмещенное генетическое расстояние $D_m^{\wedge}$ семи локусов для 5 и 8 поселений *Mytilus ex. group edulis*

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}	F_{is}	F_{it}	F_{st}	F_{is}	F_{it}	F_{st}
	А			В			С		
<i>PGM-1*</i>	0,2768	0,3127	0,0483	0,3031	0,3449	0,0742	0,2902	0,3226	0,0724
<i>AAT-1*</i>	0,0764	0,1818	0,0136	-0,0150	-0,0150	0,0366	-0,0163	-0,0156	0,0365
<i>GPI*</i>	0,1130	0,1806	0,0783	0,1504	0,2032	0,1155	0,1865	0,2510	0,0954
<i>ONDH*</i>	0,2860	0,3015	0,0127	0,2211	0,2884	0,0711	0,0586	0,1174	0,0334
<i>MPI*</i>	0,1410	0,2464	0,0189	0,2400	0,5532	0,1313	0,0425	0,1199	0,0733
<i>LAP</i>	0,0978	0,1119	0,0128	0,2225	0,2916	0,1472	0,0266	0,1687	0,1434
<i>Me-5</i>	-0,0406	-0,0640	0,0502	0,1411	0,6340	0,2560	0,1411	0,8470	0,0490
$D_m^{\wedge}(F'_{st})$	0,0153 ± 0,0057			0,0462 ± 0,0133			0,0257 ± 0,0121		
	(0,0425 ± 0,0120)			(0,1330 ± 0,0300)			(0,0732 ± 0,0200)		

Примечание. А, данные F-статистики и $D_m^{\wedge}$ для пяти выборок 2012 г.; В, данные F-статистики и $D_m^{\wedge}$ для восьми выборок 2011 г., и С, анализ данных 2011 г. без учета генотипов *M. galloprovincialis* и гибридов в выборках. Подробности формирования массивов данных А, В и С даны в тексте.

Суммарная гетерогенность аллельных частот во всех выборках в 2011 году, которая включает в себя межпопуляционные и межвидовые компоненты (в выборках этого года наблюдались оба вида), в соответствии с оценками F_{st} -статистики, равна: $F'_{st} = 0,1330 \pm 0,0300$. Это значение почти в два раза выше обнаруженного для внутривидового уровня: $F'_{st} = 0,0732 \pm 0,0200$ (Таблица 3.5, В, С). Такой же результат наблюдался в этом году на

основе средних несмещенных оценок минимального расстояния $Dm^{\wedge}$ (Таблица 3.5, В, С).

Частоты генотипов видов *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* и их гибридов полученные при помощи двух различных типов маркеров (GBL и яДНК), показали, что гибриды абсолютно точно присутствуют в выборках, но уступают по частоте аборигенному виду (Таблицы 3.2, 3.3, 3.7 и Рисунок 3.10). Даже в ходе обычного визуального анализа можно обнаружить, что оценки частот гибридов, полученные для различных групп маркеров (GBL маркеры, *Me-5* и *ITS-1,2*) схожи (Таблица 3.2, Рисунок 3.12). Средние значения частот генотипов показывают, что местный вид *M. trossulus* доминирует в выборках, в 2011 г.: $80 \pm 7\%$, $87 \pm 7\%$, и $88 \pm 7\%$, в 2012 – 2013: $45 \pm 2\%$ и $91 \pm 3\%$ по четырем аллозимным маркерам и *Me-5* в шести исследованных районах (Таблица 3.3).

Очевидно, что уменьшение числа аллозимных маркеров в 2012 – 2013 годах негативно сказалось на результатах. Для краткости, частоты распределения родительских и гибридных генотипов в исследованных выборках изображены для 8 аллозимных маркеров из 8 поселений мидий (Рисунок 3.10).

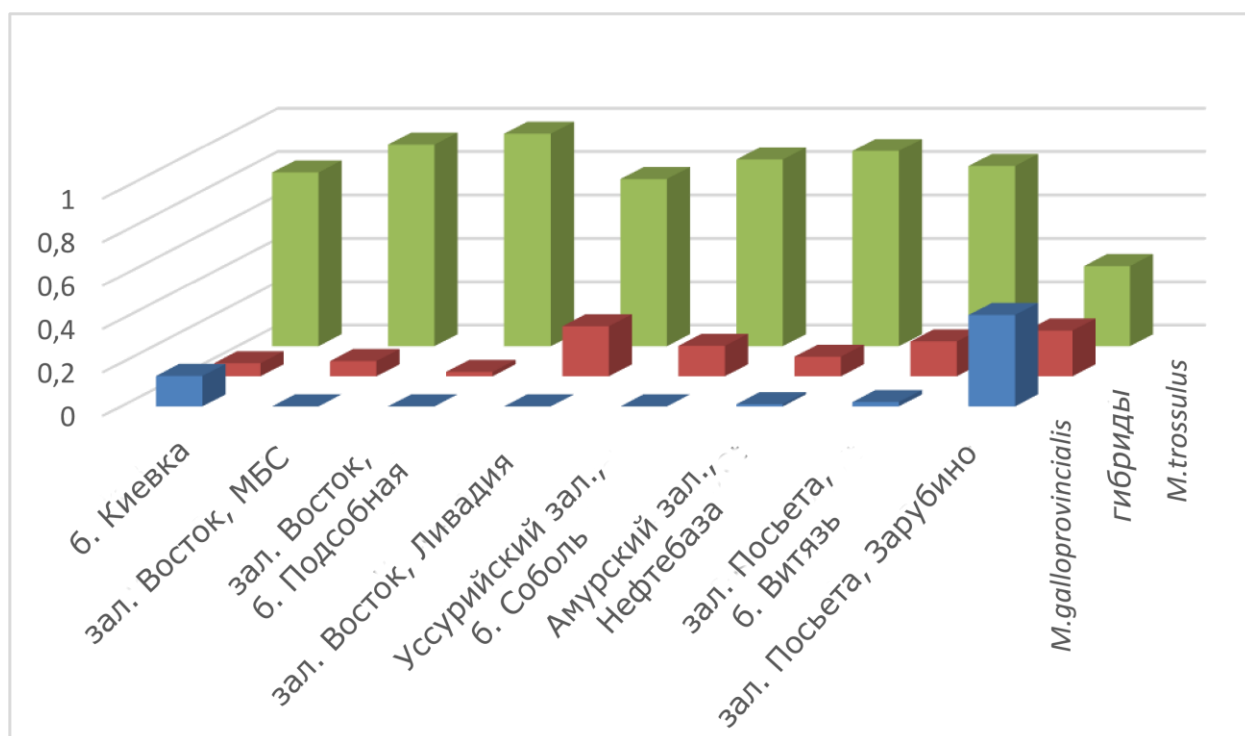


Рисунок 3.10. Гистограмма частотного распределения инвазивного вида *Mytilus galloprovincialis*, гибридов и местного вида *M. trossulus* в выборках мидий залива Петра Великого Японского моря.

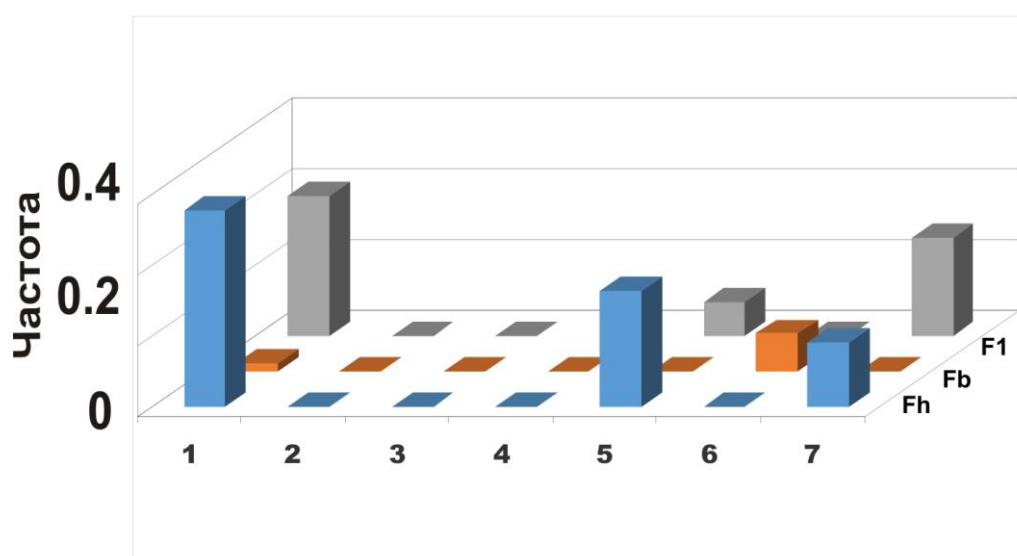


Рисунок 3.11. Пример изменчивости частоты трех типов гибридов (F_h , F_b , F_1) комплекса мидий *Mytilus* ex. group *edulis* в Японском море, но отсутствия потока генов между видами или его малого эффекта. По оси X – номера выборок из поселений мидий в заливе Петра Великого Японского моря и

близких акваториях, по оси Y – частота гибридных особей (По Kartavtsev et al., 2018).

На основе полученных данных, кроме рассчитанных при моделировании долей гибридов (Fh), установлена доля межвидовых мигрантов по фактическим численностям гибридов, Fb+F2 и т.д. равная $0,9 \pm 0,7\%$ (Приложение III, вторая колонка справа). О чем говорит подобная оценка о генетической интрогрессии в сегодняшней ситуации с мидиями на северо-западе Японского моря? Прежде всего отметим низкий уровень генетической интрогрессии при оценке по гибридам Fb+F2 при наличии гибридов F1 (Рисунок 3.11) и то, что F-статистика дает лишь косвенную оценку генетического дрейфа и соответственно потока генов. То есть, в дальнейшем предстоит углубить проведенное исследование на основе больших по размеру выборок и с включением более представительной выборки маркеров.

Совместный генетический и морфометрический анализ

Наглядно о соотношении морфологических и генетических различий поселений мидий можно судить по итогам дискриминантного анализа. Рассмотрим вариант дискриминантный анализа, который был проведен с использованием 11 морфометрических признаков, 10 индексов и 4 – 6 аллозимных локусов по материалам 2012 – 2013 гг. Число включенных в анализ локусов и морфологических признаков варьировало в разных вариантах анализа с целью максимизации различий. В целом, результат, полученный для оценок изменчивости генетических и морфологических переменных-признаков, не различается. Так, точность дискриминантного анализа довольно высока и достигает 78,7% для идентификации изученных особей на основе величин векторов-значений комплексных переменных по всему набору переменных-признаков: 4 аллозимных локусов, 10

морфологических признаков и 9 индексов (Приложение III), а также в других вариантах комбинирования признаков, индексов, локусов и для различных наборов выборок (см. Рисунки 3.7 – 3.8).

Дискриминативный анализ для представленного набора признаков статистически надежен (Приложение III): Wilks' Lambda: 0.0336, $F = 11.73$, d.f. = 125; 1476, $P < 0.0001$. Полученные результаты полностью воспроизводятся, вне зависимости от того какие данные используются, оригинальные или стандартизированные, и, как упомянуто выше, вне зависимости от того, какие комбинации данных использованы.

Популяционно-генетический анализ

Представленные результаты хорошо согласуются с другими работами по исследованию мидий и морских беспозвоночных. Следует указать на увеличение дефицита гетерозигот (ДГ) в выборках (Таблица 3.5). Дефицит наблюдаемых значений гетерозиготности по сравнению с равновесными значениями Харди-Вайнберга является известным явлением для мидий и других двустворчатых моллюсков, отмеченным с давнего времени (Tracey et al., 1975; Koehn et al., 1976, 1984; Kartavtsev, 1979; Kartavtsev and Zaslavskaya, 1983; Zouros and Foltz, 1984, 1987; Zouros, 1987; Gaffney et al., 1990; Gosling, 1992a). Обычно ДГ объясняют несколькими факторами: 1) эффект Валунда, 2) отбор, направленный против гетерозигот, 3) наличие в генотипе нулевых аллелей, 4) инбридинг, 5) анеуплоидия, 6) молекулярный импринтинг и 7) наличие криптических видов. Еще одной причиной ДГ могут быть проблемы с генетической интерпретацией изменчивости, вызванные отклонениями от кодоминантной экспрессии ферментных генов. Для морских позвоночных такие случаи описаны редко. Однако не стоит сбрасывать их со счетов. Все вышеуказанные факторы и их влияние были хорошо рассмотрены ранее (Zouros, Foltz, 1987; Zouros, 1987; Gaffney et al., 1990; Raymond et al., 1997; Kartavtsev et al., 2005, и др.). Однако, насколько известно, наличие

криптических видов (№7) было рассмотрено как важный фактор, влияющий на дефицит гетерозиготности в данной группе только однажды (Raymond et al., 1997). Если придерживаться ортодоксальных позиций концепции биологического вида, этот вариант объяснения вообще кажется сомнительным. Однако, последние биохимические и молекулярные генетические данные подтвердили выявленную ранее связь межвидовой гибридизации, интрогрессии и, предположительно, ДГ (Campton, 1987; Gerber et al., 2001; Arnold, 1997; Arnold and Fogarty, 2009), в том числе, во многих группах моллюсков (Skibinski et al., 1978; Skibinski, Roderick, 1991; Gosling, 1992a; Sarver and Foltz, 1993; Inoue et al., 1995a, 1995b; Saavedra et al., 1996; Rawson et al., 1999; Gilg, Hilbish, 2003; Kartavtsev et al., 2005).

Конкретно в рассматриваемом случае хотелось бы сконцентрировать свое внимание на этом пункте еще раз, учитывая значительные различия частот аллелей для некоторых полиморфных локусов для двух анализируемых видов и наличие фиксированных аллелей в двух диагностических маркерах *Me-5* и *ITS-1,2* (Таблица 3.5).

Впечатляет уменьшение значений $Dm^{\wedge}$ и F'_{st} после удаления всех гибридных генотипов и генотипов *M. galloprovincialis* из выборок (Таблица 3.5, С). Однако небольшая разница между средними значениями F_{is} и F_{it} и низкая статистическая значимость величин дивергенции, $Dm^{\wedge}$ и F'_{st} (Таблица 3.5, В – С) свидетельствуют о том, что шанс влияния смешения генофондов и последующего эффекта Валунда на увеличение дефицита гетерозигот невелик (Таблица 3.5, В – С). Скорее всего, причиной выявленной закономерности является небольшое число гибридов и особей инвазивного вида в изучаемом районе; в общей сложности в выборках за 2011 год их меньше, чем в 2012 – 2013, если судить по более точным генетическим данным (Таблица 3.2).

Важно отметить, что в природе присутствует комплекс различных факторов, влияющих на генетическую динамику, и процессы внутривидовой

изменчивости в сочетании со значительным потоком межпопуляционного обмена (за счет длительно распространяемых как планктон личинок, длительностью до 30 дней), которые могут сыграть преобладающую роль в дефиците гетерозигот.

Оценки вероятностей происхождения или индексов, полученные с помощью программы Structure, как и любые другие результаты моделирования, базируются на ряде допущений, описанных в Материалах и методах. Поэтому их интерпретация требует осторожности. Полученные в ходе этой работы результаты хорошо согласуются с данными предыдущих исследований (МакДональд и др., 1990; Скурихина и др., 2001; Kartavtsev et al., 2005) и оценками, полученными по двум ДНК-маркерам. В выборках 2011 года особи *M. galloprovincialis* присутствовали либо в пропорции 1 – 2% (б. Витязь, зал. Амурский), либо вообще отсутствовали (Уссурийский зал. и зал. Восток). Не наблюдались особи инвазивного вида и в выборках 2012 – 2013 годов, однако гибриды присутствовали (Таблица 3.3).

Таким образом, отвечая на заявленный в предыдущем параграфе вывод о возможном влиянии межвидового потока генов или генетической интрогрессии, стоит рассмотреть являются ли гибриды индикатором потока генов вообще. Существует два простых способа оценить межвидовой поток генов. Первый способ предполагает оценку числа мигрантов и подсчет Nm через F_{st} , используя данные из таблицы 3.6.

В одном случае для оценки Nm нужно вычислить разницу F'_{st} из частей таблицы В и С между двумя видами и конвертировать F_{st} в Nm , используя уравнение (Wright, 1987): $Nm = (1/F_{st}) - 1$. При данном расчете $Nm = (1 / (0,1330 - 0,0732)) - 1 = 15,7$. Если принять, что средняя продолжительность поколения мидий равна трем годам (Kartavtsev, Nikiforov, 1993), то, миграционный поток (число вселенцев) за поколение равно, примерно, $Nm = 5$.

Используя другой метод, который предполагает, что гибриды F_1 не являются индикаторами генетической интрогрессии (Avisе, Sunders, 1984; Campton, 1987; Kartavtsev, 2013), в отличие от гибридных особей следующих поколений (F_2 , F_3) или возвратных скрещиваний (F_b).

Таким образом, используя полученные данные (Приложение II), на основе которых построен рисунок 3.6, можно установить долю межвидовых мигрантов, $F_b + F_2$ и т.д. = $0,9 \pm 0,7\%$ (Приложение II, вторая колонка справа). О чем говорит подобная оценка генетической интрогрессии в сегодняшней ситуации с мидами на северо-западе Японского моря? Во-первых, стоит вспомнить о том, что F -статистика дает лишь косвенную оценку генетического дрейфа. Кроме того, полученная оценка имеет выборочное смещение, а также подвергается интралokusной и интерлокusной стохастической ошибке (Nei, 1978; 1987).

Для того чтобы свести это влияние к минимуму, базовое сравнение для F -статистики, которое мы использовали, было проведено для одинаково числа из 6 локусов (Таблица 3.5). Приведение к усредненному значению, особенно учитывая адаптированность статистики F'_{st} для межгрупповых сравнений (значение которой нормируется на число групп), также решает часть проблем, связанных с варьированием объема числа выборок в различные годы.

Представленные выше оценки N_m , являются приблизительными и не значимыми статистически, очевидно, это обусловлено небольшим размером выборок, как для D_m так и для F'_{st} (см. приложение II). Оценки $F_b + F_2$ основаны на наблюдаемой частоте гибридов и также имеют не высокий уровень статистической значимости (см. приложение III). Однако, если обе эти оценки дают схожие результаты, это может свидетельствовать в пользу того, что генетическая интрогрессия реально существует. К сожалению, как уже говорилось выше, сигнал, полученный по данным F'_{st} показывает слабое

различие между результатами в В и С наборах данных (Таблица 3.5): в тесте Стьюдента, $t = 1,658$, $d.f. = 817$, $0,05 < P < 0,1$. Частота для Fb+F2 не отличается от нуля, если включать 95% доверительный интервал полученной оценки: $0,9 \pm 1,4\%$ (см. приложение III). Таким образом, главным выводом по результатам этих сравнений является то, что необходимо в будущих работах увеличить размер выборки и сделать новые расчеты уровня генетической интрогрессии в исследуемом районе. И всё-таки, обобщая, можно говорить, что генетическая интрогрессия между двумя видами *Mytilus ex group edulis* в заливе Петра Великого и прилегающих районах все же происходит, что доказывается просто самим фактом присутствия особей группы Fb+F2. Хотя, безусловно, интрогрессия сохраняется на низком уровне, который варьирует из года в год, если судить по очевидному различию в числе обнаруженных гибридов в 2011 и 2012 – 2013 годах (см. приложения II – III) и по другим данным встречаемости гибридов, полученным в районе залива Восток за 14 лет: 2012 – 2013 гг. – 0% (данные этой работы), 2011 – 0% (данные этой работы), 2003 – $1,60 \pm 0,90\%$ (Kartavtsev et al., 2005) и 1999 – $8,95 \pm 1,68\%$ (Скурихина и др., 2001).

Объединенный генетический и морфометрический анализ

Для начала необходимо вспомнить самые важные морфометрические признаки среди тех, по которым лучше всего дискриминируются виды *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*. Это морфология лигамента (LP_L) и положение заднего ретрактора (LPR_L) (Kartavtsev et al., 2005). Все вышеуказанные значения являются индексами, но, в связи с корреляцией признаков и индексов, результаты верны и для самих признаков (LP, LPR). Хотя вариационные ряды ряда индексов могут отклоняться от нормального распределения, они являются унимодальными и хорошо анализируются использованными робастными многомерными статистиками, в ходе канонического, дискриминантного и факторного анализа. В частности, для данных 2012 – 2013 годов точность дискриминации, для набора из 11

индексов, 6 GBL локусов и 5 выборов, составила 77,6%, в то время как для набора из 10 признаков, 11 индексов, 4 локусов и 6 выборов – 78,7% (Рисунки 3.7 – 3.8).

Как отражено на рисунках, статистическая значимость, совершенно очевидно, высока в обоих случаях. Продолжив анализ и сгруппировав генотипы *Me-5*, удастся получить отчетливую дискриминацию фенотипа местного вида *M. trossulus* и гибридов *M. trossulus* × *M. galloprovincialis* (Рисунок 3.12).

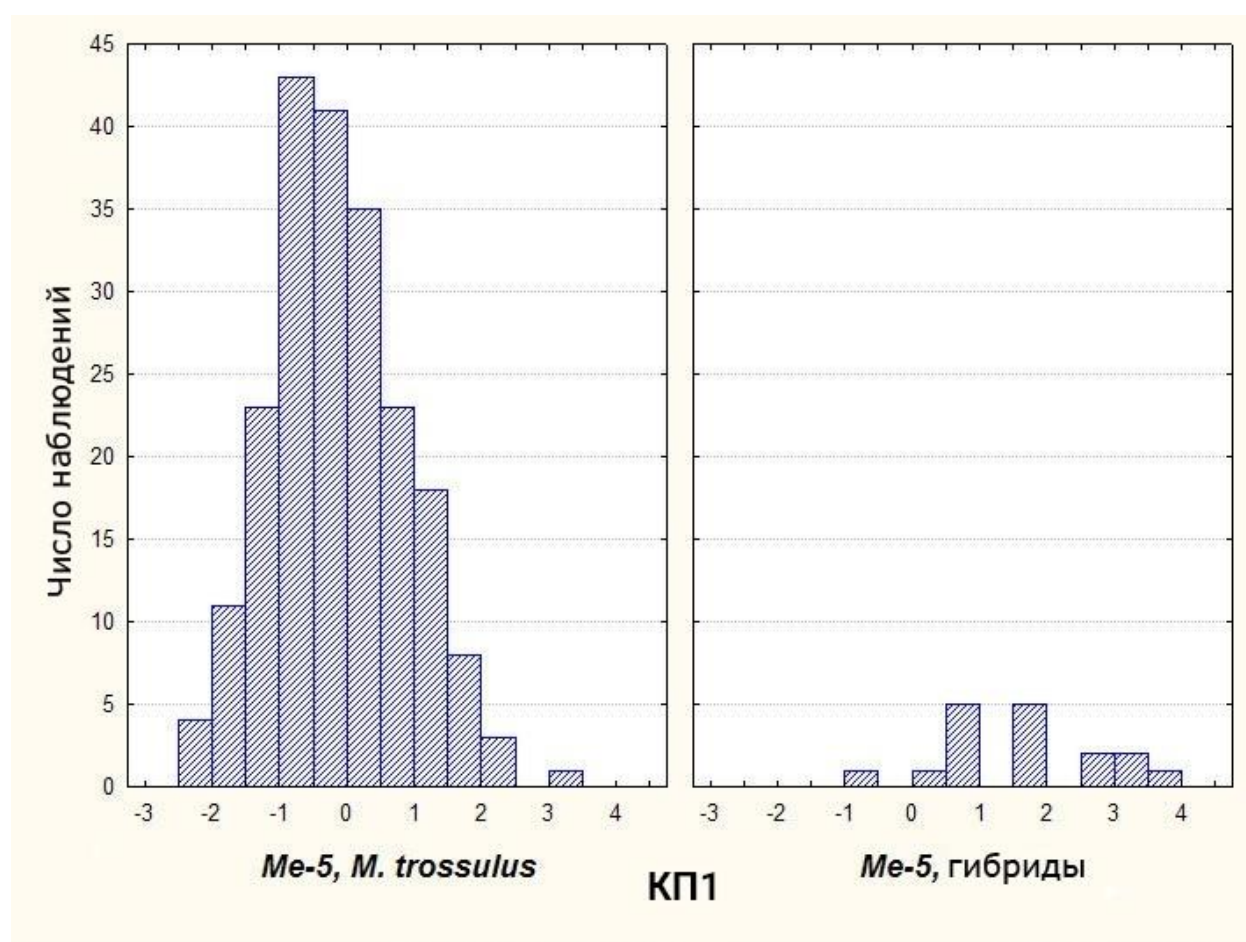


Рисунок 3.12. Дискриминантный анализ и классификация мидий комплекса *Mytilus* ex. group *edulis* по 11 морфометрическим признакам, 10 индексам и 6 аллозимным локусам.

Средняя точность дискриминации равна 93,8%. Статистическая значимость: $\lambda = 0,7362$, $F = 2,53$, d.f. = 28; 198, $P < 0,0001$.

Однако, проведенный многофакторный дисперсионный анализ (MANOVA) показал, что взаимодействие генотипа и переменной «популяция» не является значимым, Лямбда Уилкса (Wilks' lambda) составила: $\lambda = 0,52142$, $F = 0,9408$, d.f. = 54; 132, $P = 0.5922$). Так что, можно заключить, что генотип *Me-5* не влияет на генотип мидий напрямую. Аналогично, в этом анализе не рассчитывалось взаимодействие между генотипом и другими признаками, как это принято в генетике количественных признаков. В предыдущих исследованиях было отмечено, что индексы были более информативными для дискриминации видов (McDonald et al., 1991; Kepel, Ozolinsh, 1992). Однако, комбинированные наборы признаков и индексов в проведенном нами исследовании лучше подходят для дискриминации поселений (см. Рисунок 3.7).

Как уже было отмечено в начале параграфа, количественный анализ признаков LP, LP_L показал необходимость дополнительной оценки морфологической дискретности. Ранее считалось, что признак LP является полностью диагностическим (Золотарев, Шурова, 1997). К сожалению, ни LP, ни LP_L при более точном исследовании такими не оказались (Kartavtsev et al., 2005). Результаты, представленные ранее в текущей работе (Приложение IV; Рисунки 3.7 – 3.8) подтверждают этот вывод, хотя их значимость снижена из-за отсутствия инвазивного вида в выборках.

Проведенный анализ комбинированного набора признаков, также как и ранее, выявил необходимость дополнительных исследований. Однако, оба подхода доказали, что поселения мидий весьма схожи по своему генотипическому составу и что генетическая интрогрессия, несмотря на то, что продолжается, на данный момент практически не влияет на генофонд

местного вида *M. trossulus*. Это не означает, что мониторинг гибридной зоны более не нужен. Более того, он необходим, поскольку ситуация с инвазией постоянно меняется и уровень интрогрессии может увеличиться.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам молекулярно-филогенетического анализа генных деревьев ДНК-маркеров 28S рРНК, 18S рРНК и гистона H3 был решен ряд вопросов систематики митилид. Установлена монофилия семейства Mytilidae и подсемейства Mytilinae, что опровергает заключение о полифилетичности подсемейства Mytilinae Rafinesque, 1815. Также подтверждено выделение таксонов Modiolinae G. Termier & H. Termier, 1950 и Bathymodiolinae Kenk & Wilson 1985 в ранге подсемейств (Carter et. al. 2011; Bieler et. al., 2010) внутри семейства Mytilidae, так же, как и семейство Septiferidae Scarlato et Starobogotov, 1979b и подсемейство Septiferinae Scarlato et Starobogotov, 1979b.

На основании комплекса из восьми генетико-биохимических локусов, двух ДНК-маркеров, а также морфометрических признаков (11 признаков и 10 индексов), выявлено преобладание в поселениях мидий особей местного вида – *M. trossulus*. Особи вида-интродуцента *M. galloprovincialis* в отдельные годы, как например, в исследованном материале 2013 г., отсутствуют полностью. Однако в заливе Посъета, вблизи пос. Зарубино в зоне активного международного судоходства, в бухте Киевка и в бухте Лазурная в данный год выявлена довольно значительная доля гибридов (Fh): $24,2 \pm 8,0\%$, $14,6 \pm 5,1\%$ и $9,0 \pm 3,2\%$. Отталкиваясь от полученных данных можно сделать вывод о продолжении инвазии *M. galloprovincialis* в залив Петра Великого и сопредельные воды. Более того, обнаружено, что граница ареала *M. galloprovincialis* протекает севернее районов, документированных ранее в генетических исследованиях, достигая бухты Киевка.

На основе точной генотипической идентификации с использованием молекулярных маркеров в проведенном исследовании впервые доказано существование обособленных поселений инвазивного вида, расположенных в районе поселка Зарубино в зал. Посъета и в бухте Киевка. Несмотря на то, что точность дискриминации по комплексу GBL и морфометрических индексам составила: по 11 индексам и 6 аллозимным локусам для 5

поселений – 77,6%, а по 10 признакам, 11 индексам, 4 локусам для 6 поселений – 78,7%, мидии в проанализированных выборках слабо отличаются между собой. Помимо прочего, данное исследование подтвердило вывод о том, что признаки морфологии лигамента LP и LP_L, которые ранее считались полностью диагностическими для данной группы, не могут считаться таковыми.

ВЫВОДЫ

1. По результатам молекулярно-филогенетического анализа генных деревьев генов 28S рРНК, 18S рРНК и *H3* решен ряд вопросов систематики митилид, в частности, установлена монофилия семейства Mytilidae и подсемейства Mytilinae. Опровергнута полифилитичность подсемейства Mytilinae. Подтверждено также выделение таксонов в ранге подсемейства Modiolinae и Bathymodiolinae в составе семейства Mytilidae.

2. При исследовании комплекса *Mytilus* ex. group *edulis*, обнаружено, что в выборках преобладает местный вид *M. trossulus*, а инвазия *M. galloprovincialis* в заливе Петра Великого и сопредельных водах по данным за несколько лет сохраняется, хотя и на низком уровне. Кроме гибридов и местного вида *M. trossulus* впервые обнаружены поселения инвазивного вида *M. galloprovincialis* в районе пос. Зарубино в зал. Посъета и в бухте Киевка.

3. Проведенное исследование позволяет сделать вывод о мозаичном характере гибридной зоны мидий. Эта мозаичность обусловлена варьированием во времени расселения *M. galloprovincialis*, другими экологическими факторами и случайными инвазиями, вызванными судоходством.

4. Обнаружено, что граница ареала *M. galloprovincialis* протекает севернее районов, документированных ранее в генетических исследованиях, в б. Киевка. Выявлен новый очаг инвазии в б. Лазурная.

5. Выяснено что, мидии в проанализированных выборках слабо отличаются между собой по комплексу GBL и морфометрических индексов. Хотя точность дискриминации составила по 11 индексам и 6 аллозимным локусам для 5 поселений - 77,6%, а по 10 признакам, 11 индексам, 4 локусам для 6 поселений - 78,7%.

6. Результаты, полученные в данном исследовании, подтвердили вывод о

том, что признаки морфологии лигамента LP и LP_L, которые ранее считались полностью диагностическими для данной группы, не могут считаться таковыми.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. Москва: Академкнига. 2003. –431с.
2. Андреев В.Л. Классификационные построения в экологии и систематики. Москва: Наука. 1980. –142 с.
3. Архипова Е.А. Экология и гаметогенез тихоокеанской мидии в некоторых районах северо-западной Пацифики: автореф. дис. ...канд. биол. наук. Владивосток: ДВГУ. 1998. –24 с.
4. Брыков В.А., Семенихина О.Я., Колотухина Н.К. Выращивание мидии *Mytilus trossulus* в бухте Соколовская Японского моря // Биология моря. 1996. Т. 22, № 3. С. 195–202.
5. Брыков В.А., Семенихина О.Я., Колотухина Н.К., Радовец А.В. Культивирование тихоокеанской мидии в прибрежных водах северо-западной части Японского моря // Вопросы рыболовства. 2004. Т. 5, № 4. – 20 с.
6. Брэм А.Э. Жизнь животных. Т. 1. Беспозвоночные / Под ред. проф. Л.А. Зенкевича. - М.: Просвещение, 1968. –577 с.
7. Буяновский А.И. Особенности размножения и роста мидии *Mytilus edulis* L. юго-восточной Камчатки // Биология объектов марикультуры: экология и культивирование беспозвоночных и водорослей. М.: ИО АН СССР. 1987. С. 25–32.
8. Буяновский А.И., Куликова В.А. Распределение личинок мидии обыкновенной в планктоне и их оседание на коллекторы в заливе Восток Японского моря // Биология моря. 1984. № 6. С. 52–56.
9. Догель В.А. Зоология беспозвоночных. Москва: Высшая школа. 1981. – 606 с.

10. Золотарев В.Н. Склерохронология морских двустворчатых моллюсков// Киев: Наукова думка, 1989. –107 с.
11. Шурова Н.М., Золотарёв В.Н. Анализ фенотипической структуры поселений мидий *Mytilus galloprovincialis* Чёрного моря по окраске наружного призматического слоя их раковин // Морской экологический журнал. 2008. Т. 7, № 4. С. 88–97.
12. Золотарев В.Н., Шурова Н.М. О соотношении призматического и перламутрового слоев в раковинах мидий *Mytilus* // Биология моря . 1997. Т. 23 . С . 26–30
13. Иванов В.Н., Холодов В.И., Сеничева М.И., Пиркова А.В., Булатов К.В. Биология культивируемых мидий. Киев: Наукова думка. 1989. –100 с.
14. Картавцев Ю.Ф. Возможное определение сбалансированности полиморфизма локусов, кодирующих изоферменты //Биохимическая и популяционная генетика рыб/ под. ред. Кирпичникова В.С. Ленинград: Институт цитологии АН СССР. 1979. С. 36–40.
15. Картавцев Ю.Ф. Аллозимный полиморфизм у двух видов мидий // Генетика и размножение морских животных. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1981. С. 36–38.
16. Картавцев Ю.Ф. Молекулярная эволюция и популяционная генетика. Владивосток: Издательство Дальневосточного университета. 2009. –234 с.
17. Картавцев Ю.Ф., Католикова М.В., Шарина С.Н., Чичвархина О.В., Масалькова Н.А. Популяционно-генетическое исследование зоны гибридизации *Mytilus trossulus* Gould, 1850 и инвазивного вида *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Mytilidae) в заливе Петра Великого Японского моря // Биология моря. 2014. Т.40, № 3. С.220–228.

18. 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.
19. Картавец Ю.Ф., Соловьев А.А. Программный мини-комплекс SPECSTAT для статистической обработки данных по популяционной генетике // Генетика. 1992. Т. 28, № 3. С. 194–197.
20. Картавец Ю.Ф., Шарина С.Н., Чичвархин А.Ю., Чичвархина О.В., Масалькова Н.А., Лутаенко К.А., Оливейра К. Генетическая дивергенция мидий (Mollusca, Mytilidae) по нуклеотидным последовательностям ядерных генов 28S рРНК, 18S рРНК и H3 // Генетика. 2018. Т. 54, № 6. С. 639–660.
21. Кафанов А.И. Двустворчатые моллюски шельфов и континентального склона северной Пацифики: аннотированный указатель. Владивосток: ДВО РАН СССР. 1991. –199 с.
22. Кепель А.А., Озолинш А.В. Морфометрический анализ мидий рода *Mytilus* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) морей СССР // Зоологический журнал. 1992. Т. 71, № 9. С. 33–40.
23. Корочкин Л.И. Генетика изоферментов. Москва: Наука. 1977. –275 с.
24. Коэн Р.К., Пудовкин А.И. О видовой принадлежности съедобной мидии, обитающей в приазиатской части Тихого океана // Биология моря. 1988. № 5. С. 70–71.
25. Лакин Г.Ф. Биометрия. Москва: Высшая школа. 1980. –293 с.
26. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2009. – 256 с.
27. Лутаенко К.А., Колпаков Е.В. Расширение ареала инвазивной мидии *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) в Японском море // Бюллетень

- Дальневосточного малакологического общества. 2016. Т. 20, № 1. С. 57–76.
28. 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.
29. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: пер. с англ. Москва: Мир. 1984. – 480 с.
30. Масалькова Н.А., Картавец Ю.Ф., Чичвархина О.В. Генетический и морфометрический анализ поселений мидии (*Mytilidae: Mytilus* ex. gr. *edulis*) из вод Приморья: исследование дифференциации популяций в гибридной зоне // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2016. № 3. С.47–57.
31. Моисеев П.А. Морская аквакультура. Москва: Агропромиздат. 1985. – 253 с.
32. Монин В.Л., Моница О.Б., Хребтова Т.В. Личиночное развитие некоторых двустворчатых моллюсков Черного моря // VIII Всесоюзное совещание по изучению моллюсков: Тез. докл. Ленинград: Наука. 1987. С.353–355.
33. Омеляненко В.А., Куликова В.А., Погодин А.Г. Меропланктон Амурского залива (залив Петра Великого Японского моря) // Биология моря. 2004. Т. 30, № 3. С. 191–207.
34. Ошурков В.В., Буяновский А.И. Распределение и экология съедобной мидии на шельфе юго-восточной Камчатки // Биология моря. 1986. № 4. С. 21–29.

35. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Москва: Высшая школа. 1973. – 320 с.
36. Ростов И.Д. Залив Петра Великого. Физико-географические, гидрологические характеристики и гидрометеорологические условия [Электронный ресурс]. Владивосток. 2005.
http://www.pacificinfo.ru/data/cdrom/3html/1_00.html
37. Селин Н.И. Динамика поселений тихоокеанской мидии в южном Приморье // Биология моря. 1990. № 4. С. 68–69.
38. Селин Н.И., Лысенко В.Н. Размерный и возрастной состав скоплений и рост *Mytilus trossulus* (Bivalvia: Mytilidae) в сублиторали западной Камчатки // Биология моря. 2006. Т. 32, № 6. С. 421–427.
39. Скарлато О.А. Двустворчатые моллюски умеренных широт западной части Тихого Океана. Л.: Наука. 1981. – 479 с.
40. Скарлато О.А., Старобогатов А.И. Положение в системе и распространение мидий // Промысловые двустворчатые моллюски–мидии и их роль в экосистемах. Л.: Зоол. ин–т АН СССР. 1979. С. 106–111.
41. Скурихина Л.А., Картавцев 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, № 11. С.1556–1559.
42. 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 // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. 2008. № 4. С. 77–82.

43. Супрунович А.В., Макаров Ю.Н. Культивируемые беспозвоночные. Пищевые беспозвоночные: мидии, устрицы, гребешки, раки, креветки. Киев: Наукова думка. 1990. – 264 с.
44. Чичвархин А.Ю., Картавцев Ю.Ф., Кафанов А.И. Генетические связи между некоторыми видами *Mytilidae* (Mollusca, Bivalvia) северной части Тихого океана // Генетика. 2000. Т. 35, № 7. С. 1206–1220.
45. Шепель Н.А. Биологические основы культивирования съедобной мидии в южном Приморье // Биология моря. 1986. № 4. С. 14–21.
46. Шурова Н.М. Структурно-функциональная организация популяции мидий *Mytilus galloprovincialis* черного моря. Киев: Наукова думка. 2013. – 206 с.
47. Afifi A.A., S.P. Azen. Statistical analysis. A computer oriented approach. New York: Academic Press. 1979. – 366 p.
48. Alasaad S., Rossi L., Maione S., Sartore S., Soriguer R.C., Pèrez J.M., Rasero R., Zhu X.Q., Soglia D. HotSHOT Plus ThermalSHOCK, a new and efficient technique for preparation of PCR-quality mite genomic DNA // Parasitology Research. 2008. V.103. P.1455–1457.
49. Arnold M.L. Natural hybridization and evolution. Oxford, UK: Oxford University Press. 1997. – 232 p.
50. Arnold M.L., Fogarty N.D.. Reticulate evolution and marine organisms: the final frontier? // International Journal of Molecular Sciences. 2009. V.10. P. 3836–3860.
51. Avise J.C., Saunders N.C.. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): Analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers // Genetics. 1984. V. 108. P. 237–250.

52. Bayne B.L. Primary and secondary settlement in *Mytilus edulis* L. (Mollusca) // Journal of Animal Ecology. 1964. V.33. P. 513–523.
53. Bayne B.L. Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge: Cambridge University Press. 1976. –506 p.
54. Barton N.H., Hewitt G.M. Analysis of hybrid zones //Annual Review of Ecology and Systematics. 1985. V. 16. P. 113–148.
55. Bellocq J.G., Ferte H., Depaquit J., Justine J.L., Tillier A., Durette-Desset M.C. Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2001. V.19. P.430–442.
56. Bernard F.R. Catalogue of the living bivalvia of the Eastern Pacific Ocean: Bering Strait to Cape Horn (Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences). Canada: Department of Fisheries and Oceans. 1983. V.61. – 102 p.
57. Bieler R., Carter J.G., Coan E.V. Classification of bivalve families // Malacologia. 2010. V. 52, № 2. P. 113–133.
58. Borsa P., Daguin C., Caetano S. R., Bonhomme F. Nuclear-DNA evidence that northeastern Atlantic *Mytilus trossulus* mussels carry *M. edulis* genes // Journal of Molluscan Studies. 1999. V. 65, № 4. P. 504–507.
59. Boss K.J. How many species of mollusks are there? American Malacological Union, Annual Report. 1971. – 41 p.
60. Brannock P.M., Wetthey D.S., T.J. Hilbish. Extensive hybridization with minimal introgression in *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* in Hokkaido, Japan // Marine Ecology Progress Series. 2009. V. 383. P. 161–171.
61. Brooks S.J., Farmen E. The Distribution of the Mussel *Mytilus* Species Along the Norwegian Coast // Journal of Shellfish Research. 2013. V. 32, № 2. P. 265–270.

62. Campton D.E. Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and genetic interpretation // Population genetics and fisheries management. Seattle, WA: University of Washington Press. 1987. P. 161–192.
63. Carlton J.T. Introduced marine and estuarine mollusks of North America: an end of the 20th century perspective // Journal of Shellfish Research. 1992. V. 11, № 2. P. 489 –505.
64. Carter J.G., Altaba C.R., Anderson L.C., Araujo R. Paleontological Contributions. A Synoptical Classification of the Bivalvia (Mollusca) // Paleontological Contributions. Kansas: The University of Kansas, Paleontological Institute, 2011. V. 4. P. 1–47.
65. Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures // Evolution. 1967. V. 21, № 3. P. 550–570.
66. Ceccherelli V.U., Rossi R. Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Marine Ecology Progress Serie. 1984. V. 16, № 1. P. 173–184.
67. Chichvarkhin A.Y. Re: Phylogeny and taxonomy of marine mussels: comments on the paper by Distel (2000) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2002. V. 22. № 2. P. 330–332.
68. Coan E.V., Scott P.V., Bernard F.R. Bivalve Seashells of Western North America. Marine Bivalve Molluscs from Arctic Alaska to Baja California // Santa Barbara: Santa Barbara Museum of Natural History. 2000. P. 153–190.
69. Colgan D., Mclauchlan A., Wilson G.D.F., Livingston S.P., Edgecombe G.D., Macaranas J., Cassis G., Gray M.R. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution // Australian Journal of Zoology. 1998. V. 46. P. 419–437.

70. Coe W.R., Fox D.L. Biology of the California sea-mussel (*Mytilus californianus*). I. Influence of temperature, food supply, sex and age on the rate of growth // Journal of Experimental Zoology. 1942. V. 90, № 1. P. 1–30.
71. Distel D.L. Phylogenetic relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S RNA Data suggest convergence in mytilid body plans // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2000. V. 15, № 1. P. 25–33.
72. Eck R.V., Dayhoff M.O. Evolution of the structure of ferredoxin based on living relics of primitive amino acid sequences // Science. 1966. V. 152, № 3720. P. 363–366.
73. Felsenstein J. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading // Systematic Zoology. 1978. V. 27, № 4. P. 401–410.
74. Felsenstein J., Felsenstein J. Inferring phylogenies. Sunderland, MA: Sinauer associates. 2004. V. 2. –580 p.
75. Fox D.L., Coe W.R. Biology of the California sea-mussel (*Mytilus californianus*). II. Nutrition, metabolism, growth and calcium deposition //Journal of Experimental Zoology. 1943. V. 93, № 2. P. 205–249.
76. Gaffney P.M. et al. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis* // Genetics. 1990. V. 124, № 3. P. 687–699.
77. Gardner J.P.A. *Mytilus galloprovincialis* (Lmk)(Bivalvia, Mollusca): the taxonomic status of the Mediterranean mussel // Ophelia. 1992. V. 35, № 3. P. 219–243.
78. Gerber A.S., Tibbets C.A., Dowling T.E. The role of introgressive hybridization in the evolution of the Gila robusta complex (Teleostei: Cyprinidae) // Evolution. 2001. V. 55, № 10. P. 2028–2039.

79. Gilg M.R., Hilbish T.J. Spatio-temporal patterns in the genetic structure of recently settled blue mussels (*Mytilus* spp.) across a hybrid zone // Marine Biology. 2003. V. 143, № 4. P. 679–690.
80. Gosling E.M. Genetics of *Mytilus* // Gosling E. (Ed.) The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1992. Chap. 7. P. 309–382.
81. Habe T. Systematics of Mollusca in Japan. Bivalvia and Scaphopoda. Tokyo: Zukan no Hokuryukan. 1977. –372 p.
82. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. 1999. V. 41. P. 95–98.
83. Hall B. Phylogenetic trees made easy. A how-to manual for molecular biologists. Sunderland, MA: Sinauer associates. 2001. –179 p.
84. Harris H.C. Genetics of Man Enzyme polymorphisms in man // Proceedings of the Royal Society. London. 1966. V. 164, № 995. P. 298–310.
85. Heath D.D., Rawson P.D., Hilbish T.J. PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1995. V. 52, № 12. P. 2621–2627.
86. Higo S. Catalogue and bibliography of the marine shell-bearing Mollusca of Japan. Japan: Elle Scientific Publications. 1999. –750 p.
87. Hilbish T.J., Mullinax A., Dolven S.I., Meyer A., Koehn R.K., Rawson P.D. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration // Marine Biology. 2000. V. 136, № 1. P. 69–77.

88. Hilbish T.J., Brannock P.M., Jones K.R., Smith A.B., Bullock B.N., Wetthey 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 // *Journal of Biogeography*. 2010. V. 37, № 3. 423–431.
89. Hilbish T., Carson E., Plante J., Weaver L., Gilg M. Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England // *Marine Biology*. 2002. V. 140, № 1. P. 137–142.
90. Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K., Olmstead R.G. Molecular systematics. Sunderland, MA : Sinauer Associates. 1996. – 655 p.
91. Huber M. Compendium of bivalves. A full-color guide to 3,300 of the world's marine bivalves. A status on Bivalvia after 250 years of research. Hackenheim: ConchBooks. 2010. – 904 p.
92. Hummel H., Colucci F., Bogaards R.H., Strelkov P Genetic traits in the bivalve *Mytilus* from Europe, with an emphasis on Arctic populations // *Polar Biology*. 2001. V. 24, № 1. P. 44–52.
93. Inoue K., Waite J.H., Matsuoka M., Odo S., Harayama S. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus* // *Biological Bulletin*. 1995. V. 189, №. 3. P. 370–375.
94. Inoue K., Odo S., Noda T., Nakao S., Takeyama S., Yamaha E., Harayama S. A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers // *Marine Biology*. 1997. V. 128, № 1. P. 91–95.
95. Ivanova M.B., Lutaenko K.A. On the distribution of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia, Mytilidae) in Russian Far Eastern seas // *Bulletin of the Institute of Malacology*. Tokyo. 1998. V. 3, № 5. P. 67–71.

96. Kafanov A.I., Subfamily Mytilinae Rafinesque, 1815 (Bivalvia, Mytilidae) in the Cenozoic of the Northern Pacific // Fauna i raspredelenie mollyuskov: Severnaya Patsifika i Polyarnyi bassein (Fauna and Distribution of Mollusks: North Pacific and the Polar Basin) // Vladivostok: Dalnevostochnyi Nauchnyi Tsentr Akademii Nauk SSSR. 1987. P. 65 – 103.
97. Kafanov A.I., Drozdov A.L. Comparative sperm morphology and phylogenetic classification of recent Mytiloidea (Bivalvia) // Malacologia. 1998. V. 39. P. 129–140.
98. Kartavtsev Y.Ph. Sequence diversity at Cyt-b and Co-1 mtDNA genes in animal taxa proved neo-darwinism // Journal Phylogenetics and Evolutionary Biology. 2013. V.1, № 4. P.1 – 5.
99. Kartavtsev Y.Ph., Chichvarkhin A.Y., Kijima A., Hanzawa N., Park I.S.. Allozyme and morphometric analysis of two common mussel species of *Mytilus* genus (Mollusca, Mytilidae) in Korea, Japan and Russia waters // Korean Journal of Genetics. 2005. V. 27, № 4. P. 289 – 306.
100. Kartavtsev Y.P., Masalkova N.A., Katolikova M.V. Genetic and morphometric variability in settlements of two mussel species (*Mytilus* ex. gr. *Edulis*), *Mytilus trossulus* and *Mytilus galloprovincialis*, in the northwestern Sea of Japan // Journal of Shellfish Research. 2018. V. 37, № 1. P. 103–119.
101. Kartavtsev Y.P., Nikiforov S.M. Evaluation of the effective size of pacific mussel *Mytilus trossulus* populations from Peter the Great Bay Sea of Japan basing at allele frequency variability among allozyme loci // Genetica. 1993. V. 29, № 3. P. 476–489.
102. Kartavtsev Y.P., Zaslavskaya N.I. Allozyme polymorphism in a population of the common mussel *Mytilus edulis* (Mytilidae) from the Sea of Japan // Marine Biology Letters. 1983. V. 4, № 3. P. 163–172.

103. Kartavtsev Y.P., Jung S.O., Lee Y.M., Byeon H.K., Lee J.S. Complete mitochondrial genome of the bullhead torrent catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome description and phylogenetic considerations inferred from the Cyt b and 16S rRNA genes // *Gene*. 2007. V. 396, № 1. P. 13–27.
104. Koehn R.K., Milkman R., Mitton J.B. Population genetics of marine pelecypods. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis* // *Evolution*. 1976. V. 30, № 1. P. 2–32.
105. Koehn R.K., Hall J.G., Innes D.J., Zera A.J. Genetic differentiation of *Mytilus edulis* in eastern North America // *Marine Biology*. 1984. V. 79, № 2. P. 117–126.
106. Koehn R.K. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus* // *Aquaculture*. 1991. V. 94, № 2–3. P. 125–145.
107. Lewontin R.C., Hubby J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura* // *Genetics*. 1966. V. 54, № 2. P. 595–609.
108. Lutz R.A., Kennish M.J. Ecology of deep-sea hydrothermal vent communities: A review // *Reviews of Geophysics*. 1993. V. 31, № 3. P. 211–242.
109. McDonald J.H., Seed R., Koehn R.K. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres // *Marine Biology*. 1991. V. 111, № 3. P. 323–333.
110. McDonald J.H., Koehn R.K. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America // *Marine Biology*. 1988. V. 99, № 1. P. 111–118.

111. Moore D.R. The little bivalve *Planktomya* unmasked // *Anales del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín*. 1983. V. 13. P. 123–132.
112. Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations // *Annals of Human Genetics*. 1977. V. 41, № 2. P. 225 –233.
113. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*. 1978. V. 89, № 3. P. 583–590.
114. Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press. 1987. – 512 p.
115. Nei M., Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press. 2000. – 348 p.
116. Newell N.D. Classification of bivalvia // *Treatise on Invertebrate Paleontology*. 1969. V. 1. P. 205–224.
117. Newell C.R., Shumway S.E., Cucci T.L., Selvin R. The effects of natural seston particle size and type on feeding rates, feeding selectivity and food resource availability for the mussel *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 at bottom culture sites in Maine // *Journal of Shellfish Research*. 1989. V. 8, № 1. P. 187–196.
118. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. V. 155, № 2. P. 945–959.
119. Rawson P.D., Joyner K.L., Hilbish T.J. Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex // *Heredity*. 1996. V. 77, № 6. P. 599–607.
120. Rawson P.D., Agrawal 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 // *Marine Biology*. 1999. V. 134, № 1. P. 201–211.

121. Raymond M., Väätäntö R.L., Thomas F., Rousset F., de Meeüs T., Renaud F.
Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* species complex revisited
// Marine Ecology Progress Series. 1997. V. 156. P. 225–237.
122. Riginos C., Cunningham C.W.. Invited review: local adaptation and species
segregation in two mussel (*Mytilus edulis* × *Mytilus trossulus*) hybrid zones //
Molecular Ecology. 2005. V. 14, № 2. P. 381–400.
123. Roberts D.G., Gray C.A., West R.J., Ayre D.J.. Marine genetic swamping:
hybrids replace an obligately estuarine fish // Molecular Ecology. 2010. V. 19,
№ 3. P. 508–520.
124. Ronquist F., van der Mark P., Huelsenbeck J.P. Bayesian phylogenetic
analysis using MrBayes // The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to
Phylogenetic Analysis and Hypothesis testing. Cambridge: Cambridge
University Press. 2009. P. 210–236.
125. Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna
S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J. P.. MrBayes 3.2: efficient
Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space //
Systematic Biology. 2012. V. 61, № 3. P. 539–542.
126. Saavedra C., Stewart D.T., Stanwood R.R., Zouros E.. Species-specific
segregation of gender-associated mitochondrial DNA types in an area where
two mussel species (*M. edulis* and *M. trossulus*) hybridize // Genetics. 1996. V.
143, № 3. P. 1359–1367.
127. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for
reconstructing phylogenetic trees // Molecular Biology and Evolution. 1987. V.
4, № 4. P. 406–425.
128. Sarver S.K., Foltz D.W. Genetic population structure of a species' complex of
blue mussels (*Mytilus* spp.) // Marine Biology. 1993. V. 117, № 1. P. 105–112.

129. Seed R. Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis* // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 1968. V. 48, № 3. P. 561–584.
130. Seed R. Morphological variations in *Mytilus* from the Irish Coasts in relation to the occurrence and distribution of *M. galloprovincialis* Lmk // Cahiers de Biologie Marine. 1976. V. 15. P. 1–25.
131. Seed R. Systematics evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus*-an overview // American Malacological Bulletin. 1992. V. 9, № 2. P. 123–137.
132. Seed R., Suchanek T.H. Population and community ecology of *Mytilus* // The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. 1992. V. 25. P. 87–170.
133. Skibinski D.O.F., Ahmad M., Beardmore J.A. Genetic evidence for naturally occurring hybrids between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* // Evolution. 1978. V. 32, № 2. P. 354–364.
134. Skibinski D.O.F., Roderick E.E. Evidence of selective mortality in favour of the *Mytilus galloprovincialis* Lmk phenotype in British mussel populations // Biological Journal of the Linnean Society. 1991. V. 42, № 3. P. 351–366.
135. Śmietanka B., Burzyński A., Hummel H., Wenne R. Glacial history of the European marine mussels *Mytilus*, inferred from distribution of mitochondrial DNA lineages // Heredity. 2014. V. 113, № 3. P. 250–258.
136. Sneath A., Sokal R.R. Principles of numerical taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman and Company. 1963. –359 p.
137. Sonnenberg R., Nolte A.W., Tautz D. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification // Frontiers in Zoology. 2007. V. 4, № 6. P. 1–12.

138. Soot-Ryen T. A report on the family Mytilidae (Pelecypoda) // Report. Allan Hancock Pacific Expedition. 1955. V. 20, № 1. P. 1-174.
139. Soot-Ryen T. Superfamily Mytilacea Rafinesque, 1815. // C. R. Moore (ed.): Treatise on Invertebrate Paleontology. Geological Society of America Inc. // University of Kansas Press. 1969. P.271–280.
140. Kartavtsev Y.P., Soloviev A.A. SPECSTAT: PC software for statistical data analysis in the field of population genetics // Genetica. 1993. V. 88, № 1. P. 79–82.
141. Starobogatov Y.I. Morphological basis for phylogeny and classification of Bivalvia // Ruthenica. 1992. V. 2, № 1. P. 1–25.
142. StatSoft. Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com. 2001.
143. Swofford D.L. Phylogenetic inference // Molecular systematic. 1996. P 407–514.
144. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S.. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Molecular biology and evolution. 2013. V. 30, № 12. P. 2725–2729.
145. Toro J., Innes D.J., Thompson R.J. Genetic variation among life-history stages of mussels in a *Mytilus edulis* – *M. trossulus* hybrid zone // Marine Biology. 2004. V. 145, № 4. P. 713–725.
146. Tracey M.L., Bellet N.F., Gravem C.D. Excess allozyme homozygosity and breeding population structure in the mussel *Mytilus californianus* // Marine Biology. 1975. V. 32, № 3. P. 303–311.
147. Truett G.E. Preparation of genomic DNA from animal tissues / Kieleczawa J.. DNA sequencing II: optimizing preparation and cleanup. Jones and Bartlett, Sudbury. 2006. P. 33–46.

148. Väinölä R., Strelkov P. *Mytilus trossulus* in northern Europe // Marine Biology. 2011. V. 158, № 4. P. 817–833.
149. Yonge C. M., Thompson T. E. Living marine molluscs. London: Collins. 1976. –288 p.
150. Zbawicka M., Trucco M.I., Wenne R. Single nucleotide polymorphisms in native South American Atlantic coast populations of smooth shelled mussels: hybridization with invasive European *Mytilus galloprovincialis* // Genetics Selection Evolution. 2018. V. 50, № 1. Article number: 5.
151. Zbawicka M., Wenne R., Burzyński A. Mitogenomics of recombinant mitochondrial genomes of Baltic Sea *Mytilus* mussels // Molecular Genetic and Genomics. 2014. V. 289. P. 1275–1287.
152. Zouros E. Possible explanations of heterozygosity deficiency in bivalve molluscs // Malacologia. 1984. V. 25. P. 583–591.
153. Zouros E., Foltz D.W. The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis // Isozymes. 1987. V. 13. P. 1–59.
154. Zouros E. On the relation between heterozygosity and heterosis: an evaluation of the evidence from marine mollusks // Isozymes. 1987. V. 15. P. 255–270.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Таблица

Частота аллелей и основные результаты статистического анализа поселений мидий в заливе Петра Великого на основе данных 2012 – 2013 гг.

Выборка	Частота аллелей							Ho	Hs	Fis	N	X^2_{HW}
	1	2	3	4	5	6	7					
Лocus <i>PGM*</i> : $F_{st} = 0,088$, $F_{it} = 0,416$, $Ht = 0,756$, $\chi^2 = 19,16^{***}$ (<i>d.f.</i> =5), $G = 99,06^{***}$ (<i>d.f.</i> = 35)												
1. Зарубино	0,000	0,000	0,167	0,521	0,146	0,167	-	0,625	0,652	0,041	24	6,28
2. Лазурная	0,000	0,074	0,254	0,262	0,328	0,082	-	0,541	0,747	0,276	61	34,85**
3. Ливадия	0,000	0,065	0,059	0,494	0,324	0,059	-	0,412	0,640	0,357	85	52,27***
4. Восток МБС	0,009	0,071	0,259	0,464	0,170	0,027	-	0,464	0,683	0,320	56	33,18**
5. Киевка	0,042	0,063	0,000	0,458	0,167	0,271	-	0,417	0,683	0,390	24	-
6. Преображение	0,025	0,025	0,037	0,253	0,438	0,198	0,024	0,457	0,702	0,349	57	-

Таблица (Продолжение)

Локус AAT-1*: $F_{st} = 0,013$, $F_{it} = 0,183$, $Ht = 0,067$, $\chi^2 = 5,06$ (d.f.=4), $G = 7,28$ (d.f.=8)

[illegible]

Локус GPI*: $F_{st} = 0,083$, $F_{it} = 0,187$, $Ht = 0,752$, $\chi^2 = 24,38^{***}$ (d.f.=4), $G = 150,37^{***}$ (d.f.=20)

[illegible]

Таблица (Продолжение)

Локус ODH*: $F_{st} = 0,366$, $F_{it} = 0,714$, $Ht = 0,602$, $\chi^2 = 608,60^{***}$ ($d.f.=5$), $G = 813,142^{***}$ ($d.f.=35$)

1. Зарубино	0,021	0,042	0,875	0,000	0,042	0,021	0,000	0,167	0,230	0,275	24	-
2. Лазурная	0,008	0,008	0,787	0,008	0,164	0,000	0,025	0,246	0,353	0,304	61	-
3. Ливадия	0,006	0,024	0,835	0,006	0,059	0,012	0,059	0,235	0,295	0,201	85	30,90*
4. Восток МБС	0,009	0,027	0,813	0,000	0,098	0,036	0,018	0,161	0,328	0,510	56	-
5. Киевка	0,000	0,000	0,833	0,000	0,104	0,063	0,000	0,250	0,291	0,140	24	2,94
6. Преображение	0,012	0,000	0,037	0,006	0,827	0,074	0,043	0,099	0,307	0,678	81	-

Локус MPI *: $F_{st} = 0,044$, $F_{it} = 0,602$, $Ht = 0,098$, $\chi^2 = 40,41^{***}$ ($d.f.=5$), $G = 62,173^{***}$ ($d.f.=25$)

1. Зарубино	0,000	0,000	1,00	0,000	0,000	-	-	0,000	0,000	0,000	24	-
2. Лазурная	0,000	0,025	0,975	0,000	0,000	-	-	0,049	0,048	-0,025	61	0,04
3. Ливадия	0,000	0,024	0,924	0,035	0,018	-	-	0,106	0,145	0,270	85	-
4. Восток МБС	0,000	0,036	0,964	0,000	0,000	-	-	0,036	0,069	0,481	56	-
5. Киевка	0,021	0,000	0,979	0,000	0,000	-	-	0,042	0,041	-0,021	24	0,01
6. Преображение	0,025	0,000	0,049	0,840	0,086	-	-	0,025	0,285	0,913	81	-

Таблица (Продолжение)

Локус LAP*: $F_{st} = 0,057$, $F_{it} = 0,248$, $H_t = 0,667$, $\chi^2 = 52,71^{***}$ (d.f.=5), $G = 245,998^{***}$ (d.f.=30)

1. Зарубино	0,042	0,083	0,542	0,292	0,042	0,000	-	0,542	0,611	0,114	24	-
2. Лазурная	0,008	0,025	0,459	0,410	0,082	0,016	-	0,525	0,614	0,145	61	5,15
3. Ливадия	0,000	0,012	0,459	0,488	0,041	0,000	-	0,506	0,549	0,079	85	-
4. Восток МБС	0,009	0,018	0,446	0,429	0,080	0,018	-	0,464	0,610	0,239	56	-
5. Киевка	0,000	0,021	0,438	0,479	0,063	0,000	-	0,625	0,575	-0,088	24	1,87
6. Преображение	0,346	0,012	0,012	0,148	0,296	0,154	0,031	0,407	0,746	0,454	81	-

Примечание. χ^2_{HW} , значения хи-квадрата; **Ho and Hs**, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность; **Ht**, ожидаемая гетерозиготность в общем объеме; **N**, количество особей в выборке; **F_{is}**, отклонение между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью в выборке; **F_{it}**, отклонение наблюдаемой частоты генотипа от ожидаемой во всех выборках; **F_{st}**, стандартизированное расхождение частот аллелей; χ^2 и **G**, гетерогенность частот аллелей для преобладающих аллелей среди образцов и G критерий соотношения правдоподобия для гетерогенности частот аллелей среди образцов.

Значимость: * $P < 0,05$, ** $P < 0,025$, *** $P < 0,01$.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Таблица

Экспериментальные оценки доли генотипов двух видов мидий (*Mytilus* ex. group *edulis*) и гибридов в выборках 2011го года, основанные на наборе из 8 локусов и двух молекулярных маркерах *Me-5* и *ITS-1,2*

Поряд ковый номер	Выборки*	Количество особей в выборке	Количество особей с генотипом <i>M. trossulus</i> (частоты)	Количество особей с генотипом <i>M. gallopro- vincialis</i> (частоты)	Количество особей с гибридами : <i>Fh/Fb/F1</i>	Частота <i>Fh</i>	Частота, <i>Fb, F2</i> и т.д.	Частота, <i>F1</i>
1	Залив Восток (6 – 7)	19	19 (1)	0 (0)	0/1/0	0	0,0526	0
2	Залив Посьета, Зарубино (1)	87	40 (0,46)	23 (0,26)	24/1/17	0,2759	0,0115	0,1954
3	Залив Посьета, Витязь (2)	10	10 (1)	0 (0)	0/0/0	0	0	0
4	Залив Восток, Ливадия (5)	43	36 (0,84)	0 (0)	7/0/2	0,1628	0	0,0465

Таблица (Продолжение)

5	Бухта Киевка (8)	22	15(0,68)	5(0,23)	2/0/3	0,0909	0	0,1364
6	Уссурийский залив (4)	15	15 (1)	0 (0)	0/0/0	0	0	0
7	Амурский залив (3)	40	40 (1)	0 (0)	0/0/0	0	0	0
Среднее значение						0,0757	0,0092	0,0540
SE						0,0411	0,0074	0,0303

Примечание. *) В скобочках указаны номера выборок такими, какими они даны в таблице 3.2. Fh, гибриды, идентифицированные по значению гибридного индекса, полученного путем моделирования в Structure, для 6 GBL локусов и 2 молекулярных маркеров; Fb, беккроссы и/или гибриды следующего поколения обнаруженные при помощи молекулярных маркеров *Me-5* и *ITS-1,2* (по одному из локусов генотип гомозиготный, в то время как по другому гетерозиготный); F1, гибриды первого поколения (гетерозиготный генотип по обоим локусам).

ПРИЛОЖЕНИЕ III

Таблица

Дискриминантный анализ дифференциации среди видов мидий комплекса *Mytilus* ex. group *edulis* в северо-западном районе Японского моря (преимущественно поселения залива Петра Великого) на основе 11 морфометрических признаков, 10 индексов и 4 аллозимных локусов

Выборки	Точность классификации, %	1 p = 0,1702	2 p = 0,2675	3 p = 0,0729	4 p = 0,0760	5 p = 0,2614	6 p = 0,1520
Залив Восток, МБС (1)	71,4	40	5	0	0	11	0
Залив Восток, Ливадия (2)	76,1	6	67	5	5	5	0
Залив Посьета, Зарубино (3)	54,1	2	6	13	0	3	0
Бухта Киевка (4)	36,0	5	10	0	9	1	0
Амурский залив (5)	94,2	1	1	0	0	81	3
Бухта Преображение (6)	98,0	0	0	0	0	1	49
Итого	78,7	54	89	18	14	102	52

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Таблица

Дискриминантный анализ шести поселений мидий *Mytilus* ex. group *edulis* в заливе Петра Великого и прилегающих водах на основе 11 морфометрических признаков, 10 индексов и 4 аллозимных локусов

А.

Порядковый номер	Переменные	Корни				
		Корень 1	Корень 2	Корень 3	Корень 4	Корень 5
1	LENGTH	1,86006	-0,48364	-0,90838	0,598925	-0,48536
2	HEIGHT	-1,64031	-0,32906	0,47923	-0,764615	-2,11720
3	LIG_LN	-0,17350	1,37559	-0,51378	1,620648	1,66400
4	PERL_L	0,71434	0,88721	-0,30888	0,140240	-0,73415
5	LIG_T	-0,06467	-0,33885	0,29072	0,427446	0,67746
6	DENT_PL	-0,03971	1,48415	0,24816	-0,816635	0,34997
7	ADR_FR	-0,56372	0,18311	1,49679	-0,637634	0,01920
8	BAC_RT	0,90929	-0,84223	-0,21040	-0,466828	-0,11210
9	SINUS	-0,30697	-0,29724	1,11178	-0,166930	1,06364
10	ADR_BAC	0,46309	0,16659	0,45793	-0,315429	0,89499
11	RETR_MN	-0,38268	-0,44473	-0,54676	0,443879	-0,00776
12	PGM	-0,14234	0,18768	-0,07146	0,008200	-0,48879
13	ODH	0,81853	-0,36145	-0,02151	-0,102188	0,00817
14	MPI	0,12782	-0,28704	-0,18282	-0,055083	0,00586
15	LAP	0,08743	0,02826	-0,01203	0,110496	0,09629

Таблица (Продолжение)

16	IND1	0,10772	0,34830	0,62350	-0,430789	0,33298
17	IND2	-0,46209	-0,39207	-0,42275	0,128360	-0,72932
18	IND3	0,11726	0,17990	-0,57963	0,126936	-1,03972
19	IND4	-0,45134	0,47113	0,20715	0,460633	0,34239
20	IND5	0,32618	-0,41499	-1,32997	0,946743	0,02931
21	IND6	0,09558	-1,40825	-0,29066	1,211171	-0,42920
22	IND7	0,13066	0,49311	-0,31474	-0,783318	-0,75064
23	IND8	-0,76564	-0,71061	-0,00989	-0,182488	1,19206
24	IND9	0,04745	-0,44200	0,26911	-0,389742	-0,82060
25	IND10	0,51618	-0,13345	0,40035	0,306588	0,80103
Собственное значение		4,65781	1,08179	0,54298	0,397684	0,17200
Кумулятивная пропорция		0,67975	0,83762	0,91686	0,974899	1,00000

В.

Поряд ковый номер	Переменные	Резюме дискриминантного анализа					
		Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (5.299)	P-level	Допустимое отклонение	R ²
1	LENGTH	0,034559	0,971981	1,72382	0,128897	0,008248	0,991752
2	HEIGHT	0,034767	0,966163	2,09432	0,066060	0,010653	0,989347
3	LIG_LN	0,034695	0,968160	1,96668	0,083461	0,014122	0,985878
4	PERL_L	0,035572	0,944287	3,52821	0,004091	0,058807	0,941193
5	LIG_T	0,034004	0,987845	0,73580	0,597109	0,057283	0,942717
6	DENT_PL	0,035255	0,952794	2,96277	0,012568	0,034323	0,965677

Таблица (Продолжение)

7	ADR_FR	0,035119	0,956471	2,72149	0,020121	0,036790	0,963210
8	BAC_RT	0,034381	0,976998	1,40794	0,221172	0,020379	0,979621
9	SINUS	0,034232	0,981272	1,14129	0,338511	0,025570	0,974430
10	ADR_BAC	0,034120	0,984495	0,94181	0,454131	0,037760	0,962240
11	RETR_MN	0,034302	0,979254	1,26689	0,278148	0,053940	0,946060
12	PGM	0,035873	0,936381	4,06287	0,001391	0,885278	0,114722
13	ODH	0,077013	0,436169	77,30296	0,000000	0,905609	0,094391
14	MPI	0,035769	0,939109	3,87739	0,002025	0,883823	0,116177
15	LAP	0,033934	0,989879	0,61145	0,691206	0,872982	0,127019
16	IND1	0,034513	0,973266	1,64259	0,148547	0,096002	0,903998
17	IND2	0,034185	0,982617	1,05787	0,383902	0,043315	0,956685
18	IND3	0,034161	0,983293	1,01604	0,408274	0,053962	0,946038
19	IND4	0,034376	0,977141	1,39898	0,224471	0,060841	0,939159
20	IND5	0,035469	0,947035	3,34442	0,005907	0,050218	0,949782
21	IND6	0,036307	0,925176	4,83635	0,000287	0,049480	0,950520
22	IND7	0,034550	0,972243	1,70724	0,132705	0,064170	0,935830
23	IND8	0,035895	0,935789	4,10327	0,001282	0,066674	0,933326
24	IND9	0,034225	0,981463	1,12944	0,344701	0,068426	0,931574
25	IND10	0,034444	0,975219	1,51954	0,183461	0,061049	0,938951

Примечание. Расшифровки аббревиатур даны в Материалах и методах.

Статистическая значимость: Лямбда Уилкса (λ) = 0,03359, $F = 11,73$, d.f. = 125; 1476, $P < 0,0001$. F-исключения находится на критическом уровне для выбора при исключении/включении переменной в модель при пошаговом дискриминантном анализе.