

**Аллозимный анализ морских блюдечек рода
Nipponacmea (Patellogastropoda: Lottiidae)
из прибрежных вод южного Приморья
и Республики Корея**

Н.И. Заславская, Л.А. Соболева, А.В. Чернышёв

*Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия*

e-mail: nad_zas@mail.ru

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690600, Россия

Проведено сравнение 4 видов морских блюдечек рода *Nipponacmea* (Patellogastropoda: Lottiidae) из прибрежных вод южного Приморья и Республики Корея с использованием 19 аллозимных локусов в качестве генных маркеров. Показано, что в Желтом море встречается вид, считавшийся ранее условным эндемиком Японского моря – *Nipponacmea moskalevi*. Об этом свидетельствуют как морфологическое сходство, так и достаточно высокое (0.891) значение генетического сходства между выборками данного вида из прибрежных вод Приморья и из Желтого моря.

**Allozyme analysis of limpets of the genus
Nipponacmea (Patellogastropoda: Lottiidae)
from coastal waters of southern Primorye
and the Republic of Korea**

N.I. Zaslavskaya, L.A. Soboleva, A.V. Chernyshev

*A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far East Branch,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

e-mail: nad_zas@mail.ru

Far Eastern Federal University, Vladivostok 690600, Russia

Four *Nipponacmea* species (Patellogastropoda: Lottiidae) from coastal waters of southern Primorye Region (north-western Sea of Japan) and the Republic of Korea were compared using 19 allozyme loci. *Nipponacmea moskalevi* Chernyshev et Chernova, 2002, probable endemic of the Sea of Japan, was found in the Yellow Sea (near Daechon) for the first time. Both morphology and high genetic similarity ($I=0.891$) between limpets from the Yellow Sea and southern Primorye confirm this fact.

Nipponacmea Sasaki et Okutani, 2002; Чернышёв, 2008; Sasaki, Okutani, 1993 – приазиатский тихоокеанский род морских блюдечек семейства Lottiidae Gray, 1840, объединяющий 11 описанных видов [Чернышёв, Чернова, 1993, 1994]. До ревизии, проведенной Сасаки и Окутани [Sasaki, Okutani, 1993], виды рода рассматривались в составе сборного рода *Notoacmea*

Iredale, 1915, хотя и морфологически, и генетически близки к представителям другого сборного рода – *Lottia* Gray, 1833. Ниппонакмеи образуют довольно мономорфную группу, монофилия которой подтверждена данными молекулярно-генетического анализа [Nakano, Ozawa, 2007]. Большинство видов рода длительное время рассматривались как подвиды или вариететы *Notoacmea concinna* (Lischke, 1870) и *Notoacmea schrenckii* (Lischke, 1868). Сасаки и Окутани [Sasaki, Okutani, 1993] сочли, что отличительные признаки между этими «подвидами» (форма гранул на раковине, окраска ноги и головы, длина радулярного мешка, окраска яичников) достаточны для повышения их ранга до видового. Следует отметить, что до их работы такие признаки, как пигментация головы и ноги, длина и форма радулярного мешка, окраска гонад, никогда не использовались в систематике морских блюдечек, поэтому лишь молекулярно-генетические исследования [Nakano, Ozawa, 2007; Sasaki, Nakano, 2007] убедили малакологов в том, что речь действительно идет о самостоятельных видах. В этом плане весьма интересным представляется аллозимный анализ ниппонакмей, который позволяет установить степень генетических различий между явно близкородственными видами.

Метод электрофореза белков используется в таксономических и популяционных исследованиях морских блюдечек с начала 1980-х гг. При помощи этого метода удалось проанализировать генетическую изменчивость белков у симпатрических популяций *Patella aspera* (Röding, 1798) и *Patella coerulea* Linnaeus, 1758 [Badino, Sella,

1980]. Форма раковины у этих видов довольно схожа, что является причиной трудностей в их разделении. Анализ аллельных вариантов фосфоглюкозоизомеразы (PGI) помог различить их. Более позднее исследование по 10 аллозимным локусам подтвердило эти данные [Sella et al., 1993]. На основании анализа 7 аллозимных локусов было показано, что различия литоральной и сублиторальной *Nacella concinna* (Strebel, 1908), отличающиеся друг от друга по морфологии раковины, статистически незначительны. И это предполагает, что различия в форме раковины – результат экологической фенотипической пластичности [Beaumont, Wei, 1991]. Морфологический анализ радулы и ультраструктуры сперматозоидов не выявил различий между 8 популяциями *Patella barbara* Linnaeus, 1758, отличающихся по структуре и окраске раковины, а также по месту обитания. Анализ 17 аллозимных локусов также показал высокое значение генетического сходства, на основании которого был сделан вывод о конспецифичности этих популяций [Ridgway, 1999].

Использование 19 аллозимных локусов помогло в описании филогенетических отношений между *Patella ferruginea* Gmelin, 1791, *P. caerulea*, *Patella rustica* Linnaeus, 1758 и *Patella ulyssiponensis* Gmelin, 1791, что не смогли дать данные по морфологии мягких тканей [Cretella, Scillitani, 1994]. Было показано, что *P. rustica* ближе к *P. ferruginea*, тогда как *P. caerulea* и *P. ulyssiponensis* кластеризуются отдельно.

Электрофорез белков оказался эффективен для разграничения видов, принадлежащих комплексу «*Patella miniata*» (*Patella miniata miniata*

Born, 1778, *P. miniata sanguinans* Reeve, 1854 и *Patella compressa* Linnaeus, 1758), которые плохо различались по морфологическим данным. Анализ 16 аллозимных локусов показал, что комплекс «*Patella miniata*» образует монофилетичную группу из трех близких видов [Ridgway et al., 2000]. В другой работе [Sá-Pinto et al., 2007] тем же методами была показана видовая самостоятельность четырех видов *Patella* Linnaeus, 1758 из прибрежных

вод Европы. Электрофорез ферментов успешно использовался для выявления видов-двойников из рода *Lottia* – *Lottia digitalis* (Rathke, 1833) и *Lottia austrodigitalis* (Murphy, 1978) [Crummett, Eernisse, 2007].

Целью настоящей работы является выяснение генетических связей между представителями рода *Nipponacmea* из прибрежных вод южного Приморья и Республики Корея с использованием аллозимов в качестве маркеров генов.

Материал и методы

Материалом для настоящей работы послужили 76 особей морских блюдечек из рода *Nipponacmea*, собранные осенью 2008 г. на литорали Приморья и Южной Кореи (табл. 1). В Приморье были собраны блюдечки, относящиеся к виду *Nipponacmea moskalevi* Chernyshev et Chernova, 2002, в трех заливах – Амурском, Уссурийском и Восток.

Среди блюдечек, собранных в Корее, оказались моллюски 4 видов: *N. schrenckii*, *Nipponacmea teramachii* (Kira, 1961), *Nipponacmea radula* (Kira,

1961) и моллюски, похожие по морфологическим данным на вид, обитающий в Приморье, который мы обозначили, как *N. cf. moskalevi*. Материал по этим видам хранится в Зоологическом музее ДВФУ и Музее Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Детали крахмально-гелевого электрофореза описаны нами ранее (Заславская, 1989). Все виды были исследованы по 19 аллозимным локусам, которые кодировали 16 ферментов (табл. 2). Для разделения ферментов использовали 3 буферные системы:

Таблица 1

Места сбора моллюсков и количество изученного материала

Table 1

Sampling sites of limpets and number of studied specimens

Вид	Количество экземпляров	Место сбора
<i>Nipponacmea moskalevi</i>	46	Заливы Восток, Амурский, Уссурийский
<i>Nipponacmea cf. moskalevi</i>	7	Южная Корея, Желтое море (около г. Дэчён (Daecheon))
<i>Nipponacmea schrenckii</i>	10	Южная Корея, о-в Чеджудо
<i>Nipponacmea teramachii</i>	11	Южная Корея, о-в Чеджудо
<i>Nipponacmea radula</i>	2	Южная Корея, о-в Чеджудо

Таблица 2

Исследованные ферменты, соответствующие им локусы и буферные системы,
использованные для их разделения

Table 2

Studied enzymes, corresponding gene loci and buffer systems used for separation

Фермент	Е.С.	Локус	Буферная система
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	1.1.1.44	<i>6-Pgd</i>	III
α -глицерофотфатдегидрогеназа	1.2.1.12	<i>α-Gpd</i>	II
Аргининфосфаткиназа	2.7.3.3	<i>Argpk</i>	I
Глутаматоксалоацетаттрансаминаза	2.6.1.1	<i>Got-1</i>	I
Глутаматпируваттрансаминаза	2.6.1.2	<i>Gpt</i>	II
Глюкозофосфатизомераза	5.3.1.9	<i>Gpi</i>	II
Глутатионредуктаза	1.6.4.2	<i>Gr</i>	II
Лейцинаминопептидаза	3.4.11.1	<i>Lap</i>	III
Малатдегидрогеназа	1.1.1.37	<i>Mdh-1</i> <i>Mdh-2</i>	III
Маннозофосфатизомераза	5.3.1.8	<i>Mpi</i>	II
Малик энзим	1.1.1.40	<i>Me-1</i>	II
Неорганическая пирофосфатаза	3.6.1.1	<i>Ipp</i>	II
Пептидаза	3.4.*.*	<i>Pep-1</i> <i>Pep-2</i>	I
Сорбитолдегидрогеназа	1.1.1.14	<i>Sdh</i>	II
Супероксиддисмутаза	1.15.1.1	<i>Sod</i>	I
Фосфоглюкомутаза	2.7.5.1	<i>Pgm-1</i> <i>Pgm-2</i>	II
Эстераза	3.1.1.1	<i>Est-1</i> <i>Est-2</i>	I

Примечание. Е.С. – номер фермента по международной системе классификаций; обозначения буферных систем как в тексте; «**» – для выявления пептидаз в качестве субстрата использовали смесь дипептидов.

Note. E.C. – ferment number according to international classification; designations as in the text; «**» – for detection of peptodases, a mixture of dipeptides was used.

1) исходный буфер: 0.9 М трис, 0.5 М H_3BO_3 , 0.02 М ЭДТА, 0.02 М $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, рН 8.6; исходный буфер для анодного отсека разбавляли в 7 раз, для катодного – в 5 раз и для геля – в 20 раз; 2) электродный буфер: 0.1 М трис, 0.02 М малеиновая кислота, 0.01 М ЭДТА, 0.01 М MgCl_2 , рН 7.4; гелевый буфер: электродный, разбавленный в 10 раз; 3) электродный буфер: 0.155 М трис, 0.045 М лимонная кислота, рН 7.0; гелевый буфер: электродный, разведенный в 10 раз.

Для оценки значимости различий между наблюдаемыми и ожидаемыми численностями генотипов использовали стандартный χ^2 -критерий [Животовский, 1991]. В том случае, когда нельзя было использовать обычный χ^2 -тест из-за низких ожидаемых частот генотипов, применялся псевдовероятностный тест [Hernandez, Weir, 1989]. Расчеты велись при помощи программы СННВ [Zaykin, Pudovkin, 1993]. Для оценки статистической значимости различий аллельных частот между выборками использовали χ^2 -тест на гетерогенность [Животовский, 1991].

При проверке соответствия распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга и оценке существенности гетерогенности по аллельным частотам проводится множество отдельных

тестов, и получается, соответственно, много показателей. Поэтому, чтобы избежать ошибки первого рода, проводилась поправка на множественность сравнений по формуле Шидака [Sokal, Rohlf, 1981, p. 728; Rohlf, Sokal, 1981, p. 101], при этом использовали программу MULTEST [Зайкин, Пудовкин, 1991].

Для оценки степени генетического сходства между выборками рассчитывали коэффициент генетического сходства и стандартное генетическое расстояние [Nei, 1978], на основе которых строили фенограммы невзвешенным парногрупповым методом кластеризации. Для расчета стандартного генетического расстояния, построения фенограммы использовали статистические пакеты BIOSYS [Swofford, Selander, 1981] и NTSYS [Rohlf, 1988].

Результаты

Частоты аллелей для всех исследованных выборок приведены в табл. 3. У большинства видов по большинству локусов, где это возможно было посчитать, наблюдалось соответствие наблюдаемых частот ожидаемым из уравнения Харди–Вайнберга. Статистически существенное несоответствие ($p < 0.05$) выявлено лишь у *N. schrenckii* (локус *Est-1*) и *N. teramachii* (локус *Ipp*), которое выражалось в дефиците гетерозигот. Поскольку размер выборок этих видов был небольшим, то требуется дополнительное исследование, чтобы выяснить причины выявленного дефицита гетерозигот.

При сравнении частот аллелей между выборками моллюсков рода *Nipponacmea* из прибрежных вод Приморья выявлены статистически значи-

мые различия лишь по одному локусу *Lap* ($p = 0.00006$). По остальным локусам различия статистически несущественны ($p > 0.1$); суммарное значение (с учетом локуса *Lap*) $\chi^2 = 115.850$ (d.f.=68, $p = 0.00027$).

При оценке статистической значимости различий выборок *N. moskalevi* из зал. Петра Великого с выборкой *N. cf. moskalevi* из прибрежных вод Кореи оказалось, что существенными были различия по 8 из 14 полиморфных локусов. Таким образом, степень дифференциации между моллюсками из Желтого моря и зал. Петра Великого значительно выше. Однако, показатель генетического сходства между объединенной выборкой *N. moskalevi* из прибрежных вод Приморья и *N. cf. moskalevi* из прибрежных вод Кореи достаточно высок ($I = 0.891$) (табл. 4).

Таблица 3

Частоты аллелей 19 локусов в выборках *Nipponacmea*

Table 3

Allele frequencies of 19 loci in samples of *Nipponacmea*

Локус	Выборки						
	<i>N. moskalevi</i> (залив Восток)	<i>N. moskalevi</i> (Уссурийский залив)	<i>N. moskalevi</i> (Амурский залив)	<i>N. schrenckii</i>	<i>N. teramachii</i>	<i>N. cf moskalevi</i>	<i>N. radula</i>
<i>Gpi</i>							
(N)	7	19	20	10	12	7	2
A	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000
D	0.000	0.026	0.000	0.250	0.000	0.000	0.000
E	0.286	0.158	0.175	0.000	0.125	0.071	0.000
F	0.000	0.000	0.000	0.100	0.791	0.000	0.000
G	0.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.143	0.000
H	0.714	0.789	0.800	0.000	0.000	0.786	0.000
I	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000
J	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	1.000
<i>Sod</i>							
(N)	7	19	20	10	12	7	2
A	0.071	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.729	1.000	0.975	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Me</i>							
(N)	4	5	8	7	8	5	2
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
B	0.000	0.000	0.063	0.357	0.437	0.400	0.000
C	1.000	1.000	0.937	0.643	0.563	0.600	0.000
<i>Sdh</i>							
(N)	4	5	8	7	8	5	2
A	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.500
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500
C	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
<i>Mpi</i>							
(N)	4	5	8	7	8	5	2
A	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.625	0.000	0.250
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.375	0.000	0.250
D	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500

Таблица 3 (продолжение)

Локус	Выборки						
	<i>N. moskalevi</i> (залив Восток)	<i>N. moskalevi</i> (Уссурийский залив)	<i>N. moskalevi</i> (Амурский залив)	<i>N. schrenckii</i>	<i>N. teramachii</i>	<i>N. cf moskalevi</i>	<i>N. radula</i>
<i>Arpk</i>							
(N)	7	19	19	10	12	7	2
A	0.143	0.026	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000
C	0.857	0.947	0.895	0.000	0.000	1.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	1.000
E	0.000	0.000	0.000	0.700	0.583	0.000	0.000
F	0.000	0.026	0.053	0.300	0.292	0.000	0.000
<i>Gr</i>							
(N)	7	15	12	10	12	7	2
A	0.000	0.000	0.000	1.000	0.333	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.417	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
G	1.000	1.000	0.917	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>a-Gpd</i>							
(N)	4	6	8	7	8	5	2
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000
C	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	1.000	0.625	0.000	0.000
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
<i>Est-1</i>							
(N)	7	19	20	10	12	7	2
A	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500
F	0.000	0.000	0.000	0.200	0.250	0.286	0.250
G	1.000	1.000	1.000	0.150	0.000	0.643	0.000
H	0.000	0.000	0.000	0.200	0.250	0.000	0.250
I	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000
J	0.000	0.000	0.000	0.100	0.458	0.000	0.000

Таблица 3 (продолжение)

Локус	Выборки						
	<i>N. moskalevi</i> (залив Восток)	<i>N. moskalevi</i> (Уссурийский залив)	<i>N. moskalevi</i> (Амурский залив)	<i>N. schrenckii</i>	<i>N. teramachii</i>	<i>N. cf moskalevi</i>	<i>N. radula</i>
<i>Ipp</i>							
(N)	7	17	20	10	12	7	2
A	0.000	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000
D	0.214	0.000	0.025	0.500	0.000	0.000	0.000
E	0.000	0.000	0.000	0.200	0.333	0.143	0.000
F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.292	0.000	0.000
G	0.000	0.000	0.025	0.050	0.124	0.000	0.000
H	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.000	0.500
I	0.357	0.353	0.325	0.000	0.042	0.000	0.500
J	0.000	0.118	0.100	0.000	0.000	0.143	0.000
K	0.286	0.441	0.350	0.000	0.042	0.643	0.000
L	0.000	0.000	0.150	0.000	0.000	0.071	0.000
M	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
N	0.143	0.029	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Est-2</i>							
(N)	7	19	20	5	7	7	2
A	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.500
C	0.000	0.000	0.000	0.200	0.715	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000
E	0.000	0.000	0.000	0.800	0.143	0.000	0.500
<i>Pgm-1</i>							
(N)	6	17	19	10	12	7	2
A	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
C	0.000	0.029	0.000	0.200	0.000	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.200	0.000	0.000	0.000
E	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000
F	1.000	0.971	1.000	0.200	0.000	0.786	0.000
G	0.000	0.000	0.000	0.300	0.000	0.214	0.000

Таблица 3 (продолжение)

Локус	Выборки						
	<i>N. moskalevi</i> (залив Восток)	<i>N. moskalevi</i> (Уссурийский залив)	<i>N. moskalevi</i> (Амурский залив)	<i>N. schrenckii</i>	<i>N. teramachii</i>	<i>N. cf moskalevi</i>	<i>N. radula</i>
<i>Pgm-2</i>							
(N)	6	17	19	10	12	7	2
A	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500
C	0.000	0.000	0.000	0.200	0.000	0.000	0.500
D	0.000	0.000	0.000	0.300	0.000	0.000	0.000
E	0.917	1.000	0.974	0.200	0.000	1.000	0.000
F	0.000	0.000	0.000	0.300	0.000	0.000	0.000
G	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Got</i>							
(N)	7	19	20	10	11	7	2
A	0.214	0.026	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.026	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.600	0.000	0.000	0.000
E	0.786	0.947	0.825	0.400	0.955	0.857	0.000
F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
G	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.143	0.000
<i>Gpt</i>							
(N)	7	14	20	10	12	7	2
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.143	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.071	0.000
D	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000
E	0.714	0.821	0.825	0.950	0.000	0.786	0.000
F	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000
G	0.286	0.143	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000
H	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000
I	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 3 (окончание)

Локус	Выборки						
	<i>N. moskalevi</i> (залив Восток)	<i>N. moskalevi</i> (Уссурийский залив)	<i>N. moskalevi</i> (Амурский залив)	<i>N. schrenckii</i>	<i>N. teramachii</i>	<i>N. cf moskalevi</i>	<i>N. radula</i>
<i>Lap</i>							
(N)	7	19	20	10	11	7	2
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.092	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.136	0.000	0.000
D	0.000	0.026	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000
E	0.286	0.026	0.075	0.000	0.092	0.143	0.000
F	0.071	0.000	0.025	0.000	0.227	0.000	0.000
G	0.000	0.526	0.525	0.100	0.091	0.000	0.000
H	0.357	0.106	0.000	0.000	0.182	0.357	0.000
I	0.000	0.263	0.150	0.350	0.045	0.000	0.500
J	0.071	0.053	0.025	0.150	0.045	0.143	0.000
K	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	0.143	0.000
L	0.000	0.000	0.000	0.200	0.000	0.214	0.000
M	0.215	0.000	0.150	0.050	0.000	0.000	0.500
N	0.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.000	0.000
<i>Mdg-2</i>							
(N)	7	19	20	10	12	7	2
A	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.500
B	0.929	0.974	0.850	0.000	1.000	1.000	0.000
C	0.071	0.026	0.150	0.000	0.000	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500
<i>Mdg-1</i>							
(N)	6	13	20	10	12	6	2
A	0.000	0.000	0.000	0.850	0.125	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.150	0.083	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.417	0.000
D	1.000	1.000	1.000	0.000	0.292	0.583	1.000
<i>Per</i>							
(N)	7	13	19	10	12	7	2
A	0.857	0.731	0.868	1.000	1.000	1.000	0.000
B	0.143	0.269	0.132	0.000	0.000	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000

Примечание. N – количество исследованных особей.

Note. N – number of specimens studied.

Значения генетического расстояния – D [Nei, 1978] (выше диагонали) и генетического сходства – I [Nei, 1978] (ниже диагонали) между выборками 4 видов рода *Nipponaskea*

Genetic distance – D [Nei, 1978] (above diagonal) and genetic similarity– I [Nei, 1978] (below diagonal) among samples of four species of *Nipponaskea*

Выборки	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>N. moskalevi</i> (зал. Восток)		0.015	0.011	1.203	1.106	0.115	1.861
2 <i>N. moskalevi</i> (Уссурийский залив)	0.985 (0.932–0.995)		0.001	1.196	1.114	0.119	1.853
3 <i>N. moskalevi</i> (Амурский залив)	0.985 (0.936–0.996)	0.999 (0.987–0.997)		1.168	1.122	0.114	1.839
4 <i>N. schrenkii</i>	0.300 (0.125–0.520)	0.302 (0.118–0.481)	0.311 (0.114–0.493)		0.875	1.134	1.514
5 <i>N. teramachii</i>	0.331 (0.125–0.527)	0.328 (0.120–0.528)	0.326 (0.134–0.523)	0.417 (0.220–0.630)		0.9730	1.836
6 <i>N. cf. moskalevi</i>	0.891 (0.724–0.962)	0.888 (0.735–0.963)	0.892 (0.749–0.967)	0.322 (0.135–0.524)	0.378 (0.150–0.592)		2.132
7 <i>N. radula</i>	0.156 (0.007–0.320)	0.157 (0.008–0.336)	0.159 (0.010–0.342)	0.220 (0.058–0.378)	0.159 (0.039–0.310)	0.119 (0.000–0.270)	

Примечание. В скобках представлены бутстреп-доверительные интервалы.
Note. Bootstrapped confidence intervals are included in parentheses.

Показатель генетического сходства между представителями рода *Nipponaskea* варьирует от 0.119 до 0.892. Сильнее всех от остальных видов отличается *N. radula* ($I=0.119-0.220$).

N. cf. moskalevi кластеризуется вместе с выборками *N. moskalevi* из

зал. Петра Великого со средним значение генетического сходства в этой группе 0.912 (рис. 1). *N. schrenkii* и *N. teramachii* формируют отдельный кластер, который присоединяется к группе *N. moskalevi*. Наиболее отличающимся от всех исследованных видов является *N. radula*.

Обсуждение

Все исследованные выборки *Nipponaskea moskalevi* из трех заливов (Восток, Амурский и Уссурийский) не отличаются статистически существенно по показателям генетической изменчивости и, за исключением одного локуса, по частотам аллелей. Выявленная дифференциация, обусловленная локусом *Lap*, может быть связана с тем, что данный локус характеризуется значительной изменчивостью (8 аллелей),

а количество исследованных особей недостаточно, чтобы судить о причинах этой дифференциации. Тем не менее, значения генетического сходства I [Nei, 1978] между *N. moskalevi* из трех заливов достаточно высоки (в среднем $I=0.976$). Такие величины характерны для конспецифичных популяций морских беспозвоночных [Thorpe, Sole-Cava, 1994]. Похожие результаты были получены при сравнении двух выборок

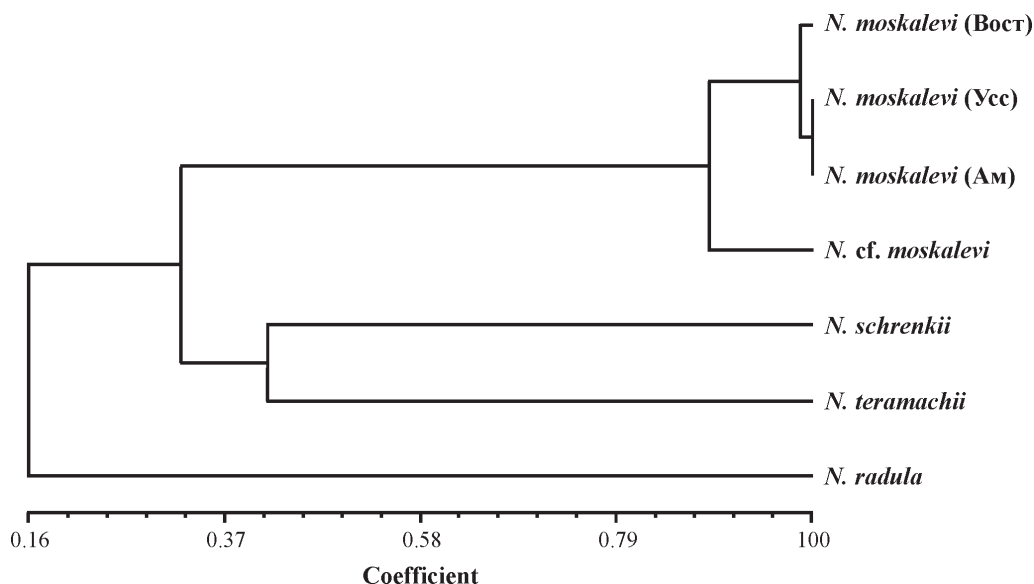


Рис 1. Фенограмма, отражающая генетическое сходство [I , Nei, 1978] между всеми исследуемыми выборками *Nipponaskea*. Вост – зал. Восток, Усс – Уссурийский залив, Ам – Амурский залив.

Fig 1. UPCMA tree showing genetic similarity [I , Nei, 1978] among all studied samples of *Nipponaskea*. Вост – Vostok Bay, Усс – Ussuriysky Bay, Ам – Amursky Bay.

N. moskalevi из зал. Восток ($I=0.993$) [Никифоров, 2007]. Для других представителей морских блюдечек также характерны близкие к полученным нами значения. Так, в работе Риджвэя с соавт. [Ridgway et al., 1998] было показано, что генетическое сходство между популяциями *Patella granularis* Linnaeus, 1758 из западной и южной Африки составляло $I=0.982-1.000$. Для популяций *Patella candei* d'Orbigny, 1839 с Азорских островов показатель генетического сходства был равен 0.996 [Côte-Real et al., 1996]. Отсюда следует, что моллюски, обитающие в заливах Восток, Амурском и Уссурийском представляют собой один вид – *N. moskalevi*.

При сравнении выборок *N. moskalevi* из приморских вод с выборками из прибрежных вод Кореи оказалось, что вид, который был определен как *N. cf. moskalevi* из Желтого моря, объединялся на фенограмме (рис. 1) с тремя выборками *N. moskalevi* из зал. Петра Великого. Генетическое сходство [Nei, 1978] между этими видами немного ниже, чем в популяциях *N. moskalevi* из прибрежных вод Приморья, и в среднем равно 0.912, что соответствует значениям, характерным для межпопуляционных сравнений у морских беспозвоночных [Thorpe, Sole-Cava, 1994]. Что касается морских блюдечек, то близкое значение генетического сходства ($I=0.859$) было получено для *P. coerulea* из Испании и Майорки, а для *Patella depressa* Pennant, 1777 с европейского и африканского побережий показатель генетического сходства составлял $I=0.898$ [Côte-Real et al., 1996]. Для брюхоногих моллюсков рода *Littorina* Férussac, 1822 в российской части его видового ареала (северное и южное Приморье, Курильские и Командорские острова) показа-

тели генетического сходства находятся в пределах $I=0.726-0.985$ [Заславская, Пудовкин, 2004].

Ранее считалось, что *N. moskalevi* – условный эндемик прибрежных вод южного Приморья [Чернышев, Чернова, 2002]. Этот вид был обнаружен в зал. Петра Великого, где обитает практически во всех заливах и неопределенных бухтах, от зал. Посьета до зал. Восток. Так же вид обнаружен в б. Киевка. Исходя из полученных данных, можно предположить, что ареал *N. moskalevi* шире, чем предполагалось ранее, и что этот вид обитает также и в Желтом море. По строению раковины и радулы экземпляры из Желтого моря могут быть идентифицированы как *N. moskalevi* (рис. 2А–С). Отличия касаются того, что у желтоморских экземпляров ребра раковины расположены более тесно, чем у япономорских.

Значения генетического сходства между *N. moskalevi*, *N. schrenckii* и *N. teramachii* находятся в пределах от 0.300 до 0.417. По полученным нами данным, *N. schrenckii* и *N. teramachii* кластеризуются вместе, что отличается от молекулярных данных, где они относятся к разным кластерам [Sasaki, Nakano, 2007]. При анализе разных последовательностей митохондриальной ДНК (12S, 16S, COI), взятых из генного банка (NCBI), эти виды тоже не образовывали единого кластера. Такая кластеризация может быть связана с небольшим и другим, по сравнению с изученными Сасаки и Накано [Sasaki, Nakano, 2007], набором исследованных нами видов. Тем не менее, генетическое сходство между этими видами мало ($I=0.417$), что подтверждает их значительные различия по морфологическим и молекулярным данным.

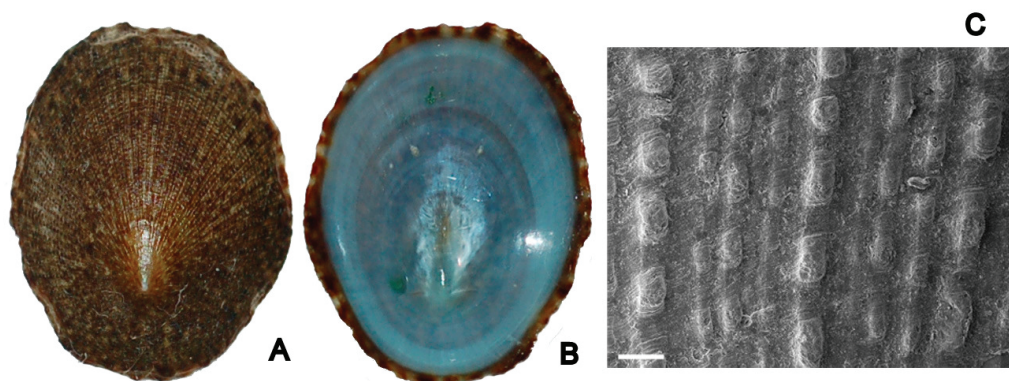


Рис. 2. *Nipponacmea moskalevi*, Желтое море, Корея, около г. Дэчён (Зоомузей ДВФУ, № 30610/Ga-7010): **A, B** – раковина (длина 16 мм); **C** – скульптура раковины (СЭМ). Масштаб: **C** – 200 мкм.

Fig. 2. *Nipponacmea moskalevi*, Yellow Sea, Korea, near Daechon (Zoological Museum of the Far East Federal University, no. 30610/Ga-7010): **A, B** – shell (length 16 mm); **C** – shell sculpture (SEM). Scale bar: **C** – 200 μ m.

Что касается *N. radula*, то показатели генетического сходства между *N. radula* и *N. moskalevi*, *N. schrenckii*, *N. teramachii* достаточно низкие, $I=0.119–0.220$. Эти значения находятся за пределами, свойственными видам одного рода в среднем для морских беспозвоночных ($I=0.350–0.850$) [Thorpe, Sole-Cava, 1994]. Сходные значения были получены для двух родов крабов семейства Varunidae Н. Milne-Edwards, 1853 – *Hemigrapsus* Dana, 1851 и *Eriochelone* De Haan, 1835 [Zaslavskaya et al., 2007] и двух родов раков-отшельников (*Diogenes* Dana, 1851 и *Stratiotes* Thomson, 1899), принадлежащих семейству Diogenidae Ortmann, 1892 [Zaslavskaya et al., 2009]. Показатель генетического сходства между этими родами был равен 0.125 и 0.167, соответственно. Так

как морские блюдечки Patellogastropoda Lindberg, 1996 – достаточно древняя группа, то темпы молекулярной эволюции могли оказаться у них выше морфологической. Похожая ситуация известна для представителей нескольких родов немертин. Так, например, два вида рода *Oerstedia* Quatrefages, 1846, морфологически почти неразличимые, имеют очень маленькое генетическое сходство – 0.066 [Zaslavskaya, Chernyshev, 2008].

В целом, представители *Nipponacmea*, исследованные в данной работе, образуют единый кластер. Среднее значение генетического сходства между всеми представителями ($I=0.472$) находится в пределах значений, характерных для видов одного рода для морских беспозвоночных ($I=0.350–0.850$) [Thorpe, Sole-Cava, 1994].

Благодарности

Настоящая работа выполнена при поддержке грантов ДВО РАН (№ 09-III-A-06-200), Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных иссле-

дований, проводимых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (№ 11.G34.31.0010) и APN Project ARCP2010-18NMY-Lutaenko.

Литература

- Животовский Л.А. 1991. Популяционная биометрия. Москва: Наука. 271 с.
- Зайкин Д.В., Пудовкин А.И. 1991. Программа мультитест – расчет показателей статистической существенности при множественных тестах // Генетика. Т. 27, № 11. С. 2034–2038.
- Заславская Н.И. 1989. Генетическая изменчивость четырех тихоокеанских видов литорин (Mollusca; Littorinidae) // Генетика. Т. 25, № 9. С. 1636–1644.
- Заславская Н.И., Пудовкин А.И. 2005. Макрогеографическая генетическая изменчивость брюхоногого моллюска *Littorina sitkana* в юго-западной Пацифике // Генетика. Т. 41, № 3. С. 1–10.
- Никифоров С.М. 2007. Исследование популяционно-генетических характеристик в природных поселениях *Mytilus trosulus* (Gould, 1850) (Bivalvia, Mytilidae) и *Nipponacmea moskalevi* (Gastropoda, Lottiidae) из загрязненных и относительно чистых районов залива Петра Великого (Японское море) // Реакция морской биоты на изменение природной среды и климата. Владивосток: Дальнаука. С. 343–355.
- Пудовкин А.И., Зайкин Д.В., Татаринов А.Н. 1996. Программа DBOOT для расчета генетического расстояния и генетической идентичности (по Нею) и их бутстрэпных доверительных интервалов // Генетика. Т. 32, № 7. С. 1017–1020.
- Чернышев А.В. 2008. *Nipponacmea vietnamensis* sp. nov. (Gastropoda: Lottiidae), новый вид морских блюдечек из Тонкинском залива (Южно-Китайское море) // Бюллетень Дальневосточного малакологического общества. Вып. 12. С. 116–127.
- Чернышев А.В., Чернова Т.В. 2002. *Nipponacmea moskalevi* sp. nov. (Gastropoda, Lottiidae), новый вид морских блюдечек из Японского моря // Ruthenica (Русский малакологический журн.). Т. 12, № 1. С. 19–22.
- Badino G., Sella G. 1980. Phosphoglucose isomerase variability in sympatric populations of Mediterranean species of *Patella* (Gastropoda, Prosobranchiata) // Marine Ecology Progress Series. V. 2. P. 315–320.
- Beaumont A.R., Wei J.H.C. 1991. Morphological and genetic variation in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908) // Journal of Molluscan Studies. V. 57. P. 443–450.
- Côrte-Real H.B.S.M., Hawkins S.J., Thorpe J.P. 1996. Population differentiation and taxonomic status of the exploited limpet *Patella candei* in the Macronesian island (Azores, Madeira, Canaries) // Marine Biology. V. 125. P. 141–152.
- Cretella M., Scillitani G. 1994. Relationships between *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 and other Tyrrhenian species of *Patella* (Gastropoda: Patellidae) // Journal of Molluscan Studies. V. 60. P. 9–17.
- Hernandez J.L., Weir B.S. 1989. A disequilibrium coefficient approach to Hardy–Weinberg testing // Biometrics. V. 45. P. 53–70.
- Nakano T., Ozawa T. 2007. Worldwide phylogeography of limpets of the order Patellogastropoda: molecular, morphological and palaeontological evidence // Journal of Molluscan Studies. V. 73. P. 79–99.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. V. 89. P. 583–590.
- Ridgway T.M., Branch G.M., Stewart B.A., Hodgson A.N. 2000. Taxonomic status of the «*Patella miniata*» species complex (Mollusca: Gastropoda) in Southern Africa // Hydrobiologia. V. 420. P. 103–118.
- Ridgway T.M., Stewart B.A., Branch G.M., Hodgson A.N. 1998. Morphological and genetic differentiation of *Patella granularis* (Gastropoda: Patellidae): recognition of two sibling species along the coast of southern Africa // Journal of Zoology, London. V. 245. P. 317–333.
- Rohlf F.J. 1988. NTSYS-pc; Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Exter Publishing.
- Sá-Pinto A., Alexandrino P., Branco M. 2007. High genetic differentiation with no evidence of hybridisation between four limpet species (*Patella* spp.) revealed by allozyme loci // Scientia Marina. V. 71. P. 801–810.
- Sasaki T., Nakano T. 2007. The southernmost record of *Nipponacmea fuscoviridis* (Patellogastropoda: Lottiidae) from Iriomote Island, Okinawa // Venus. V. 66. P. 99–102.
- Sasaki T., Okutani T. 1993. New genus *Nipponacmea* (Gastropoda: Lottiidae): a revision of Japanese limpets hitherto allocated in *Notoacmea* // Venus. V. 52, N 1. P. 1–40.
- Sasaki T., Okutani T. 1994. Description of a new lottiid limpet, *Nipponacmea habei*, with special reference to morphology and distribution of two infraspecific populations // Venus. V. 53. P. 1–20.

- Sella G., Robotti C.A., Biglione V.* 1993. Genetic divergence among three sympatric species of Mediterranean *Patella* (Archaeogastropoda) // *Marine Biology*. V. 115. P. 401–405.
- Sokal R.R., Rohlf F.J.* 1981. *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. San Francisco: W. H. Freeman and Company. 857 p.
- Swofford D.L., Selander R.B.* 1981. BIOSYS. Urbana: A Computer Program for Analysis of Allelic Variation in Genetics. University of Illinois.
- Thorpe J.P., Sole-Cava A.M.* 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics // *Zoologica Scripta*. V. 23, N 1. P. 3–18.
- Zaslavskaya N.I., Chernyshev A.V.* 2008. Allozyme comparison of three nemertean species of the genus *Oerstedtia* (Nemertea: Monostilifera) from the Sea of Japan // *Biochemical Systematics and Ecology*. V. 36, N. 7. P. 554–558.
- Zaslavskaya N.I., Kornienko E.S., Korn O.M.* 2007. Genetic differences between two spider crabs *Pisoides bidentatus* (A. Milne-Edwards, 1873) and *Pugettia quadridens* (de Haan, 1839) (Decapoda: Brachyura: Majoidea) from the Sea of Japan // *Biochemical Systematics and Ecology*. N 35. P. 750–756.
- Zaslavskaya N.I., Kornienko E.S., Korn O.M.* 2009. Genetic differences between different species pagurid and diogenid hermit crabs from the Sea of Japan // *Invertebrate Zoology*. V. 6, N 2. P. 147–155.
- Zaykin D.V., Pudovkin A.I.* 1993. Two programs to estimate significance of Chi-square values using pseudo-probability tests // *Journal of Heredity*. V. 84. P. 152.