

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
КАМЧАТСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ РЫБНОГО
ХОЗЯЙСТВА И ОКЕАНОГРАФИИ

На правах рукописи

Пильганчук Оксана Александровна

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА НЕРКИ, *ONCORHYNCHUS NERKA*
(WALBAUM), ПОЛУОСТРОВА КАМЧАТКА**

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Н.Ю. Шпигальская

Петропавловск-Камчатский – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Ареал, краткая биологическая характеристика и внутривидовая организация нерки.....	10
1.2. Генетическая дифференциация нерки Азии и Северной Америки: состояние изученности данного вопроса.....	16
1.2.1. Биохимический полиморфизм.....	16
1.2.2. Полиморфизм мтДНК.....	21
1.2.3. Изменчивость микросателлитных локусов.....	24
1.2.4. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP).....	27
ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1. Материалы.....	30
2.2. Методы.....	34
2.2.1. Молекулярно-генетические методы.....	34
2.2.2. Методы статистического анализа	41
ГЛАВА 3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НЕРКИ ВОСТОЧНОЙ КАМЧАТКИ.....	47
3.1. Характеристика уровня изменчивости микросателлитов.....	47
3.2. Пространственная изменчивость аллельных частот.....	62
3.3. Межпопуляционная генетическая дифференциация.....	66
ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НЕРКИ ЗАПАДНОЙ КАМЧАТКИ (на примере бассейна р. Озерная).....	80
4.1. Дифференциация сезонно-экологических форм нерки оз. Курильское (бассейн р. Озерная).....	80
4.2. Характеристика дискриминирующей способности микросателлитных локусов нерки бассейна р. Озерная	84
4.3. Гетерогенность нерестового хода нерки р. Озерная.....	93

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ТЕМПОРАЛЬНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ.....	97
ГЛАВА 6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОРСКИХ СМЕШАННЫХ ВЫБОРОК НЕРКИ НА ОСНОВЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ АЛЛЕЛЬНЫХ ЧАСТОТ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ.....	102
6.1. Оценка разрешающей способности реперных данных.....	102
6.2. Апробация базы реперных данных.....	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Тихоокеанские лососи (род *Oncorhynchus*) наиболее значимые в промысловом отношении объекты ихтиофауны для многих государств, расположенных на побережье Тихоокеанского бассейна и, главным образом, России. В 30–40-е годы XX в. их уловы достигали 500–600 тыс. тонн (Кляшторин, 2000). Тихоокеанские лососи относятся к анадромным видам рыб, нерестятся один раз в течении жизненного цикла в реках или озерах, молодь мигрирует в Тихий океан, где нагуливается от одного до пяти лет и возвращается обратно к местам нереста. Представителям этого рода свойственна сложная популяционная организация.

Нерка *Oncorhynchus nerka* Walbaum — на территории России третий по численности вид тихоокеанских лососей (Burgner, 1991; Синяков, 2006). Наиболее важные и многочисленные стада российской части ареала воспроизводятся на Камчатке, в бассейнах оз. Курильское и р. Камчатка.

Для сохранения и увеличения запасов нерки необходимы детальные и всесторонние исследования популяционных комплексов этого сложно организованного вида, результаты которых позволят разработать рекомендации и создать оптимальные условия для эксплуатации и воспроизводства стад, рационального ведения промысла в прибрежной зоне и нерестовых реках. Полученная информация поможет понять эволюционные закономерности формирования популяционной структуры и видового ареала.

Для регулирования морского промысла на международном уровне, распределения промысловой нагрузки, описания путей миграций, определения происхождения браконьерских уловов необходимо идентифицировать локальные стада разных регионов в смешанных скоплениях молоди и производителей.

В современных условиях одними из самых эффективных и точных методов идентификации являются молекулярно-генетические. Анализ на основе аллельной изменчивости микросателлитной ДНК наиболее часто и

успешно в последние два десятилетия используется в популяционно-генетических исследованиях различных видов рыб, в том числе лососевых (Beacham et al., 1998, 1999, 2000, 2006a,b; Афанасьев и др., 2006; Варнавская, 2006; Хрусталева, 2007; Животовский, 2013).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является оценка уровня дифференциации нерки Камчатки по микросателлитным локусам и возможности региональной идентификации смешанных уловов по данной системе популяционно-генетических маркеров.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. осуществить апробацию и подбор дифференцирующих микросателлитных локусов;
2. оценить степень внутри- и межпопуляционной изменчивости нерки Восточной Камчатки;
3. оценить гетерогенность нерки бассейна оз. Курильское;
4. оценить темпоральную стабильность микросателлитных локусов как системы популяционных маркеров;
5. определить разрешающую способность полученной базы реперных данных и провести ее апробацию на примере смешанных выборок молодежи и производителей.

Основные положения, выносимые на защиту:

- определен набор наиболее информативных для популяционно-генетических исследований нерки Камчатки микросателлитных локусов;
- выявлена значительная дифференциация нерки восточного побережья Камчатки по частотам аллелей микросателлитных локусов, генетическое сходство популяций соответствует их географической близости, имеет место достоверная связь между географическими расстояниями и величинами популяционно-генетических различий;
- нерка оз. Курильское (бассейн р. Озерная) представлена несколькими сезонно-экологическими формами, генетическая изменчивость которых

отражена в гетерогенности особей различных периодов нерестового хода в р. Озерная;

– показано, что микросателлитная ДНК является темпорально стабильным маркером популяционной изменчивости, что позволяет длительное время использовать единожды созданные базы реперных данных при осуществлении идентификационных оценок;

– на основе изменчивости частот аллелей микросателлитных локусов в популяциях нерки Камчатки возможно с достаточно высокой точностью идентифицировать в смешанных выборках популяционные группы восточного побережья и сезонно-экологические формы бассейна оз. Курильское.

Научная новизна. Апробированы тридцать шесть микросателлитных локусов, из них для анализа нерки Камчатки было отобрано девятнадцать, использование которых в исследовании популяций данного региона представляется перспективным. Показана временная устойчивость использованной системы маркеров в течение более чем десятилетнего периода, что позволяет использовать для идентификации смешанных скоплений единожды созданные базы данных.

Впервые методами молекулярно генетического анализа (микросателлитные последовательности ДНК) исследована нерка рек Навыринваям, Хайлюля, Апука, Пономарка, верхнее течение р. Камчатка и озера Саранное (Командорские о-ва). Показано соответствие степени генетического сходства всех исследованных популяций их географической близости, выявлено наличие достоверной корреляционной связи между географическими расстояниями и величиной генетических различий. В соответствии с генетической дифференциацией нерки восточного побережья Камчатки, выделены пять региональных групп, уровень различия между которыми превышает уровень межпопуляционной изменчивости.

На основании анализа частот микросателлитных локусов оценена гетерогенность нерестового хода в р. Озерная. Особей, анадромная миграция

которых проходит до середины июля, с большой степенью вероятности можно охарактеризовать как раннюю речную форму.

Продемонстрирована возможность идентификации выделенных популяционных групп восточного побережья Камчатки в смешанных уловах молоди нерки в западной части Берингова моря и производителей «ранней» и «поздней» форм нерки в течение нерестового хода в р. Озерная.

Практическая значимость. Аллельные частоты микросателлитных локусов использованы для создания реперной базы данных в целях индивидуальной и популяционной идентификации особей нерки в смешанных скоплениях, а так же генетического мониторинга исследованных популяций и популяционных комплексов. Данные по составу траловых уловов молоди в Беринговом море могут служить основой для количественной оценки особей из выявленных популяционных групп: «оз. Азабачье», «бассейн р. Камчатка», «Карагинский р-н», «север Олюторского р-на» и «Командорские о-ва» и, в дальнейшем, использоваться для прогноза численности производителей в соответствующих районах Восточной Камчатки.

Полученные результаты также могут быть использованы с целью получения идентификационных оценок уловов в р. Озерная и пропорционального распределения промысловой нагрузки на субпопуляции нерки бассейна оз. Курильское, т.е. рациональной эксплуатации данного запаса с учетом популяционной структуры и сохранения природного биоразнообразия.

Апробация результатов. Основные положения и результаты работы были представлены на X Всероссийском популяционном семинаре «Современное состояние и пути развития популяционной биологии» (Ижевск, 17–22 ноября 2008 г.), V съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященном 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина (Москва, 21–28 июня 2009 г.), Всероссийской научной конференции «Водные биологические ресурсы северной части Тихого океана: состояние, мониторинг, управление» (Петропавловск-Камчатский, 26–27 сентября 2012 г.), Международной рабочей группе Северотихоокеанской комиссии по

анадромным видам рыб (NPAFC) «International Workshope on Application of Stock Identification in Defining Marine Distribution and Migration of Salmon» (Санкт-Петербург, 7–12 октября 2012 г.), отчетной сессии ФГУП «КамчатНИРО» по итогам научно-исследовательских работ в 2012 г. (Петропавловск-Камчатский, 2013 г.), а также в виде научных годовых отчетов ФГУП «КамчатНИРО» в 2000–2001 гг. и 2007–2009 гг.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в числе которых 5 статей в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора или кандидата наук».

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах исследования. Диссертация написана лично автором с использованием собственных результатов, а так же самостоятельного анализа находящихся в свободном доступе данных, ранее опубликованных Н.В. Варнавской (2006). Доля личного участия в экспериментальных исследованиях составила не менее 90%.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 135 страницах, состоит из введения, обзора литературы (гл. 1), характеристики материалов и методов (гл. 2), результатов и обсуждения (гл. 3–6), заключения, выводов, списка литературы, включающего 220 цитированных источников, из которых 108 на английском языке. Работа иллюстрирована 37-ю рисунками и содержит 25 таблиц.

Благодарности. Автор выражает признательность научному руководителю — Н.Ю. Шпигальской, за создание творческой атмосферы, советы и всестороннюю помощь в организации и проведении исследований, обобщении и анализе результатов. Автор искренне благодарен д.б.н. Н.В. Варнавской, под руководством которой были начаты исследования популяционной структуры нерки, и оказавшей влияние на формирование

научного мировоззрения и становление автора как самостоятельного исследователя.

Автор благодарен коллективу лаборатории: У.О. Муравской, В.В. Савенкову, А.С. Кустовой, А.И. Косицыной за моральную поддержку и неослабевающий интерес к работе, и отдельно О.Н. Сараванскому за многолетнее совместное сотрудничество, помощь в выделении ДНК, обучение технике сбора материала в полевых условиях.

Автор искренне признателен сотрудникам лаборатории генетических проблем идентификации Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН за неоценимую помощь в освоении методики анализа изменчивости микросателлитных локусов, а так же сотрудникам ФГУП «КамчатНИРО», принимавшим участие в сборе материала в сложных условиях Камчатки — В.А. Дубынину, А.Н. Климову, Г.В. Базаркину, С.А. Травину, И.Н. Сиротенко, И.В. Шатило, Е.Н. Збоевой, С.В. Шубкину, А.Н. Ходько, В.А. Романову.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ареал, краткая биологическая характеристика и внутривидовая организация нерки

Нерка *Oncorhynchus nerka* Walbaum — один из ценнейших промысловых видов рыб на Дальнем Востоке России. Наиболее крупные и значимые для экономики государства стада нерки, дающие почти 100% уловов, обитают на Камчатке (Синяков, 2006). Практически все популяции воспроизводятся на природных нерестилищах, вклад рыбопроизводных заводов (ЛРЗ) очень мал (Синяков, 2006). В связи с этим, для поддержания нативных популяций в оптимальном состоянии, повышения качества промысла, для решения других теоретических и практических задач, необходимо оценить дифференциацию популяций отдельных регионов и бассейнов крупных рек, собрать максимально полную, валидную и современную информацию о популяционно-генетическом своеобразии изучаемых стад. Достаточно полные знания о популяционной структуре вида составят необходимую научную основу для оценки сырьевой базы, создания точных прогнозов.

Нерка является представителем отряда Salmoniformes, подотряда Salmonnoidea, надсемейства Salmonoidea, семейства Salmonidae (лососевые), подсемейства Salmoninae, рода *Oncorhynchus* (Nelson, 1984; Глубоковский, 1995; Алтухов и др., 1997). На территории России она является третьим по численности видом тихоокеанских лососей после горбуши и кеты (Синяков, 2006), на американской части ареала — вторым (Burgner, 1991).

Ареал нерки весьма обширный. На азиатском побережье она воспроизводится в бассейнах рек, впадающих в Тихий океан, от Курильских островов до северной части Берингова (реки Чегитунь и Амгуэма) и Охотского (реки Пенжина, Гижига, Наяхан, Яма, Ола и Тауй) морей. На материковом побережье Охотского моря достигает промысловой численности в реке Охота, встречается на о-ве Хоккайдо, Командорских о-вах (Бугаев, 1995, 2011; Черешнев и др., 2002; Шунтов, Темных, 2008). На североамериканском

побережье нерка особенно многочисленна и встречается от арктического побережья Аляски до р. Кламатч в Южной Калифорнии (Burgner, 1991; Бугаев, 1995, 2011; Шунтов, Темных, 2008). В морской период жизни основными районами нагула нерки азиатских стад являются западная часть Берингова моря, тихоокеанские воды Камчатки и северных Курильских островов. Охотское море для нагула используется мало (Бирман, 1967, 1985; Коновалов, 1980; Бугаев, 1995, 2011; Шунтов, Темных, 2008).

Нерка относится к проходным моноциклическим видам с длительными пресноводным и морским периодами жизни, после нереста все рыбы погибают (Смирнов, 1975; Бугаев, 1995, 2011). Основная масса нерки скатывается в море в возрасте от одного года до 4-х лет, где нагуливается 1–4, чаще — 2–3 года, и затем совершает преднерестовую (анадромную) миграцию в родные реки (Смирнов, 1975; Коновалов, 1980; Алтухов и др., 1997; Бугаев, 1995, 2011; Шунтов, Темных, 2008). Относительно постоянная возрастная структура в каждом из районов воспроизводства сохраняется на протяжении ряда поколений и поддерживается «хomingом» — возвратом производителей к местам нереста их родителей (Бугаев, 1995, 2011; Алтухов и др., 1997).

Скат молоди в море по всему ареалу азиатской нерки продолжается с конца февраля–марта до середины сентября (Бугаев, 1995, 2011; Черешнев и др., 2002; Шунтов, Темных, 2008). Средние размеры покатников зависят от возраста и места нереста и, соответственно, значительно варьируют (Бугаев, 1995, 2011; Карпенко, 1998). Так, в 1978–1979 гг. из р. Камчатка скатывались сеголетки нерки длиной 2,6–7,7 см (Бугаев, Карпенко, 1983; Карпенко, 1998), а смолты из оз. Красивое мигрировали в возрасте 2+, достигая длины 17–22 см (Иванков, 1984). Скатившаяся молодь держится вблизи берегов обычно в течение непродолжительного времени и осенью мигрирует в открытый океан (Карпенко, 1998; Бирман, 1985).

Следует отметить, что в некоторых водоемах (например, в оз. Кроноцкое на Камчатке, оз. Сопочное на о. Итуруп) нерка, помимо проходной формы, образует карликовую или жилую форму, которая созревает, нерестится и

погибает, не выходя в море (Ricker, 1959; Смирнов, 1975; Куренков, 1972, 1974, 1977; Горшкова, Горшков, 1977; Остроумов, 1977; Крогиус, 1981; Burgner, 1991; Варнавская и др., 2005). Некоторые исследователи описывают ее как подвид (Foote et al., 1989). Популяции карликовых лососей — кокани, могут существовать в озерах, в которых присутствует проходная форма, однако растут медленно, созревают в возрасте от 2 до 7 лет, имея длину 23–35 см и вес 200–300 г (Смирнов, 1975).

Период анадромной миграции нерки различается по всему ареалу и обычно наблюдается с середины мая до конца сентября, а в некоторых случаях даже в ноябре (Смирнов, 1975; Коновалов, 1980; Бугаев, 1995; Шунтов, Темных, 2008). Миграция в реки начинается после их вскрытия ото льда (Смирнов, 1975). После захода в нерестовые водоемы, производители могут не приступать к нересту до одного месяца в реках и до 4-х месяцев в озерах (Крогиус, 1954; Крогиус, Крохин, 1956; Иевлева, 1964; Foerster, 1968; Бугаев, 1995). В реки нерка входит серебрянкой, достаточно выраженный брачный наряд приобретает в конце периода нерестового хода или на нерестилищах, самцы в брачном наряде отличаются от самок характерным горбом на спине, более изогнутыми челюстями и зубами (Смирнов, 1975; Запорожец, Запорожец, 2007). Масса тела у проходных лососей колеблется от 0,4 до 7 кг, длина — 30–80 см, плодовитость — 1,5–10 тыс. икринок (Бугаев, 1995).

Нерестилища нерки в Азии занимают третью по обширности площадь после горбуши и кеты, и на Камчатке составляют — 15–19 млн м² (Остроумов, 1975; Шунтов, Темных, 2008). Нерестовые водоемы нерки по гидрологическим и морфологическим свойствам разделяются на три типа: речные, ключевые и озерные (Крохин, Крогиус, 1937; Крохин, 1960; Остроумов, 1970; Бугаев, 1995). Нерестилищам каждого типа свойственны определенные кислородные, температурные и кислотные условия, а так же скорость течения и глубина (Смирнов, 1975; Коновалов, 1980; Новосельская и др., 1982). Важнейшей особенностью мест нереста нерки является наличие выходов грунтовых вод на дне нерестовых водоемов (Крохин, 1960; Бугаев, 1995). В пределах Камчатского

края 50–70% нерки нерестится в озерах и 30–50% — в реках, основная часть нерестовых озер расположена в бассейнах рек восточного побережья Камчатки (Остроумов, 1975, 1985; Бугаев, 1995). В.П. Шунтовым и О.С. Темных (2008) отмечено, что при выборе места нереста лосося ориентируются не на отдельные факторы, а на их комплекс.

Гнезда нерка обустраивает в пределах небольших территорий, установленных и охраняемых самкой, на глубинах от 30 см до 2 м, реже 4–6 и даже 30 м (Ricker, 1966; Остроумов, 1970; Коновалов, 1980; Бугаев, 1995). Отложенную икру рыбы полностью зарывают. Самки после последней порции выметанной икры погибают, тогда как самцы полигамны и продолжают еще значительное время оставаться активными (Коновалов, 1980; Бугаев, 1995). Эмбриональное и личиночное развитие нерки до выхода из грунта продолжается от 5 до 8 месяцев (Смирнов, 1975; Коновалов, 1980). Сроки выхода личинок из грунта в разных водоемах неодинаковы (Коновалов, 1980). К примеру, отмеченные сроки выхода личинок в бассейне р. Камчатка — январь – февраль, а в бассейне р. Озерная (летняя форма) — с апреля по сентябрь (Крогиус, Крохин, 1956; Коновалов, 1980). Начиная с личиночного периода, молодь преимущественно ведет стайный образ жизни (Hoar, 1958; Смирнов, 1975; Коновалов, 1980; Бугаев, 1995). П. Маккарт (McCart, 1967) обнаружил, что мальки начинают питаться еще при наличии желточного мешка. Полностью на экзогенное питание мальки переходят после подъема на плав при длине 26–28 мм (Черешнев и др., 2002).

По времени хода и нереста нерка подразделяется на две сезонные расы: весенняя (ранняя) и летняя (поздняя) (Крогиус, 1970; Коновалов, 1980; Алтухов, 1974). Ранняя нерка подходит на нерест в конце мая – в июне, поздняя форма — в июле – августе (Смирнов, 1975; Бугаев, 1976, 1995, 2010). Весенняя нерка воспроизводится преимущественно на речных нерестилищах, расположенных в системах небольших речек и ручьев, впадающих в нагульный водоем (озеро), летняя — на литорали озер, однако жестких различий по местам размножения у

нерки обеих рас нет (Крохин, 1960; Коновалов, 1980; Бугаев, 1995; Шунтов, Темных, 2008).

В результате адаптаций, которые возникли в связи с климатическими изменениями, значительной пространственной подразделенностью нерестовых площадей, их дифференциацией по гидрохимическим свойствам, различному времени нереста, а также рядом других факторов, у нерки произошло образование множества субпопуляций, количество которых может достигать в бассейнах различных водоемов нескольких десятков (Коновалов, 1980; Бугаев, 1995; Алтухов и др., 1997; Варнавская, 2006). Среди всех тихоокеанских лососей у нерки самая сложная внутривидовая организация, для нее отмечена наибольшая дифференциация на сезонные и экологические формы, отличающиеся сроками нереста и типом осваиваемых нерестилищ (Крохин, 1960; Алтухов, 1983; Варнавская, 2006). Необходимо отметить, что важнейшие биологические характеристики популяционной системы (численность, половозрастная структура, скорость роста и развития, сроки нерестовой миграции, темпы воспроизводства) в нормально флуктуирующей среде остаются весьма стабильными, колеблясь лишь в определенных пределах; они не выходят за границы исторически сложившегося оптимума наследственного разнообразия, специфичного для каждого отдельного стада (Алтухов, 1983).

В настоящей работе используется термин «стадо рыб», сформулированный К.П. Януловым (1962), под которым понимается группа рыб, достаточно обособленная в отношении района обитания, морфоанатомических и биологических особенностей, имеющая достаточно выраженное родство, которое может поддерживаться либо путем обмена наследственными признаками между отдельными популяциями, либо в результате отсутствия значительного потока наследственных признаков со стороны других генетических группировок. Объектом настоящего исследования являются так называемые локальные стада рыб — большие географические популяции, изолированные друг от друга естественными границами, по меньшей мере, тысячи лет назад и еще не разрушенные полностью теми или

иными антропогенными воздействиями (Алтухов, 2003). В 1969 г. в г. Дублин на семинаре ИКЕС «Serological and Biochemical Identification of Fish Stocks» было предложено для рыб использовать термин «популяция», определенный Ф.Г. Добжанским (Dobzhansky, 1951) как «репродуктивное сообщество организмов с общим генным фондом». В данной работе термин «популяция» мы используем в контексте этого определения. В свою очередь популяции подразделяются на более мелкие, генетически отличающиеся структурные единицы — субпопуляции (Алтухов, 1997; 2003; Варнавская, 2006). Популяционная подразделенность на разобщенные пространством и/или временем субпопуляции, приуроченные к отдельным нерестилищам у нерки может наблюдаться в рамках одного нерестового водоема (Алтухов, 1983). Экологические наблюдения и эксперименты свидетельствуют о некотором обмене особями между субпопуляциями (Hartmann, Raleigh, 1964), и, следовательно, эти группировки подпадают под определение связанных популяций, взаимодействующих друг с другом (или через промежуточные субпопуляции) в рамках границ исторически и территориально единой совокупности (Алтухов, 1974, 1983).

Популяционная структура нерки как вида рассматривалась многими учеными. Тем не менее, изучение этой темы продолжается, многие вопросы остаются актуальными и анализируются в настоящее время. Одним из исследований, по данной тематике была работа С.М. Коновалова, посвященная изучению популяционной биологии тихоокеанских лососей, в которой локальные стада крупных озерно-речных систем нерки, автор именуется изолятами (Коновалов, 1971, 1980). В пределах многоуровневых локальных стад нерки С.М. Коновалов выделяет совокупность субизолятов весенней и летней рас и самовоспроизводящиеся группировки отдельных нерестилищ (Коновалов, 1980), в других работах именуемые субпопуляциями (Алтухов, 1997; Варнавская, 2006).

В.Ф. Бугаев вместе с рядом ученых, не опровергая утверждения о субизоляте как о популяции низшего ранга, тем не менее, не разделяет выводов

о структуре субизолята в интерпретации С.М. Коновалова (Бугаев, 1995). Затрагивая вопрос о подразделенности отдельных локальных стад нерки в пространстве, В.Ф. Бугаев (1995) отмечает, что каждый частный случай следует рассматривать отдельно, так как существуют локальные стада, которые приурочены к системам крупных рек с группировками, размножающимися в притоках второго, третьего и т.д. порядков, а так же локальные стада небольших самостоятельных рек и крупных озер (часто с системой стад) (Бугаев, 1995). Так, В.Ф. Бугаев на основании анализа структуры чешуи молоди и производителей нерки, зараженности особей плероцеркоидами *Diphyllbothrium*, изучения роста и миграций молоди в бассейне р. Камчатка выделяет семь локальных стад и группировок локальных стад второго порядка (Бугаев, 1995).

М.К. Глубоковский (1995), проведя обзор взглядов на внутривидовую дифференциацию нерки, заключил, что популяционная структура данного вида имеет четыре иерархических уровня: 1) суперпопуляции отдельных регионов; 2) популяции конкретных нерестовых бассейнов; 3) темпоральные популяции, существование которых доказано в ряде локальностей; 4) субпопуляции, связанные с определенными нерестилищами-субизолятами.

1.2. Генетическая дифференциация нерки Азии и Северной Америки:

состояние изученности данного вопроса

1.2.1. Биохимический полиморфизм

С середины 50-х годов прошлого столетия, в популяционную генетику вошел метод разделения белков с помощью электрофореза в крахмальном и акриламидном гелях (Кирпичников, 1987). Первые популяционные исследования были связаны с аномальным поведением гемоглобина при серповидноклеточной анемии у человека (Pauling et al., 1949). В 1957 г. было установлено, что один и тот же фермент может быть представлен в организме множественными формами — изоферментами, которые различаются по

электрофоретической подвижности (Hunter, Market, 1957, цит. по Корочкин и др., 1977). Под изоферментами стали понимать генетически детерминированные варианты одного и того же фермента в одном и том же организме, характеризующиеся сходной субстратной специфичностью (Корочкин и др., 1977). В дальнейшем, изменчивость белков и ферментов стала широко использоваться в генетических исследованиях (Алтухов, 1974; Корочкин и др., 1977). В 1969 г. вышла первая работа, посвященная наследственному полиморфизму нерки (Hodgins et al., 1969). В работе в качестве материала использовалась сыворотка крови, электрофорез проводили в крахмальном геле с последующим окрашиванием на активность фермента лактатдегидрогеназы. Первые исследования генетической структуры популяций лососей проводились по нескольким ферментным системам (Hodgins et al., 1969; Utter, Hodgins, 1970; Алтухов, 1974; Кирпичников, Муске, 1981; Муске, 1983; Варнавская, 1984а,б). В дальнейшем количество исследуемых локусов и популяций значительно увеличилось (Grant et al., 1980; Utter et al., 1984; Withler, 1985; Wilmot et al., 1986; Варнавская и др., 1988; Foote et al., 1989; Пустовойт, Макоедов, 1992; Rutherford et al., 1992; Пустовойт, 1993, 1994; Wood et al., 1994; Varnavskaya et al., 1994a,b; Guthrie et al., 1994; Варнавская и др., 1996). До 2000-х годов анализ биохимического полиморфизма белков был основным генетическим методом изучения популяционной структуры у нерки.

Первые исследования камчатских лососей с применением биохимических маркеров проводились сотрудниками Академии наук СССР: Института Биологии моря (г. Владивосток), Института Общей генетики (г. Москва), Института цитологии (г. Ленинград), и касались озерных популяций нерки. Была выявлена внутрипопуляционная генетическая дифференциация по двум полиморфным генам, кодирующим ферменты лактатдегидрогеназу и фосфоглюкомутазу, в локальном стаде нерки оз. Азабачье (Алтухов, 1974) и оз. Дальнее (Кирпичников, Иванова, 1977; Кирпичников, Муске, 1981). Позже исследования были продолжены и расширены сотрудниками ФГУП «КамчатНИРО» в локальных стадах нерки оз. Дальнее, Ближнее, Начикинское

(Алтухов, Варнавская, 1983; Варнавская, 1983, 1984; Варнавская, Варнавский, 1983; Варнавский, Варнавская, 1983а,б, 1985; Варнавская и др., 1988), оз. Курильское (Варнавская 1986; Варнавская, Дубынин, 1986, 1987; Варнавская, 1988а,б; Varnavskaya, Nikolaeva, 1990).

Проведенные генетические исследования позволили получить большое количество информации по данной системе маркеров для многих значимых популяций нерки Камчатки. Так, популяция нерки в бассейне оз. Азабачье была охарактеризована как стабильная, состоящая из элементарных единиц (субпопуляций), находящихся в стационарном состоянии, обусловленном уравновешивающим действием случайного дрейфа генов, миграции и отбора (Алтухов, 1974, 1983; Новосельская и др., 1982; Коновалов, 1980). Анализ результатов многолетних исследований (1971–1979 гг.) по двум полиморфным локусам, кодирующим синтез ферментов — лактатдегидрогеназы и фосфоглюкомутаза, показал, что давление отбора в пользу гетерозигот особенно значительно на нерестилищах раннемигрирующих групп субпопуляций (весенняя раса), в то время как в позднемигрирующих субпопуляциях (летняя раса) биохимический полиморфизм близок к селективно-нейтральному (Алтухов и др., 1983). Исследована связь между физико-химическими особенностями водного режима нерестилищ и частотами генов полиморфных локусов лактатдегидрогеназы и фосфоглюкомутаза; показана достоверная корреляция исследуемых аллельных частот с температурой воды и концентрацией водородных ионов (Новосельская и др., 1982). На основе аллозимной изменчивости исследована гетерогенность нерки р. Камчатка (Пустовойт, Макоедов 1992; Пустовойт, 1993), показана адаптация нерки к физико-химическим условиям не только озерных, но и речных нерестилищ (Алтухов, 1983). В последующем по материалам 1990–1998 гг. была оценена генетическая гетерогенность и уровень внутривидовой подразделенности стада нерки р. Камчатка по набору из 14-ти наиболее дискриминирующих аллозимных локусов, позволяющих с максимальной

степенью вероятности идентифицировать нерку данной локальности в морских смешанных уловах (Шпигальская и др., 2005).

В популяции нерки озера Начикинское была выявлена сложно структурированная и дифференцированная пространственная организация, носящая иерархический характер, каждому уровню которой соответствует определенная степень изоляции (Варнавская и др., 1988). Осредненная оценка коэффициента миграции производителей между субпопуляциями составляет 4,3%, обмен генами идет в зависимости от численности и соотношения полов, в основном за счет миграции самцов (Варнавский, Варнавская, 1985).

В популяциях нерки озер Ближнее и Дальнее показано отсутствие пространственной изменчивости, что может быть связано со слабой репродуктивной изоляцией, либо единообразием внешних условий на нерестилищах этих популяций (Варнавская и др., 1988).

Исследована связь между генетической структурой по трем изоферментным локусам и внутривидовой дифференциацией по полу, возрасту и скорости роста в нерестовых стадах нерки озер Начикинское, Дальнее и Ближнее, получены дополнительные доказательства отбора в пользу гетерозигот (Алтухов, Варнавская, 1983).

В озере Двухюрточное изменчивость по частотам лактатдегидрогеназы и фосфоглюкомутазы оказалась недостоверной, данная популяция характеризуется как пространственно подразделенная, но со значительно меньшим уровнем генетической дифференциации локальных группировок, чем озеро Начикинское. Низкий уровень генетической дифференциации может быть связан с большой величиной обмена генами, обусловленной дефицитом нерестовых площадок (Варнавская и др., 1988).

Популяционно-генетические исследования, основанные на принципах биохимической генетики, проведенные С.П. Пустовойтом в 1987–1992 гг. выявили генетическую дифференциацию нерки рек Охота, Палана, Хайрюзова, Большая, Озерная, Авача и Пахача. Обнаружены изменения аллельных частот трех аллозимных локусов как между выборками из разных этапов нерестового

хода, так и за отдельные годы (Пустовойт, 1994). Выполненный в этой же работе анализ пространственной структуры продемонстрировал генетическое сходство между западнокамчатскими популяциями рек Палана, Хайрюзова, Большая, Озерная. Нерка р. Охота по генетическим параметрам оказалась более близка к особям восточнокамчатских рек (Камчатка, Авача), максимально отличной от всех была популяция р. Пахача (Пустовойт, 1994). Показано, что малочисленная популяция нерки р. Ола (Тауйская губа, Охотское море) так же характеризуется высокой гетерогенностью, с ней наиболее сходна популяция р. Пахача (Пустовойт, 2001).

Проведенные совместные исследования ученых России, США и Канады позволили расширить количество анализируемых генов, увеличить число выборок, выйти на качественно иной уровень исследований, способный дать достоверные оценки генетических взаимоотношений между популяциями (Varnavskaya, Everett, 1993; Varnavskaya et al., 1993; Varnavskaya et al., 1994a,b). Были описаны четыре типа географической изменчивости генных частот: I — гены, полиморфные на всем ареале, II — гены, мономорфные или почти мономорфные в одних регионах и высокополиморфные в других, III — гены мономорфные на всем ареале и низкополиморфные в отдельных регионах, IV — гены, почти мономорфные на всем ареале, с появляющимися иногда в разных регионах редкими аллелями (Варнавская, 2006).

В заключение данного раздела необходимо отметить, что у нерки обнаружен весьма низкий аллозимный полиморфизм и количество информативных аллозимных генов часто недостаточно для дифференциации близлежащих популяций (Wood et al., 1994; Варнавская, 2001, 2006). Однако у этого вида в процессе исследований был отмечен относительно высокий уровень изменчивости генных частот между регионами, а так же, в связи с наличием сезонно-экологических форм, в пределах крупных речных и озерных систем (Варнавская, 2005). Достаточно обоснована точка зрения ряда ученых, объясняющая этот факт наличием многих центров расселения данного вида в период реколонизации территорий, освобождающихся из-под отступающих

ледников, что, в совокупности с сильно выраженным хомингом, обусловило более сложную и дифференцированную структуру вида у нерки по сравнению с другими тихоокеанскими лососями (Варнавская и др., 1996). Таким образом, высказанная ранее точка зрения (Кирпичников, Муске, 1981) о беспорядочном в географическом смысле, «сетчатом характере» генетической структуры у нерки и об отсутствии у нее следов общности происхождения стад на уровне крупных региональных комплексов, представляется менее убедительной.

1.2.2. Полиморфизм мтДНК

Новый класс генетических маркеров появился в середине 80-х годов XX в. после открытия полиморфизма ДНК, благодаря развитию методов выделения, клонирования и разрезания (рестрикции) генов, и самого важного импульса — разработки методики полимеразной цепной реакции (Алтухов, Салменкова, 2002; Сулимова, 2004).

В эукариотических клетках основная масса ДНК заключена в ядре, также незначительные количества присутствуют в митохондриях и хлоропластах, что позволяет подразделить ее на ядерную и митохондриальную (хлоропластную) (Эллиот, Эллиот, 2000). Полиморфизм в настоящее время найден в митохондриальной (мт) и ядерной ДНК, в их кодирующей и некодирующей частях, в уникальных и повторяющихся последовательностях (Алтухов, Салменкова, 2002).

ДНК-содержащие структуры в митохондриях были выявлены в 1960-х годах (Рычков, 2004). Митохондриальная ДНК обладает рядом особенностей, таких как материнское клональное наследование, быстрая скорость эволюции, неравновесие трансверсий и транзиций, открывающих большие возможности для использования в популяционно-генетических исследованиях (Гречко, 2002). Высокая степень изученности генетического аппарата митохондрий обусловлена небольшими размерами митохондриального генома,

отличающегося плотной локализацией генов, отсутствием интронов и протяженных нетранскрибируемых участков (Рычков, 2003).

При определении полной нуклеотидной последовательности мтДНК у позвоночных обнаружены 37 структурных генов (2 рибосомальных гена, 22 гена транспортных РНК, 13 генов, кодирующих белки) и некодирующая область, участвующая в репликации — D-петля (Ferris, Berg, 1987). Контрольная область состоит из центральной консервативной последовательности, которая фланкируется, как правило, полиморфными доменами, содержащими тандемные повторы от четырех до сотен пар оснований (Алтухов, Салменкова, 2002). D-петля (от англ. «displacement loop»), протяженность которой составляет порядка 1,1 тыс. пар нуклеотидов, обеспечивает ассоциацию митохондриальной хромосомы на мембране органеллы и содержит структуры, необходимые для инициации и регуляции процессов репликации и транскрипции мтДНК (Рычков, 2003). Подобная организация генов мтДНК была выявлена и у рыб рода *Oncorhynchus* (Thomas, Beckenbach, 1989).

Митохондриальные гены наследуются у большинства видов по материнской линии (матрилинейно) не подвергаясь рекомбинации (Brown et al., 1979). Соответственно эффективный размер популяции для мтДНК составляет $\frac{1}{4}$ от аналогичной оценки для ядерных генов (Nei, Tajima, 1981; Хедрик, 2003). Митохондриальный геном отличается выраженной нестабильностью — скорость нуклеотидных замен (преимущественно нейтральных) в митохондриальной ДНК превышает таковую для ДНК ядерной в 10–20 раз и в среднем составляет 1–2% нуклеотидных замен за миллион лет, что приводит к более высокому уровню выявляемой изменчивости (Brown et al., 1979; Ferris et al., 1983; Ferris, Berg, 1987; Avise, 1994). Установлено, что скорость накопления мутаций в последовательностях мтДНК различается для разных областей молекулы (Churikov et al., 2001). В большинстве случаев вариабельность митохондриальной ДНК обусловлена точечными заменами оснований

(транзициями и трансверсиями), реже делециями и вставками различной длины (Рычков, 2003). В результате возникает широкий внутривидовой полиморфизм и ощутимые изменения выявляются даже в пределах нескольких поколений, что очень удобно для популяционных исследований (Сингер, Берг, 1998а,б). Таким образом, с помощью мтДНК можно оценить время дивергенции и сопоставить ее с крупными геологическими событиями в регионе, такими, например, как периоды оледенений в четвертичном периоде (Avice, 1994). Тем не менее, дивергенция между близкими популяциями, которые заселяли освобождающиеся после последнего оледенения (плейстоценового) территории, скорее всего, будет невелика. С большей вероятностью может быть обнаружена дивергенция, которая образовалась в результате эффекта основателя или дрейфа генов, на основе существовавшего ранее полиморфизма мтДНК (Billington, Hebert, 1991). Следы изоляции популяций, имевшей место в прошлом, сохраняются в мтДНК на протяжении периода более длительного по сравнению с ядерной ДНК (Алтухов и др., 2004).

В настоящее время распространены два основных метода и подхода к исследованию полиморфизма мтДНК — это высокоразрешающее рестрикционное картирование тотальной молекулы и прочтение первичной нуклеотидной последовательности ДНК, или секвенирование (от англ. «sequence») (Рычков, 2003).

На уровне мтДНК хорошо различаются крупные региональные популяционные комплексы лососей, изолированные поколения горбуши, внутривидовые формы, такие как жилая и проходная у *Salmo salar* и у *Oncorhynchus nerka* (Алтухов, Салменкова, 1997). Для горбуши показана гетерогенность популяций на межрегиональном уровне, но выявлен невысокий уровень генетической подразделенности популяций внутри регионов (Шпигальская и др., 2011, 2012).

В работах, выполненных по нерке п-ова Камчатка, была изучена пространственная и временная генетическая изменчивость и дивергенция мтДНК на примере озера Азабачье (Брыков и др., 2003). Полученные данные

позволили сделать вывод о значимых генетических различиях по данным генетическим маркерам между отдельными нерестовыми группировками нерки этого озера. Тем не менее, отмечено, что анализ мтДНК не выявил высокой величины различий между сезонными расами у нерки. Это позволяет полагать, что дифференциация нерки на «сезонные расы» имеет недавнюю историю, и, по-видимому, в каждом нерестовом районе темпоральные субпопуляции возникают независимо (Брыков и др., 2003).

Вл. А. Брыков с соавторами проводили исследования о влиянии биотопов размножения на генетическую дифференциацию популяций нерки (Брыков и др., 2005). Был выполнен сравнительный анализ популяций нерки в девяти популяциях из трех озерно-речных систем Чукотки и Камчатки. Полученные данные позволили выявить значимый уровень различий между большинством исследованных выборок. Показано, что величина генетических различий между популяциями невелика и часто не коррелирует с географическим расстоянием между ними. Анализ популяций при группировке выборок по их принадлежности к биотопам нерестилищ (речные или озерные) выявляет в целом большее генетическое сходство между ними, чем при объединении популяций по их географической принадлежности (озерно-речные системы). Выявлено, что различия между озерными и речными популяциями в озерно-речных системах увеличиваются с юга на север (Брыков и др., 2005).

1.2.3. Изменчивость микросателлитных локусов

Геном эукариот составляют уникальные и повторяющиеся последовательности нуклеотидов. Значительная часть повторяющейся (сателлитной) ядерной ДНК состоит из тандемно повторенных копий, так называемых коровых (от англ. core) последовательностей длиной от двух до нескольких тысяч пар оснований (Алтухов, Салменкова, 2002; Алтухов и др., 2004). Данные повторы представляют собой обязательный компонент ядерной ДНК у всех видов эукариот, наблюдаются в разных частях генома (хромосомах)

и получили рабочее название «варьирующего числа tandemных повторов» (VNTR, Variable Numbers of Tandem Repeats) (Алтухов, Салменкова, 2002). В последнее время в качестве информативных популяционно-генетических маркеров широко применяются, так называемые, микросателлитные последовательности ядерной ДНК, представляющие собой до сотни tandemных повторов коротких последовательностей, имеющих длину от 1 до 6 пар нуклеотидов (Tautz, 1989). Микросателлиты обозначаются как SSR (Simple Sequence Repeat) или STR (Short Tandem Repeat), относятся к умеренно повторяющейся ядерной ДНК (Алтухов, Салменкова, 2002). В классе рыб один локус данного маркера встречается приблизительно на каждые 10000 пар нуклеотидов (Wright, 1993).

Микросателлитам присущ ряд свойств, которые позволяют успешно использовать их в популяционно-генетических исследованиях: рассеянность в большом количестве по геному, локализация в его некодирующих частях и, следовательно, селективная нейтральность (Estoup et al., 1993; Алтухов, Салменкова, 2002). Для этих локусов характерны кодоминантное наследование, быстрая эволюция и высокая скорость спонтанного мутирования — 10^{-2} – 10^{-4} на поколение (Weber, Wong, 1993; Ellegren, 1995; Алтухов, Салменкова, 2002; Li et al., 2002). Общий уровень гетерозиготности по ним превышает аллозимную, что во многих случаях позволяет лучше дифференцировать популяции (Allendorf, Seeb, 2000; De Woody, Avise, 2000; Варнавская, 2006). Участки ДНК, фланкирующие микросателлиты, консервативны у близких видов, что позволяет использовать одни и те же праймеры при их амплификации (Алтухов, Салменкова, 2002; Ellegren, 2004). Для анализа этих локусов требуется очень малое количество крови или какой-либо ткани организма, поэтому возможно как прижизненное взятие образцов, так и использование для анализа частично деградировавших образцов (Алтухов, Салменкова, 2002; Никитина, Назаренко, 2004).

Следует отметить, что микросателлиты не эффективны для эволюционных исследований на межвидовом и более высоких уровнях, так как

наблюдаемое сходство в величине аллелей может отражать не идентичность их происхождения, а явление гомоплазии, возникающее из-за высокой скорости мутирования, когда микросателлитные аллели одинакового размера образуются в результате конвергенции от разного числа прямых или обратных мутационных событий (Алтухов, Салменкова, 2002). Так же в исследованиях с использованием данных маркеров часто встречаются так называемые нуль-аллели — отсутствие ПЦР-продукта, вызванное мутациями во фланкирующих микросателлит последовательностях ДНК, на которые гибридизуются праймеры. Это приводит к тому, что микросателлитный аллель, сцепленный с такой мутацией, не амплифицируется, приводя к появлению ложной гомозиготности у гетерозиготных особей, что часто не позволяет точно идентифицировать генотипы (Кордичева и др., 2010).

Для выявления внутривидовой подразделенности крупных стад нерки на основе изменчивости микросателлитных локусов одними из первых были исследованы бассейны нерестовых водоемов Британской Колумбии (рр. Насс и Скина, з-в Беркли) (Beacham et al., 1998, 1999, 2000). По шести микросателлитным локусам проанализирована популяционная изменчивость трех озер (Хендерсон, Грейт Централ и Шпрот), полученные результаты позволили осуществить идентификацию данных локальных стад в смешанных уловах (Beacham et al., 1998, 1999). Показаны различия между экологическими типами субпопуляций озера Илиамна (Nabicht et al., 2004). Выявлена специфичность в распределении аллелей микросателлитных локусов для четырех популяций нерки, исследованных в заливе Кука (Seeb et al., 1998). С использованием аллельной изменчивости микросателлитов на примере популяций нерки и атлантического лосося изучались процессы формирования проходной и жилой экологических форм (Taylor et al., 1996; Tessier, Bernatchez, 1999).

Некоторые камчатские популяции вошли в состав базы данных (около 300 выборок нерки Азии и Северной Америки) по частотам 14-ти микросателлитных локусов, при анализе которой была показана

выраженная дифференциация как региональных групп, так и локальных популяций внутри них (Beacham et al., 2006a,b; Варнавская, 2006).

На основе анализа микросателлитных локусов ядерной ДНК показана гетерогенность нерки из бассейнов пяти крупнейших озерно-речных систем полуострова Камчатка: р. Озерная, р. Большая, р. Палана, р. Камчатка и р. Пахача. Представлены результаты, свидетельствующие о выраженной генетической дивергенции популяций двух географических регионов: Западной (реки Озерная, Большая, Палана) и Восточной (реки Камчатка и Пахача) Камчатки (Хрусталева и др., 2010). Проведен сравнительный анализ результатов при использовании двух методов — *rapd-pcr* и анализа полиморфизма микросателлитных локусов, для исследования популяционной структуры нерки Западной Камчатки (Зеленина и др., 2006).

Оценены сезонная и межгодовая генетическая изменчивость нерки двух озерно-речных систем Восточной и Западной Камчатки. Подтверждена стабильность аллельных и генотипических частот шести микросателлитных локусов ДНК в смежных поколениях и подходах нерки р. Большая (Хрусталева, Стоклицкая, 2006; Хрусталева, Зеленина, 2008).

1.2.4. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP)

В настоящее время ряд исследователей для оценки популяционной изменчивости выбирает метод однонуклеотидного полиморфизма (SNP — Single Nucleotide Polymorphisms) — это однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в некоторой популяции имеются различные варианты, причем редкий аллель встречается с частотой не менее 1% (Brookes, 1999). Метод представляет собой идентификацию аллельных вариантов (замен) однонуклеотидного сайта какой-либо ДНК-последовательности (Morin et al., 2004). Одновременно с помощью автоматизированного сиквенса или микрочипов можно проанализировать несколько тысяч SNP, что особенно важно в популяционных исследованиях, требующих обработки существенного

объема материала (Gibson, 2002; Хрусталева, 2007). Хотя метод выявляет только два аллеля, количество SNP в геноме велико и значительно превышает, к примеру, число микросателлитных локусов (Morin et al., 2004). Так, у большинства видов однонуклеотидные замены встречаются один раз на 200–500 нуклеотидов (Morin et al., 2004; Nielsen, 2000). В кодирующих последовательностях однонуклеотидный полиморфизм встречается в четыре раза реже (Brookes, 1999). К примеру, у человека число SNP на ген колеблется от 0 до 29, и в кодирующих последовательностях гена находятся в среднем по четыре полиморфных сайта с SNP (Cargill et al., 1999). Существенное преимущество метода заключается в том, что он надежен, полученные данные однозначно трактуются, его результаты полностью воспроизводимы при проведении параллельных исследований в различных лабораториях вне зависимости от способа анализа, используемых реактивов и оборудования. (Zelenina et al., 2005; Зеленина и др., 2011). Так же возможно создание общих баз данных. Достоинства данного метода были продемонстрированы на примере тихоокеанских лососей (Seeb et al., 2005a,b; Templin et al., 2005; Zelenina et al., 2005). В настоящее время в Университете штата Вашингтон, США (School of Aquatic & Fishery Sciences, University of Washington) создан генетический банк данных по 45 SNP локусам нерки, в его состав вошли выборки из большинства популяций североамериканской части ареала (Smith et al., 2005b; Elfstrom et al., 2006; Nabicht et al., 2010). Бинарная природа SNP-маркеров и высокая дифференцирующая способность, находящиеся под отбором SNP-локусов, дают возможность определять принадлежность рыбы к популяциям из большинства промысловых регионов с существенно большей точностью, чем это было возможно ранее, приближаясь к стандартам, принятым в судопроизводстве (Зеленина и др., 2011). В то же время, в результате численного моделирования было показано, что 10 диаллельных SNP по объему информации эквивалентны одному микросателлитному локусу с 11-ю аллелями (Morin et al., 2004). Невысокая информативность отдельного биаллельного SNP-локуса приводит к необходимости использовать большой

пул маркеров (Vignal et al., 2002; Тимошкина и др., 2010). Высокая плотность и особенности локализации в геноме требуют строгого отбора локусов на независимое наследование и селективную нейтральность, а разработка и апробация данных маркеров — больших затрат средств и времени (Тимошкина и др., 2010).

Новые технологии секвенирования открывают новые возможности в популяционной генетике рыб (Зеленина и др., 2011). Для видовой дифференциации ряда осетровых видов были разработаны SNP-маркеры на основании сиквенсов участка митохондриального гена цитохрома b (Rehbein, 1997). Метод использовали для идентификации близкородственных видов *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. naccarii* и *A. persicus* (Ludwig et al., 2000). Проведены популяционные исследования для представителей рода *Oncorhynchus* (Smith et al., 2005a; Smith, Seeb, 2008).

У нерки Камчатки были изучены пять полиморфных SNP-локусов и шесть микросателлитных локусов в пяти озерно-речных системах. Выявлены значимые генетические различия между локальными популяциями на исследованной части ареала, выделены два региональных комплекса западного и восточного побережий, точность индивидуальной идентификации нерки с применением микросателлитов, оказалась существенно выше, чем при использовании сравнимого числа SNP маркеров (Хрусталева и др., 2010). Исследование вариабельности пяти локусов в выборках неполовозрелой нерки в западной части Берингова моря показало, что 72% особей имели азиатское происхождение (Гриценко и др., 2007). Изучена изменчивость 45 локусов однонуклеотидного полиморфизма ДНК в четырех крупнейших природных популяциях нерки азиатского побережья Тихого океана, предложен дифференциальный подход к выбору SNP-маркеров, выявлены адаптивно-значимые локусы (Хрусталева и др., 2013).

Глава 2. ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

Всего в процессе работы было проанализировано 39 выборок нерки из нерестовых водоемов полуострова Камчатка и морских смешанных скоплений в количестве 1946 экземпляров (табл. 2.1, рис. 2.1, 2.2). Объем большинства выборок составил около 50 экз.

Материал, собранный в разные годы включает: 4 выборки из уловов закидных неводов ОАО «Озерновский РКЗ № 55» в нижнем течении р. Озерная (200 экз.); 2 выборки, собранные в непосредственной близости от рыбоучетного заграждения в истоке р. Озерная (100 экз.); 13 выборок из нерестовых водоемов восточного побережья Камчатки (бассейн р. Камчатка, реки Карагинского и Олюторского заливов, Командорские о-ва — о. Беринга) (638 экз.); 4 выборки из морских смешанных уловов, отобранные при проведении траловых съемок молоди тихоокеанских лососей на НИС «Профессор Кагановский» (ФГУП «ТИНРО-Центр») (153 экз.) (табл. 2.2). Кроме того, в исследовании использованы опубликованные ранее Н.В. Варнавской частоты аллелей четырех микросателлитных локусов в 16 выборках нерки (855 экз.) с нерестилищ оз. Курильское (1989 и 2000 гг.) (Варнавская, 2006) (табл. 2.1, рис. 2.2).

Весь материал из нерестовых водоемов включает только производителей нерки. Морские смешанные выборки — это молодь из нагульных скоплений, средние размерные показатели которой представлены в таблице 2.2.

Тканевые пробы — фрагменты грудных плавников или сердечной мышцы, отбирали у недавно пойманных рыб и фиксировали в 96% этаноле. До проведения лабораторных исследований этанол меняли по мере необходимости, пробы хранили в низкотемпературной морозильной камере (от -40 до -70 °С).

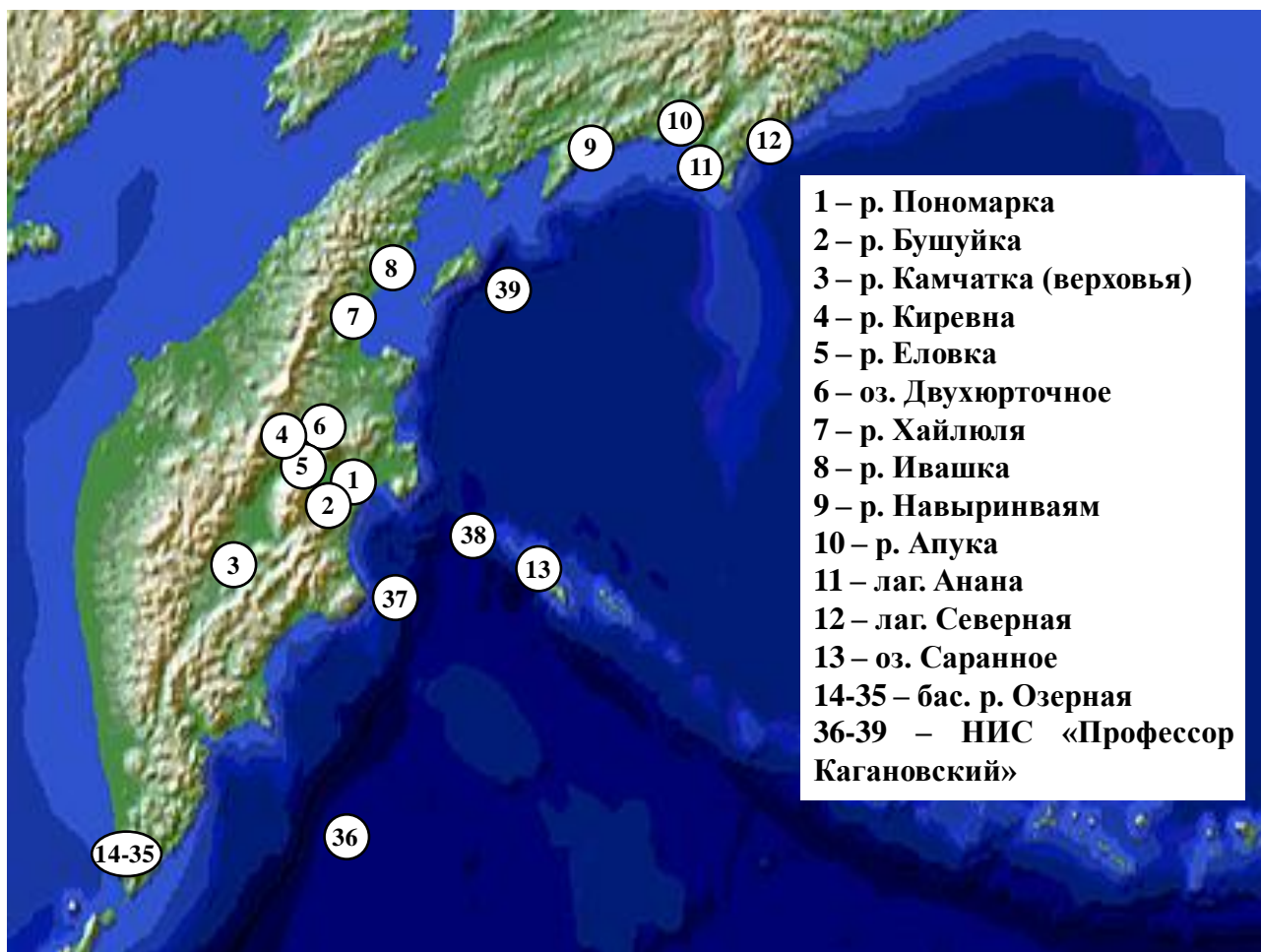


Рисунок 2.1. Карта-схема мест взятия проб для исследования популяционно-генетической изменчивости нерки Камчатки. Номера выборок соответствуют таковым в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Места сбора и объем проанализированного материала при исследовании популяционно-генетической изменчивости нерки Камчатки

№	Локальность		Дата сбора	Объем выборки, экз.
1	Оз. Азабачье	р. Пономарка	30.06.2009	50
2	(бас. р. Камчатка)	р. Бушуйка	14.08.2010	48
3		р. Камчатка (верховья)	01.07.2009	50
4	Бас. р. Камчатка	р. Киревна	24.07.2003	50
5		р. Еловка	18.06.2010	50
6		оз. Двухюрточное	13.07.2003	50
7		Карагинский залив	р. Хайлюля	07–10.07.2010
8		р. Ивашка	23.07.2010	50

Окончание таблицы 2.1

9	Олюторский залив	р. Навыринваям	02.10.2010	50	
10		р. Апука	26.05–01.06.2010	46	
11		лагуна Анана	06.07.2010	48	
12		лагуна Северная	23.06.2010	48	
13	Командорские о-ва	оз. Саранное	14.06.2011	50	
14	Бас. оз. Курильское	р. Озерная	13.07.2011	50	
15		р. Озерная	02.08.2011	50	
16		р. Озерная	22.07.2011	50	
17		р. Озерная	16.08.2011	50	
18		оз. Курильское, РУЗ	06.08.2010	50	
19		оз. Курильское, РУЗ	25.08.2010	50	
20		р. Выченкия*	28.07.2000	100	
21		р. Кирушутк*	15.08.1989	72	
22		р. Кирушутк*	31.07.2000	50	
23		бух. Южная*	28.08.2000	53	
24		бух. Южная*	24.08.1989	50	
25		бух. Озерная*	09.10.2000	50	
26		бух. Северная ближняя*	09.10.2000	50	
27		р. Гаврюшка*	02.08.2000	50	
28		бух. Гаврюшка*	23.08.1989	35	
29		бух. Гаврюшка*	17.08.2000	50	
30		бух. Гаврюшка, м. Тугумынк*	18.08.2000	50	
31		р. Этамынк*	05.08.2000	50	
32		бух. Северная дальняя*	30.08.2000	50	
33		бух. Хакыцин*	31.08.2000	50	
34		бух. Оладочная*	23.09.1989	45	
35		бух. Оладочная*	08.10.2000	50	
36		Морские смешанные выборки	51°52'1" с. ш., 161°36'7" в. д.	22.10.2010	48
37			54°40'4" с. ш., 162°50'5" в. д.	20.10.2010	43
38			58°24'2" с. ш., 165°08'7" в. д.	15.10.2010	28
39	55°29'9" с. ш., 164°48'1" в. д.		16.10.2010	34	
Всего				1239	

Примечание. РУЗ — рыбоучетное заграждение, * — использованы опубликованные данные по частотам аллелей микросателлитных локусов (Варнавская, 2006).

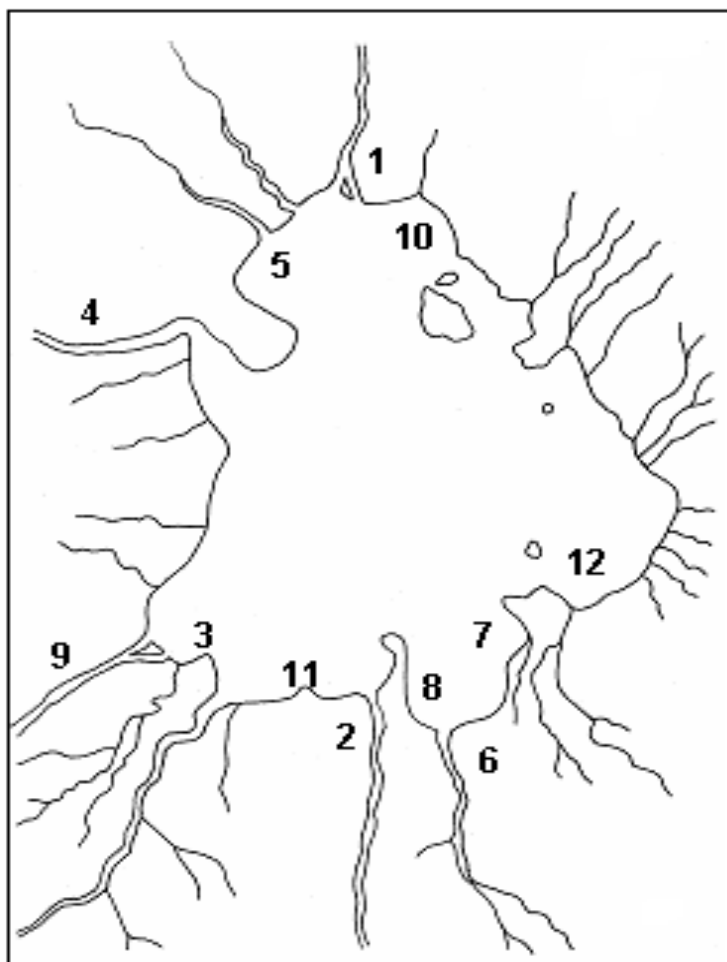


Рисунок 2.2. Карта-схема сбора материала для исследования изменчивости микросателлитных локусов у нерки оз. Курильское (1 — р. Выченкия, 2 — р. Кирушутк, 3 — бух. Южная, 4 — бух. Озерная, 5 — бух. Северная ближняя, 6 — р. Гаврюшка, 7– бух. Гаврюшка, 8 — бух. Гаврюшка, мыс Тугумынк, 9 — р. Этамынк, 10 — бух. Северная дальняя, 11 — бух. Хакыцин, 12 — бух. Оладочная).

Таблица 2.2. Характеристика выборок молоди нерки из траловых уловов (НИС «Профессор Кагановский»)

№	Координаты взятия проб	Дата	Средняя длина (см)	Средняя масса (г)
1	51°52'1" с. ш., 161°36'7" в. д.	22.10.2010	38.95	73.10
2	54°40'4" с. ш., 162°50'5" в. д.	20.10.2010	22.05	11.83
3	58°24'2" с. ш., 165°08'7" в. д.	15.10.2010	34.57	47.61
4	55°29'9" с. ш., 164°48'1" в. д.	16.10.2010	24.00	17.53

2.2. Методы

2.2.1. Молекулярно-генетические методы

Выделение и очистку тотальной ДНК проводили стандартным способом с использованием метода протеиназного гидролиза в присутствии додецилсульфата натрия (SDS — sodium dodecyl sulfate) с последующим высаливанием белков, удалением их вместе с клеточными обломками центрифугированием и осаждением ДНК из супернатанта изопропанолом (Маниатис и др., 1984; Sambrook et al., 1989; Коничев и др., 2012). Этот метод считается наиболее универсальным и качественным, поскольку позволяет обеспечить высокую степень очистки. С другой стороны, он является и наиболее трудоемким.

Выделение ДНК проводили в три этапа. На первом этапе фрагменты ткани гомогенизировали в 500 мкл лизирующего буфера (5 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота, pH 8.0), 10 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 0.1M NaCl, добавляли 50 мкл додецилсульфата натрия (концентрация 10%), 2.5 мкл протеиназы-K (концентрация 20 мг/мл) и помещали в термостат (+37 °C) до полного просветления лизата (12–16 ч).

На втором этапе к полученному лизату добавляли 500 мкл хлороформа, тщательно перемешивали на вортексе в течение 10 мин до образования однородной эмульсии и затем центрифугировали 10 мин в режиме 8000 об./мин и $t = -4$ °C. После центрифугирования в пробирке образуется три фазы. Верхнюю фазу, содержащую ДНК (примерно 750 мкл), аккуратно отбирали и переносили в чистую пробирку. Затем вносили 500 мкл хлороформа и проводили повторное перемешивание на вортексе и центрифугирование в описанном режиме. После повторного отбора верхней фазы в раствор добавляли 250 мкл ацетата аммония (5M) и 750 мкл изопропилового спирта для осаждения ДНК и высаливания белков. Перемешивали содержимое пробирки до появления «белкообразных» нитей в растворе, помещали на 2–3 ч в морозильную камеру (при $t = -40$ °C). Далее образец центрифугировали в вышеуказанном режиме. Затем супернатант аккуратно сливали. Осадок ДНК на

стенках подсушивали в открытом виде при комнатной температуре в течение 30–40 мин. Затем, в зависимости от количества, растворяли в 100–500 мкл ТЕ-буфера (10mM трис-HCl, 2 mM ЭДТА, pH 7.8), перемешивали на вортексе и оставляли в холодильнике ($t=+4$ °C) на 12 ч.

На третьем этапе в раствор ДНК добавляли РНК-азу, из расчета: на каждые 100 мкл раствора — 0.5 мкл РНК-азы. Тщательно перемешивали и приблизительно 40–45 мин инкубировали в термостате при $t= +37$ °C. Далее добавляли протеиназу-К в том же количестве, что и РНК-азу. Инкубировали в течение 1.5–2.0 ч, при $t= +37$ °C. Затем раствор ДНК дважды обрабатывали хлороформом, перемешивали на вортексе в течение 10 мин, центрифугировали в указанном выше режиме, отбирали верхнюю фракцию и перемещали ее в новые пробирки. Добавляли 10 мкл NaCl и 96%-ый этанол в объеме в 2–2.5 раз превышающем объем ранее добавленного ТЕ-буфера, перемешивали до формирования белой взвеси ДНК. На этой стадии спиртовой раствор ДНК помещали в морозильную камеру и хранили при температуре не выше -40 °C.

Перед проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР) спиртовой раствор ДНК центрифугировали в указанном выше режиме, супернатант аккуратно сливали, осадок ДНК высушивали в течение 30 мин при комнатной температуре и растворяли в ТЕ-буфере (объем от 100 до 500 мкл). До его дальнейшего использования раствор ДНК хранили в морозильной камере (-40 °C).

Для проверки результатов выделения ДНК использовали метод горизонтального электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК в агарозном геле. Для этого готовили пластину 1.2%-ного агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в 1xTBE буфере (pH 8.0) агарозу (Маниатис и др., 1984). Гель окрашивали бромистым этидием, сравнивали интенсивность свечения в УФ-свете полос ДНК в анализируемых и эталонных образцах. На некачественную очистку образцов ДНК указывало наличие «шмеров» выше или ниже основной полосы.

Полученные экстракты ДНК использовали при проведении реакции амплификации методом ПЦР, который позволяет получить множество копий необходимого фрагмента ДНК в короткое время (Mullis et al., 1986). Принцип метода ПЦР основан на использовании термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) (Saiki et al., 1988). Предназначенный для амплификации двуцепочечный участок ДНК (мишень) служит матрицей для синтеза *in vitro* комплементарной последовательности. Реакция катализируется термостабильной Taq-полимеразой в солевом буфере, в присутствии двух праймеров — синтетических одноцепочечных олигонуклеотидов, комплементарных к последовательностям, окружающим амплифицируемый фрагмент и дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTPs). Классическая ПЦР включает три основные циклически повторяющиеся стадии — денатурация матричной ДНК при 93–96 °С, отжиг (присоединение) праймеров к гомологичным последовательностям (40–75 °С) и синтез из свободных dNTPs комплементарных цепей ДНК при 60–75 °С путем удлинения праймерных участков (элонгация или собственно матричный синтез ДНК) (Алтухов, Салменкова, 2002; Ребриков и др., 2009). В результате повторения циклов ПЦР увеличение числа копий амплифицируемого участка идет в геометрической прогрессии, что позволяет за 25–40 циклов наработать целевую ДНК в количестве, достаточном для ее детекции с помощью электрофореза.

Амплификацию проводили в термоциклерах Mastercycler gradient AG 22331 (Eppendorf, Германия) и Veriti 9902 (Applied Biosystems, США) с использованием наборов реагентов, содержащих готовую лиофилизированную смесь для полимеразной цепной реакции — Gene Pak PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», РФ). В пробирки со смесью для ПЦР добавляли 10 мкл буфера, 5 мкл геномной ДНК и 5 мкл смеси специфичных праймеров. ПЦР микросателлитных локусов нерки проводили по ранее описанной для кеты *O. keta* схеме (Афанасьев и др., 2006), которая состояла из денатурации в течение 2 мин при 94 °С, затем проведения 8 циклов, включающих: 1 мин денатурации ДНК-матрицы при $t=94$ °С, 30 с отжига праймеров при X °С, 15 с

элонгации при 72 °С; далее следовал 21 цикл, включающий: 30 с при 94 °С, 30 с при X °С и 15 с при 72 °С; завершающая элонгация — 3 мин при 72 °С (X — температура отжига для каждой пары праймеров, использованных в настоящей работе, приведена в табл. 2.3).

Продукты амплификации разделяли в 6% неденатурирующем полиакриламидном геле в 0.5x ТБЕ-буфере (рН 8.0) с помощью вертикального электрофореза (в камерах VE-20) при постоянном напряжении 300 В в течение 2.0–3.5 ч (Маниатис, 1984).

В качестве маркера длины фрагментов использовали ДНК плазмиды *pBR322*, обработанную рестриктазами *HpaII* или *HaeIII* (ООО «СибЭнзим», РФ).

После проведения вертикального электрофореза гели окрашивали бромистым этидием в течение 10–15 мин и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете с помощью прибора Transilluminator TSP-20LC при длине волны 254 нм. Запись изображения производили с помощью программы GenImager с последующей обработкой в программе PhotoFiltre или PhotoShop.

В настоящей работе использовали праймерные последовательности, разработанные в экспериментальных исследованиях разных видов семейства лососевых (*Salmonidae*), поскольку известно, что нуклеотидная последовательность одних и тех же локусов у близкородственных видов практически не различается (Алтухов, Салменкова, 2002).

С целью подбора полиморфных и достаточно объективно интерпретируемых микросателлитных маркеров популяционной структуры нерки Камчатки были апробированы тридцать шесть локусов: *Oki1a*, *Oki1b*, *Oki6*, *Oki10*, *Oki23* (Smith et al., 1998), *Ots100*, *Ots102*, *Ots107*, *Ots108* (Nelson, Beacham, 1999), *Ots103* (Small et al., 1998), *Ots2*, *Ots3* (Banks et al., 1999), *Omy77* (Morris et al., 1996), *OtsG68*, *OtsG85*, *OtsG253b* (Williamson et al., 2002), *One101*, *One102*, *One103*, *One104*, *One105*, *One109*, *One111*, *One114* (Olsen et al., 2000), *Oke3*, *Oke11* (Buchholz et al., 2001), *Omy301* (Jackson et al., 1998), *Omy1011* (Spies et al., 2005), *Ssa197* (O'Reilly et al., 1996), *Ssa2019* (Sánchez et al., 1996),

Ogo2G, *Ogo8* (Olsen et al., 1998b), *Omm1070* (Rexroad et al., 2001), *Omm1037G* (Rexroad et al., 2002), *One8* (Scribner et al., 1996), *Str60* (Estoup et al., 1993) (табл. 2.3).

Таблица 2.3. Апробированные для анализа нерки Камчатки микросателлитные локусы и соответствующие праймерные последовательности

№ п/п	Локус	Источник информации	T °C отжига	Последовательность праймеров
1	<i>Ogo2G</i>	Olsen et al., 1998b	43.0	F: ACATCGCACACCATAAGCAT R: TTTCTTCGACTGTTTCCTCTGTGTTGAG
2	<i>Ogo8</i>	Olsen et al., 1998b	45.0	F: TCGCAGAGCGATACCAATG R: GAGGAAGACCATTGAGGTGG
3	<i>Oke11</i>	Buchholtz et al., 2001	45.0	F: CAAGGTGATGCGTGCATACAC R: TCATTTATTTTGCCTGTTTCTACCC
4	<i>Oke3</i>	Buchholtz et al., 2001	48.0	F: ACCCTGAGAGCAATCAAC R: TCAGGGATATGCAGTAAATAGTA
5	<i>Oki10</i>	Smith et al., 1998	46.0	F: GAGTGCTGGACAGATTGGATT R: GGTTGGACCTCATGGTGAA
6	<i>Oki1a</i>	Smith et al., 1998	57.5	F: AGGATGGCAGAGCACCACT R: CACCATAATCACATATTCAGA
7	<i>Oki1b</i>	Smith et al., 1998	57.5	F: AGGATGGCAGAGCACCACT R: CACCATAATCACATATTCAGA
8	<i>Oki23</i>	Smith et al., 1998	54.0	F: CATCACACGATTCTAGAGTGA R: CCTCATCCACGTTAGCATCA
9	<i>Oki6</i>	Smith et al., 1998	49.0	F: TCAACAGATAGACAGGTGACACA R: AACAGACAGCTAATGCAGAACG
10	<i>Omm1037G</i>	Rexroad et al., 2002	52.0	F: GAACGGCGACTGGATTTAATACT R: ACCGCTCACCCCTCGTCTCTTAA
11	<i>Omm1070</i>	Rexroad et al., 2001	60.0	F: GTTGTGTCGAATGGAGTTCTG R: GTGCACTCTAAATGAATCAATCTCTT
12	<i>Omy1011</i>	Spies et al., 2005	48.0	F: TAGGGACTGAACGTGCAAG R: GACAAAAGTGAAGTGGTTGGTTC
13	<i>Omy301</i>	Jackson et al., 1998	44.0	F: ACTTAAGACTGGCAACCTT R: CTACACGGCCTTCGGGTGAGA
14	<i>Omy77</i>	Morris et al., 1996	49.0	F: CGTTCTCTACTGAGTCAT R: GGGTCTTTAAGGCTTCACTGCA
15	<i>One101</i>	Olsen et al., 2000	49.0	F: AAATGACTGAAATGTTGAGAGC R: TGGATGGATTGATGAATGG
16	<i>One102</i>	Olsen et al., 2000	50.0	F: CATGGAGAAAAGACCAATCA R: TCACTGCCCTACAACAGAAG
17	<i>One103</i>	Olsen et al., 2000	54.0	F: AATGTTGAGAGCTATTTCAATCC R: GATTGATGAATGGGTGGG
18	<i>One104</i>	Olsen et al., 2000	53.0	F: GCTACTACAATCCTAGTCTGTGATT R: CATCTTCTTCAGTGGCTGTAGAT

19	<i>One105</i>	Olsen et al., 2000	48.0	F: TCTTTAAGAATATGAGCCCTGG R: GCTCAAATAAACTTAAACCTGTCC
20	<i>One109</i>	Olsen et al., 2000	53.5	F: AGGGAGAGAAGAGAGGGGAGA R: CCTCAGAAGTAGCATCAGCTC
21	<i>One111</i>	Olsen et al., 2000	52.0	F: ATGACCAAGGAGCTTCTGC R: TATCCAGGTACTCCACTGGC
22	<i>One114</i>	Olsen et al., 2000	52.0	F: TCATTAATCTAGGCTTGTCAGC R: TGCAGGTAAGACAAGGTATCC
23	<i>One8</i>	Scribner et al., 1996	58.0	F: AACATTCTGGGATGACAGGGGTA R: CTGTTCTGCTCCAGTGAAGTGGA
24	<i>Ots102</i>	Nelson, Beacham, 1999	52.0	F: AGGTCCAATAAGGAGTGATATAGTAG R: TATCCCCTTTACCATTTCCCTTGCTA
25	<i>Ots103</i>	Small et al., 1998	54.0	F: AGGCTCTGGGTCCGTG R: TGATATGGTGTGATAGCTGG
26	<i>Ots100</i>	Nelson, Beacham, 1999	54.0	F: TGAACATGAGCTGTGTGAG R: ACGGACGTGCCAGTGAG
27	<i>Ots107</i>	Nelson, Beacham, 1999	51.0	F: ACAGACCAGACCTCAACA R: ATAGAGACCTGAATCGGTA
28	<i>Ots108</i>	Nelson, Beacham, 1999	48.0	F: TCTGTTTATCTTTCTATTA R: AAGGAGAGACAGAGGG
29	<i>Ots2</i>	Banks et al., 1999	48.0	F: ACACCTCACACTTAGA R: AATATCCTTCACACTG
30	<i>Ots3</i>	Banks et al., 1999	51.5	F: CACACTCTTTCAGGAG R: AGAATCACAATGGAAG
31	<i>OtsG253b</i>	Williamson et al., 2002	48.0	F: GAGCAGGCCGAGCAGGTGTCT R: AATTGGGTCAATAAGGCTCTGTGG
32	<i>OtsG68</i>	Williamson et al., 2002	48.0	F: TATGAACTGCAGCTTGTTATGTTAGT R: GTTTCATGTCCGGCTGCTCAATGTA
33	<i>OtsG85</i>	Williamson et al., 2002	49.0	F: AGCACTGACTTAATATACACACTGA R: GCTTACAACCTCATTATTTGGATGTTG
34	<i>Ssa197</i>	O'Reilly et al., 1996	46.0	F: GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG R: TGGCAGGGATTTGACATAAC
35	<i>Ssa2019</i>	Sánchez et al., 1996	48.0	F: TCAACCTGGTCTGCTTCGAC R: CTAGTTTCCCCAGCACAGCC
36	<i>Str60</i>	Estoup et al., 1993	56.0	F: CGGTGTGCTTGTCAGGTTTC R: GTCAAGTCAGCAAGCCTCAC

Значительная часть апробированных локусов оказалась непригодной для анализа вследствие того, что при рекомендованных авторами условиях не был получен ПЦР-продукт, или его размер не позволил с уверенностью интерпретировать аллельные состояния микросателлитов. Для анализа генетической изменчивости выборок нерки из р. Озерная (бассейн

оз. Курильское) было отобрано девятнадцать микросателлитных локусов — *Oki1a*, *Oki1b*, *OtsG68*, *Ots107*, *Oki6*, *One104*, *One109*, *Omy77*, *Ots100*, *Ots103*, *One105*, *OtsG253*, *Omm1070*, *Ots3*, *Ots108*, *Omy1037*, *Oki23*, *Omy301*, *OtsG85*, характеризующихся достаточно высоким уровнем полиморфизма.

Для анализа нерки восточного побережья Камчатки были отобраны восемь полиморфных микросателлитов: *Ots107*, *Oki1a*, *Oki1b*, *One104*, *One109*, *OtsG68*, *OtsG85*, *Oki6*, использование которых в исследовании популяций данного региона представляется достаточно перспективным.

Для двух пар локусов — *OtsG68*, *Ots107* и *OtsG85*, *Oki6* были отработаны мультиплексные реакции (рис. 2.3). Указанные пары амплифицировали и интерпретировали совместно, но в условия реакции были внесены некоторые изменения. Количество праймеров для локуса *Oki6* было увеличено в 1.5 раза, температура отжига для *OtsG68* и *Ots107* составила 49.5 °С, для *OtsG85* и *Oki6* — 48.5 °С. Результаты, вызывающие сомнения, в анализе не использовали — ПЦР переставляли отдельно по каждому локусу при обычных условиях.

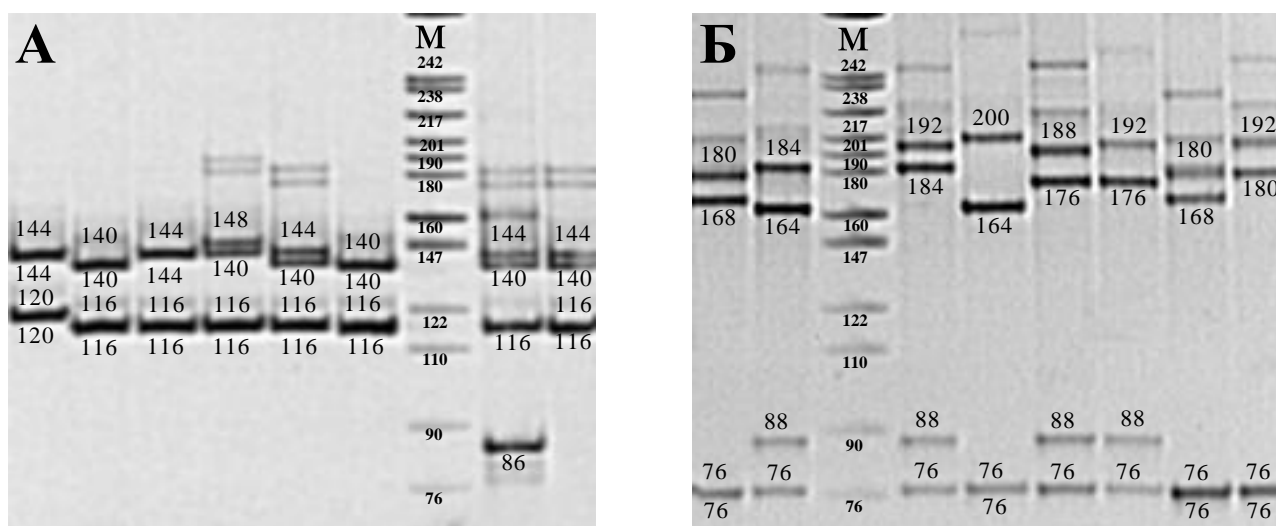


Рисунок 2.3. Фотографии гелей: А — мультиплекс локусов *OtsG68* (верхний) и *Ots107* (нижний); Б — мультиплекс локусов *OtsG85* (верхний) и *Oki6* (нижний), М — маркер молекулярного веса *pBR322/HpaII*.

Два локуса — *Ok1a* и *Ok1b*, амплифицированные с одной парой праймеров, различались размерами аллельных вариантов (124–164 п. н. и 104–124 п. н.) и демонстрировали независимую изменчивость (рис. 2.4). По мнению ряда исследователей, такой ПЦР-продукт может являться результатом амплификации комплементарных локусов вследствие того, что тихоокеанские лососи имеют тетраплоидное происхождение, или в процессе эволюции имела место дупликация, с последующей дивергенцией двух локусов (Афанасьев и др., 2006; Шитова, 2008).

На рисунках 2.4–2.6 представлены примеры электрофоретического разделения аллельных вариантов для всех локусов, отобранных и использованных в данной работе.

2.2.2. Методы статистического анализа

В настоящей работе процесс оценки генетической дифференциации популяций на основе изменчивости аллельных частот микросателлитных локусов состоял из следующих этапов:

1. расчет аллельных частот;
2. расчет матриц генетических расстояний;
3. проведение кластерного анализа с построением дендрограмм;
4. проверка обоснованности решений кластерного анализа и сопоставление их с результатами многомерного анализа.

В программном пакете GDA рассчитывали частоту аллелей, ожидаемую H_e и наблюдаемую H_o гетерозиготности, среднее число аллелей на локус, оценку межпопуляционной дифференциации (θ_{st} — аналог F_{st}), бутстрэп-интервал для θ_{st} , индекс фиксации f (Вейр, 1995), а также соответствие распределению Харди-Вайнберга (Lewis, Zaykin, 2001).

Показатель генетической дифференциации F_{st} , был получен с помощью специализированного макроса GenALEx6 для MS-Excel (Peakall, Smouse, 2006) и программы Arlequin2000 (Schneider et al., 2000). Для оценки внутри- и меж-

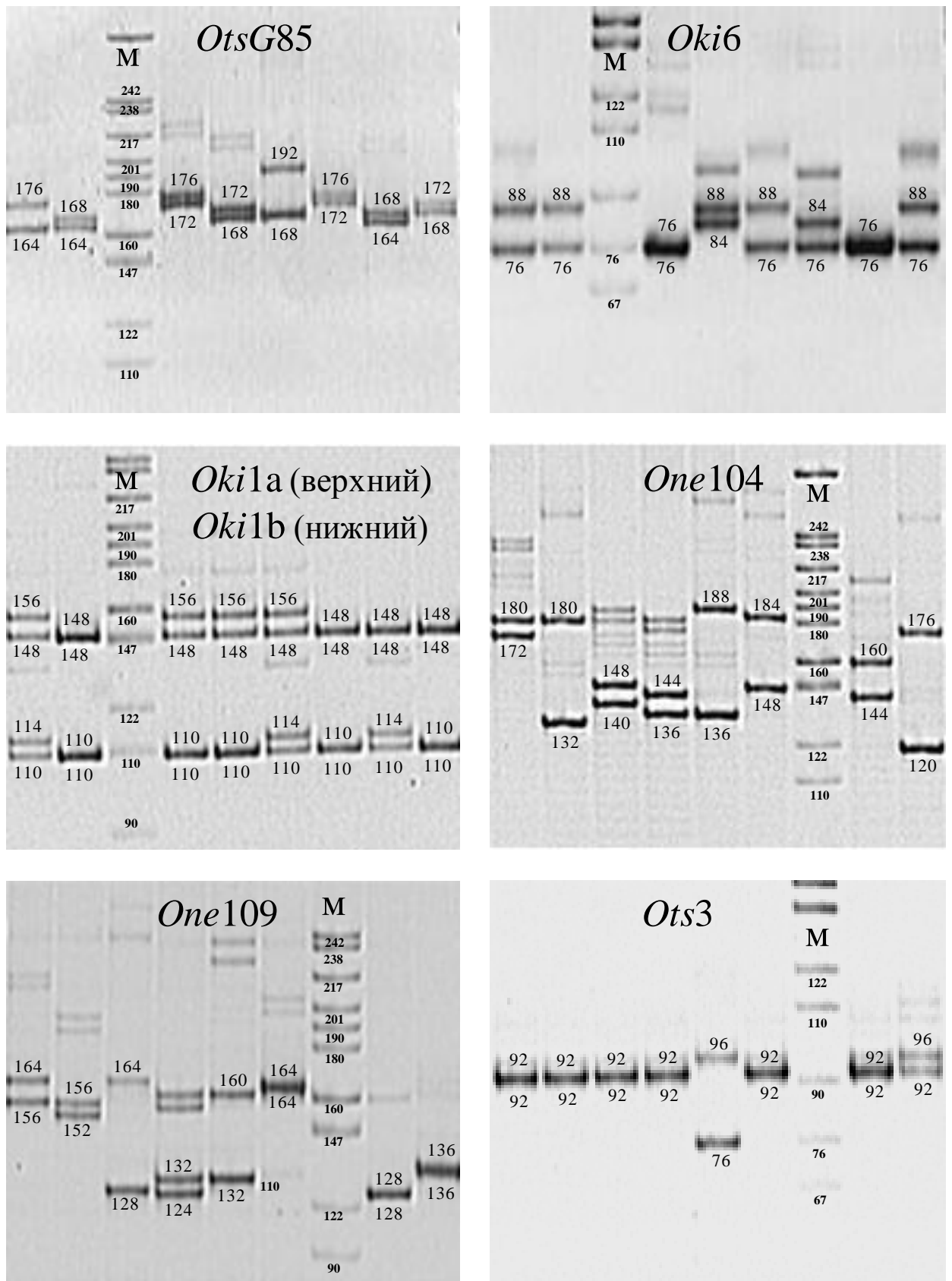


Рисунок 2.4. Примеры электрофоретического разделения ПЦР-продуктов в выборках нерки Камчатки. Фотографии гелей: *OtsG85*, *Oki6*, *Oki1a* (верхний) и *Oki1b* (нижний), *One104*, *One109*, *Ots3*. Здесь и далее: М — маркер молекулярного веса *pBR322/HpaII*.

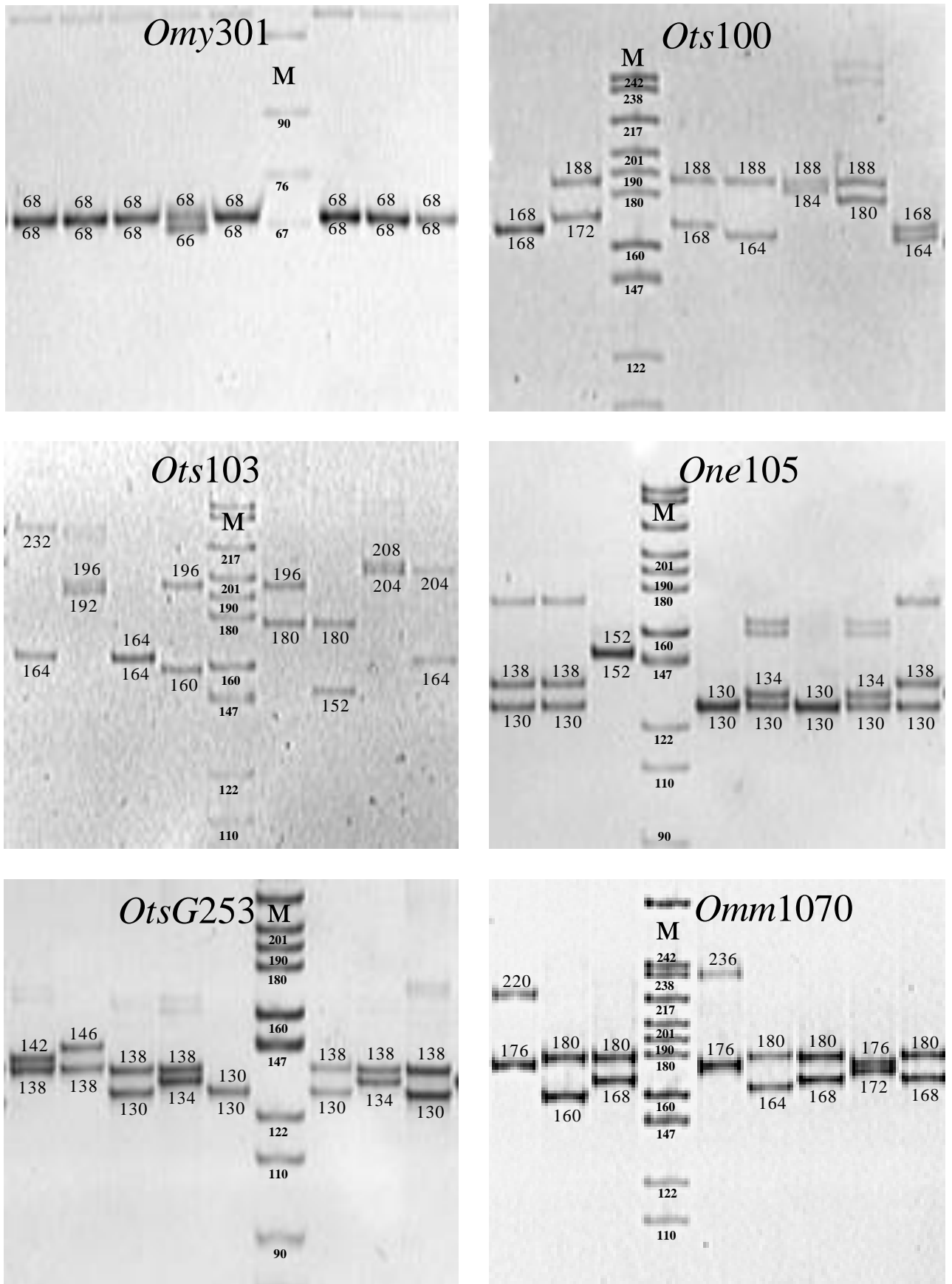


Рисунок 2.5. Примеры электрофоретического разделения ПЦР-продуктов в выборках нерки Камчатки. Фотографии гелей: *Omy301*, *Ots100*, *Ots103*, *One105*, *OtsG253*, *Omm1070*.

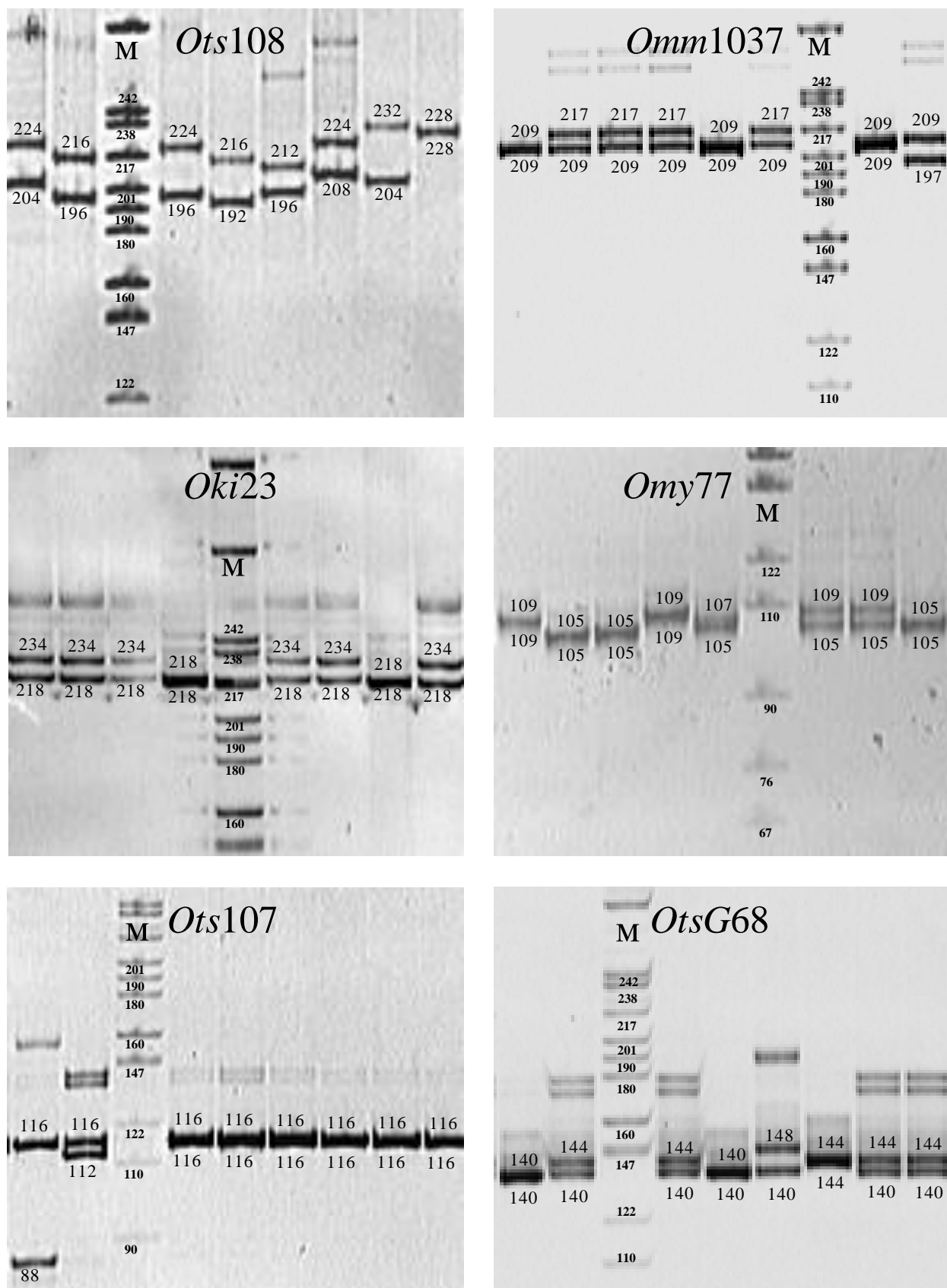


Рисунок 2.6. Примеры электрофоретического разделения ПЦР-продуктов в выборках нерки Камчатки. Фотографии гелей: *Ots108*, *Omm1037*, *Oki23*, *Omy77*, *Ots107*, *OtsG68*.

популяционной изменчивости, а также различий между группами популяций использовали программу AMOVA (Analysis of Molecular Variance) в пакете программ Arlequin2000.

Оценка генетического разнообразия внутри и между популяциями нерки восточного побережья проведена с использованием информационного индекса разнообразия Шеннона-Уивера (Shannon, Weaver, 1949; Lewontin, 1972; Chalmers, 1992) в специализированном макросе для MS-Excel GenALEx6 (Peakall, Smouse, 2006).

Генетическую гетерогенность выборок оценивали с помощью критерия χ^2 (Лакин, 1990; Животовский, 1991) и критерия «G-тест» (log-likelihood analysis) (Sokal, Rolf, 1981), являющегося более адаптированным для генетических исследований и альтернативным χ^2 методом. По оценкам некоторых исследователей, два вышеназванных метода, являются взаимозаменяемыми (Животовский, 1991). Критерий «хи-квадрат» для случая малых ожидаемых численностей чаще, чем это должно быть, принимает нуль-гипотезу, когда она неверна, а G-критерий отвергает справедливую нуль-гипотезу чаще, чем это должно быть по теории (Животовский, 1991). Одновременное применение обоих статистических методов дает возможность дополнительной проверки достоверности полученных результатов.

В качестве меры количественной оценки различий между популяциями использовали генетические расстояния, рассчитанные по методу М. Нея (Nei, 1972, 1987), а также хордовые генетические расстояния по Кавалли-Сфорцу и Эдвардсу (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967), которые получили, в программе NTSYS 2.0 (Rohlf, 1998).

На основе матриц генетических расстояний между популяциями выполняли кластерный анализ, с представлением его результатов в виде COMPLET-дендрограмм («Complete-link method» — метод полной связи) (Sneath, Sokal, 1973), а так же NJ-дендрограмм («Neighbor-joining» — метод ближайших соседей) (Saitou, Nei, 1987) в программе GDA (Lewis, Zaykin, 2001) и NTSYS 2.0 (Rohlf, 1998). Бутстреп-тест выполнялся в пакете программ

PHYLIP (Felsenstein, 2004). Графическое изображение дендрограмм было получено в программе TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rteeview.html>).

Другим подходом к оценке генетического сходства популяций был метод многомерного шкалирования, выполненный в программе NTSYS 2.0 (Rohlf, 1998). Метод многомерного, в данном исследовании — трехмерного шкалирования, заключается в построении трехмерной функции, которая обеспечивает максимальное разделение классов. Под классами понимаются области с высокой концентрацией точек, где каждая точка представляет собой суммарную генетическую характеристику каждой популяции. Определение генетических расстояний двумя методами, при условии получения близких конечных результатов, дает дополнительную гарантию правильности оценки дифференциации исследуемых популяций.

Для оценки вероятности определения популяционной и региональной принадлежности смешанных выборок из уловов траловой съемки и промышленных речных неводов использовали метод анализа симулированных выборок по нулевому сценарию в программе SPAM (Masuda et al., 1991). Программу SPAM использовали также для идентификации состава морских и речных (р. Озерная) выборок.

Географические расстояния между водоемами, в которых были отобраны выборки, определяли в картографическом программном обеспечении Garmin MapSource, Version 6.5 (http://www.garmin.com/software/MapSource_65beta.exe).

ГЛАВА 3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НЕРКИ ВОСТОЧНОЙ КАМЧАТКИ

3.1. Характеристика уровня изменчивости микросателлитов

Для проведения исследования нерки Восточной Камчатки и Командорских о-вов из апробированных локусов, указанных в главе 2, были отобраны восемь (*Ots107*, *Oki1a*, *Oki1b*, *One104*, *One109*, *OtsG68*, *OtsG85*, *Oki6*), позволяющих получить хорошо воспроизводимые информативные профили известных фрагментов генома, характеризующихся удобными для интерпретации размерами (от 74 до 242 п. н.) (табл. 3.1). Семь из восьми локусов имеют тетра-нуклеотидные повторы, *Oki6* является динуклеотидом.

Число аллелей вышеуказанных локусов у 638 особей нерки варьировало от 5 до 26 (табл. 3.1). Суммарно в 13 выборках выявлено 107 аллельных вариантов. Среднее число аллелей на локус составило 13.4. Наиболее полиморфными оказались локусы *OtsG85* и *One104*, наименее — *Oki1a,b* и *OtsG68*.

Таблица 3.1. Характеристика микросателлитных локусов нерки восточного побережья Камчатки и Командорских островов

Локус	Число аллелей/ число исследованных экз.	Размер фрагмента, п. н.	H_e	H_o	f
<i>Ots107</i>	9/635	84–132	0.370	0.306	0.174
<i>Oki1a</i>	8/624	124–160	0.506	0.492	0.027
<i>Oki1b</i>	5/626	104–120	0.475	0.422	0.113
<i>One104</i>	24/624	104–204	0.929	0.902	0.029
<i>One109</i>	18/620	108–180	0.887	0.845	0.047
<i>OtsG68</i>	8/629	128–156	0.570	0.552	0.031
<i>Oki6</i>	9/619	74–100	0.531	0.493	0.073
<i>OtsG85</i>	26/605	128–242	0.925	0.937	-0.014
Среднее	13.4/622		0.649	0.619	0.047

Примечание. п. н. — пары нуклеотидов, H_e — средняя ожидаемая гетерозиготность, H_o — средняя наблюдаемая гетерозиготность, f — индекс фиксации (Вейр, 1995).

Средняя наблюдаемая гетерозиготность исследованных микросателлитных локусов имеет относительно высокое значение — 0.619, достигая уровня 0.937 (*OtsG85*). В ряду выборок (р. Пономарка, р. Киревна, оз. Двухюрточное и лагуна Анана) по одному или двум из исследованных локусов наблюдались значимые отклонения от равновесия Харди-Вайнберга (табл. 3.2). Оценки гетерозиготности по всем, включенным в анализ выборкам, наиболее высоки для локусов *One104*, *OtsG85*, наименьшие значения получены для локуса *Ots107*. У нерки оз. Саранное по семи локусам наблюдается преобладание показателей наблюдаемой гетерозиготности (H_o) над ожидаемой (H_e), соответственно внутривидовой коэффициент инбридинга принимает в этих случаях отрицательные значения (табл. 3.2). Наиболее значительный дефицит гетерозигот отмечен для локусов *Ots107* и *Oki1b* (индекс фиксации 0.174 и 0.113, соответственно) (табл. 3.1.).

Общеизвестно, что отклонение от равновесия Харди-Вайнберга может возникать в естественных популяциях в силу ряда причин — действие отбора, инбридинг, подразделенность, наличие нуль-аллелей. В связи с тем, что микросателлитные локусы являются селективно нейтральными, гипотеза о действующем отборе представляется маловероятной, так же как и возможность инбридинга, в результате действия которого отклонение от равновесия Харди-Вайнберга наблюдалось бы по всем исследованным локусам. Одним из возможных объяснений недостатка гетерозигот может являться «эффект Валунда», возникающий в генетически подразделенных популяциях, что вполне допустимо для такого сложноструктурированного вида как нерка, у которого имеют место как темпоральные, так и экологические формы. Однако еще более вероятным представляется наличие нуль-аллелей, возникающих в результате мутаций во фланкирующей микросателлитный локус области. Отсутствие ПЦР-продукта, в таком случае ошибочно интерпретируется как гомозиготное состояние соответствующего локуса.

Примером влияния нуль-аллелей на полученные результаты является исследование изменчивости микросателлитного локуса *Oke3* в 66-ти выборках

Таблица 3.2. Генетическая изменчивость выборок нерки из нерестовых водоемов восточного побережья Камчатки и Командорских островов

Лocus	Характеристики популяции	оз. Саранное	р. Бушуева	р. Пономарка	р. Киревна	оз. Двухюрточное	р. Еловка	р. Камчатка	р. Ивашка	р. Хайлюля	р. Навыринваям	р. Апука	лагуна Анана	лагуна Северная	Среднее по выборкам
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Ots107</i>	A	4	5	5	6	4	6	4	5	4	2	3	5	3	4.3
	H_e	0.186	0.527	0.355	0.540	0.498	0.654	0.562	0.152	0.340	0.040	0.145	0.180	0.173	0.335
	H_o	0.200	0.479	0.260	0.540	0.620	0.400	0.479	0.160	0.250	0.040	0.152	0.191	0.188	0.304
	f	-0.073	0.091	0.270	0.000	-0.249	0.391	0.148	-0.051	0.266	-0.010	-0.050	-0.066	-0.082	0.091
	p	0.799	0.244	0.008**	0.864	0.043*	0.000***	0.148	0.521	0.015*	0.019*	0.453	0.682	0.691	
<i>Oki1a</i>	A	5	3	5	4	2	2	2	3	2	3	3	3	4	3.2
	H_e	0.531	0.441	0.469	0.490	0.492	0.495	0.491	0.473	0.468	0.538	0.499	0.504	0.513	0.493
	H_o	0.553	0.417	0.420	0.449	0.551	0.420	0.447	0.480	0.438	0.500	0.556	0.604	0.574	0.493
	f	-0.041	0.055	0.106	0.084	-0.122	0.153	0.090	-0.016	0.066	0.071	-0.116	-0.202	-0.120	0.000
	p	0.729	0.517	0.264	0.436	0.583	0.163	0.342	0.936	0.432	0.482	0.551	0.176	0.408	
<i>Oki1b</i>	A	3	3	4	4	3	3	5	3	4	2	2	2	4	3.2
	H_e	0.513	0.523	0.572	0.441	0.522	0.377	0.501	0.458	0.452	0.410	0.449	0.221	0.329	0.444
	H_o	0.574	0.354	0.580	0.510	0.408	0.400	0.404	0.480	0.490	0.391	0.444	0.125	0.313	0.421
	f	-0.120	0.325	-0.014	-0.158	0.220	-0.061	0.195	-0.048	-0.085	0.046	0.011	0.437	0.049	0.051
	p	0.466	0.007**	0.996	0.279	0.081	0.863	0.102	0.836	0.666	0.497	0.710	0.001***	0.486	
<i>One104</i>	A	18	18	19	21	20	19	18	17	18	17	16	16	17	18.0
	H_e	0.912	0.917	0.924	0.938	0.935	0.915	0.911	0.898	0.925	0.913	0.872	0.912	0.923	0.915
	H_o	0.920	0.896	0.979	0.840	0.960	0.860	0.936	0.854	0.936	0.935	0.800	0.915	0.896	0.902
	f	-0.009	0.023	-0.060	0.105	-0.027	0.061	-0.028	0.049	-0.012	-0.024	0.083	-0.003	0.030	0.014
	p	0.921	0.422	0.056	0.009**	0.367	0.103	0.457	0.188	0.940	0.833	0.171	0.988	0.416	

Окончание таблицы 3.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>One109</i>	A	14	10	14	15	12	14	14	12	15	14	13	14	13	13.4
	H_e	0.887	0.861	0.877	0.883	0.844	0.870	0.894	0.880	0.913	0.875	0.898	0.877	0.827	0.876
	H_o	0.920	0.896	0.816	0.800	0.920	0.840	0.723	0.792	0.875	0.864	0.881	0.848	0.813	0.845
	f	-0.038	-0.041	0.070	0.095	-0.090	0.035	0.193	0.101	0.042	0.013	0.019	0.034	0.017	0.036
<i>OtsG68</i>	p	0.607	0.477	0.120	0.047*	0.120	0.368	0.000***	0.996	0.346	0.701	0.586	0.359	0.642	
	A	3	7	5	4	4	4	5	3	4	3	4	6	6	4.5
	H_e	0.301	0.665	0.587	0.503	0.558	0.476	0.568	0.462	0.527	0.589	0.580	0.571	0.580	0.536
	H_o	0.360	0.729	0.620	0.540	0.633	0.460	0.667	0.540	0.479	0.565	0.587	0.413	0.583	0.552
<i>Oki6</i>	f	-0.196	-0.097	-0.056	-0.075	-0.135	0.033	-0.177	-0.170	0.092	0.040	-0.012	0.278	-0.006	-0.030
	p	0.323	0.349	0.723	0.652	0.316	0.743	0.106	0.244	0.419	0.585	0.958	0.008**	0.994	
	A	5	5	4	6	4	4	5	4	4	4	3	4	4	4.3
	H_e	0.555	0.576	0.501	0.526	0.480	0.453	0.409	0.550	0.442	0.595	0.536	0.523	0.547	0.515
<i>OtsG85</i>	H_o	0.612	0.646	0.375	0.521	0.438	0.444	0.458	0.375	0.479	0.520	0.556	0.500	0.479	0.493
	f	-0.103	-0.122	0.253	0.010	0.089	0.019	-0.123	0.320	-0.085	0.127	-0.037	0.045	0.125	0.044
	p	0.440	0.369	0.039*	0.769	0.366	0.664	0.354	0.002**	0.584	0.176	0.890	0.657	0.197	
	A	19	17	17	19	22	18	15	18	15	16	15	14	16	17
Среднее на локус	H_e	0.919	0.927	0.916	0.939	0.920	0.917	0.907	0.921	0.909	0.928	0.910	0.919	0.908	0.919
	H_o	0.918	0.979	0.913	1.000	1.000	0.957	0.935	0.938	0.917	0.898	0.909	0.935	0.875	0.936
	f	0.001	-0.057	0.003	-0.065	-0.088	-0.045	-0.031	-0.018	-0.008	0.033	0.001	-0.018	0.036	-0.020
	p	0.934	0.166	0.991	0.090	0.023*	0.433	0.692	0.877	0.769	0.262	0.855	0.856	0.359	
Среднее на локус	A	9.0	8.5	9.1	9.9	8.9	8.8	8.5	8.1	8.3	7.6	7.4	8.0	8.4	8.5
	H_e	0.600	0.679	0.650	0.658	0.656	0.645	0.655	0.599	0.622	0.611	0.611	0.588	0.600	0.629
	H_o	0.632	0.674	0.620	0.650	0.691	0.598	0.631	0.577	0.608	0.589	0.611	0.566	0.590	0.618
	f	-0.053	0.007	0.046	0.099	-0.054	0.074	0.037	0.037	0.023	0.036	0.001	0.038	0.017	0.017

Примечание. A — число аллелей, H_e — средняя ожидаемая гетерозиготность, H_o — средняя наблюдаемая гетерозиготность, f — внутривидовой коэффициент инбридинга, p — вероятность соответствия наблюдаемых генотипических распределений равновесию Харди-Вайнберга * — $P < 0.05$, ** — $P < 0.01$, *** — $P < 0.001$.

тихоокеанского лосося кеты из различных регионов воспроизводства. Было показано, что в подавляющем большинстве случаев отклонение от равновесия Харди-Вайнберга определялось именно вызванной нуль-аллелями ложной гомозиготностью (Кордичева и др., 2010; Кордичева, 2011). Результаты популяционного анализа кеты на основе изменчивости локуса *Oke3* при использовании как оригинальных, так и альтернативных праймерных последовательностей показали, что влияние нуль-аллелей на дифференцирующую способность локусов весьма существенно, а смещение оценок степени дифференциации может происходить как в бóльшую, так и в меньшую сторону (Кордичева, 2011).

Таким образом, дефицит гетерозигот, выявленный в настоящем исследовании, может объясняться тем, что выборки в отдельных случаях представляют собой смесь субпопуляций в пределах больших популяционных систем, что приводит к возникновению «эффекта Валунда», или наличием нуль-аллелей.

Характеристики генетической изменчивости выборок из исследованных популяций представлены в таблице 3.2 и на рисунке 3.1. В соответствии с приведенными данными, выборки из нерестовых водоемов северной части исследуемого региона — Карагинского и Олюторского районов, характеризуются меньшим количеством аллелей и меньшей гетерозиготностью по сравнению с выборками из бассейна р. Камчатки. Наименьшее разнообразие характерно для нерки р. Апука, для которой среднее число аллелей на восемь локусов составило 7.4. Наибольшим данный показатель был в р. Киревна — 9.9, где количество информативных аллелей достигло наивысших показателей.

Анализ числа эффективных аллелей на локус, вносящих основной вклад в результаты расчета гомо- и гетерозиготности, показал различия между этими показателями у нерки из наиболее северных популяций района исследований и из бассейна р. Камчатка (рис. 3.1).

На основе межпопуляционной изменчивости частот аллелей восьми микросателлитных локусов с использованием критерия χ^2 подтверждена

статистически достоверная генетическая гетерогенность всей совокупности исследуемых выборок.

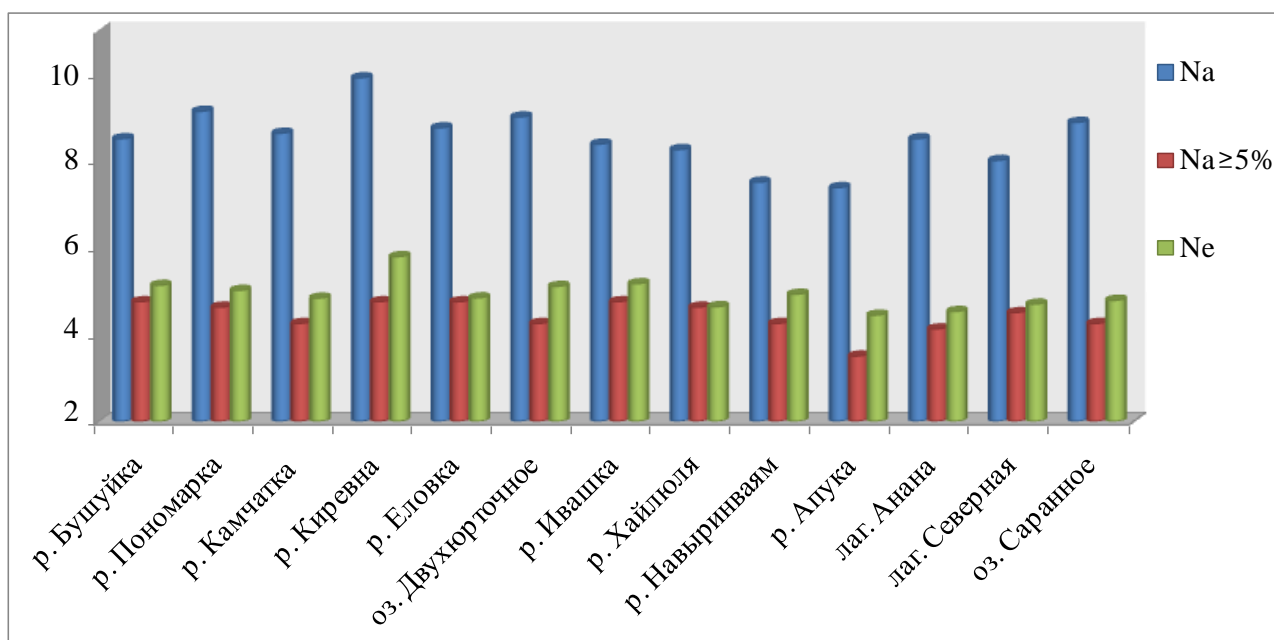


Рисунок 3.1. Аллельные профили нерестовых популяций нерки восточного побережья Камчатки и Командорских о-вов (Na — среднее число аллелей на локус; $Na \geq 5\%$ — среднее число информативных аллелей на локус; Ne — среднее число эффективных аллелей на локус).

Распределения частот аллельных вариантов представлены на рисунках 3.2–3.9. Высокополиморфные локусы *One109*, *One104* и *OtsG85* (18, 24 и 26 аллелей, соответственно) четко выраженного основного аллеля не имеют. Для *Ots107* отмечено наличие доминирующего аллеля (116 п. н.), наиболее выраженного в северных популяциях восточного побережья Камчатки и оз. Саранное, где он представлен с частотой 0.90–0.98. По локусу *Oki1a* наблюдается наличие основного аллеля (148 п. н.), преобладающего во всех выборках (с частотой 0.57–0.70), кроме р. Навыринваям и оз. Саранное, где его частота составила 0.41 и 0.32, соответственно. В этих двух выборках наиболее выражен аллель в 156 п. н. с частотой 0.54 в р. Навыринваям и 0.58 в

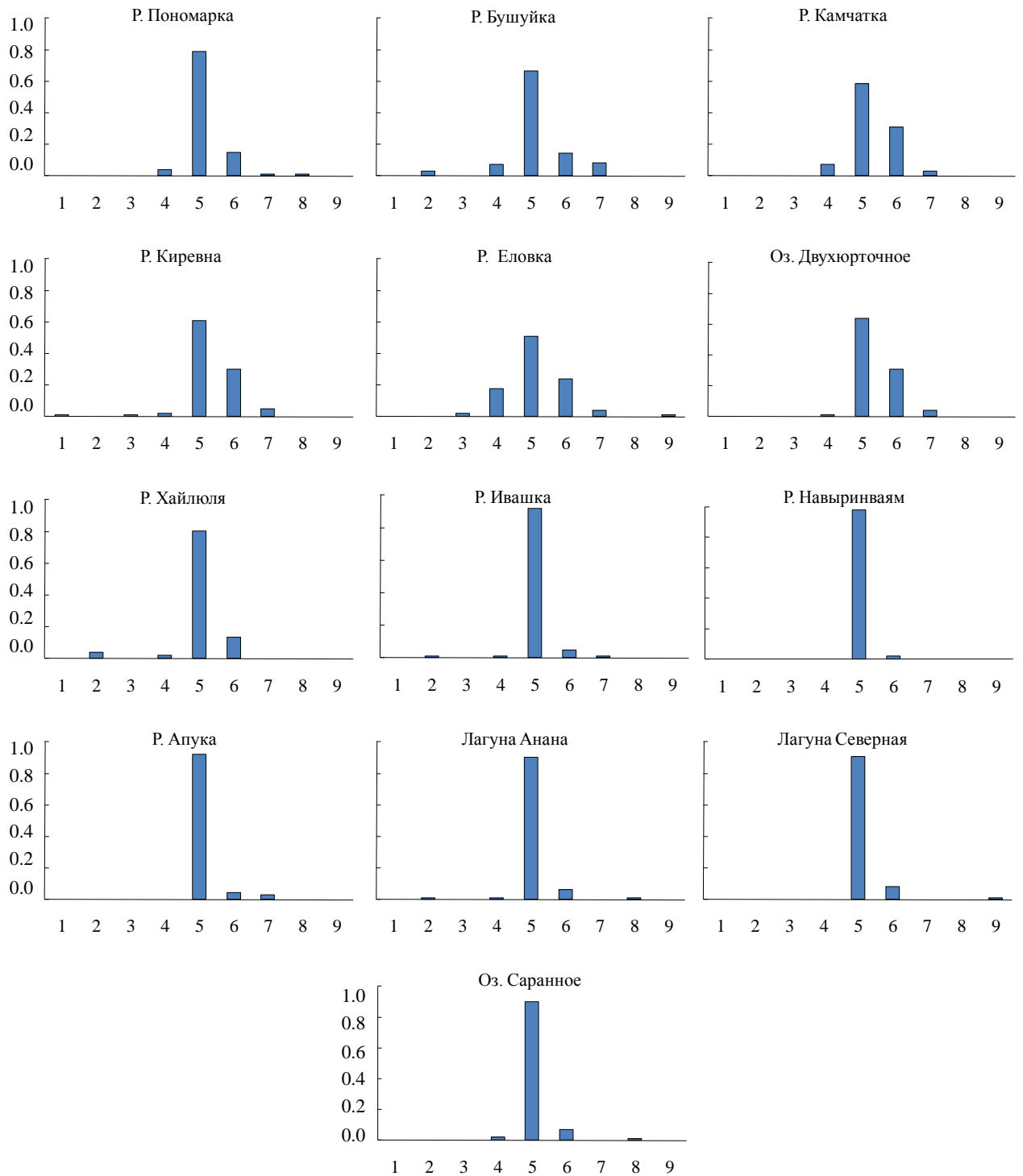


Рисунок 3.2. Распределения частот аллелей локуса *Ots107* микросателлитной ядерной ДНК в выборках из локальных популяций нерки Камчатки. По вертикали — частота аллеля; 1–9 условные обозначения аллелей.

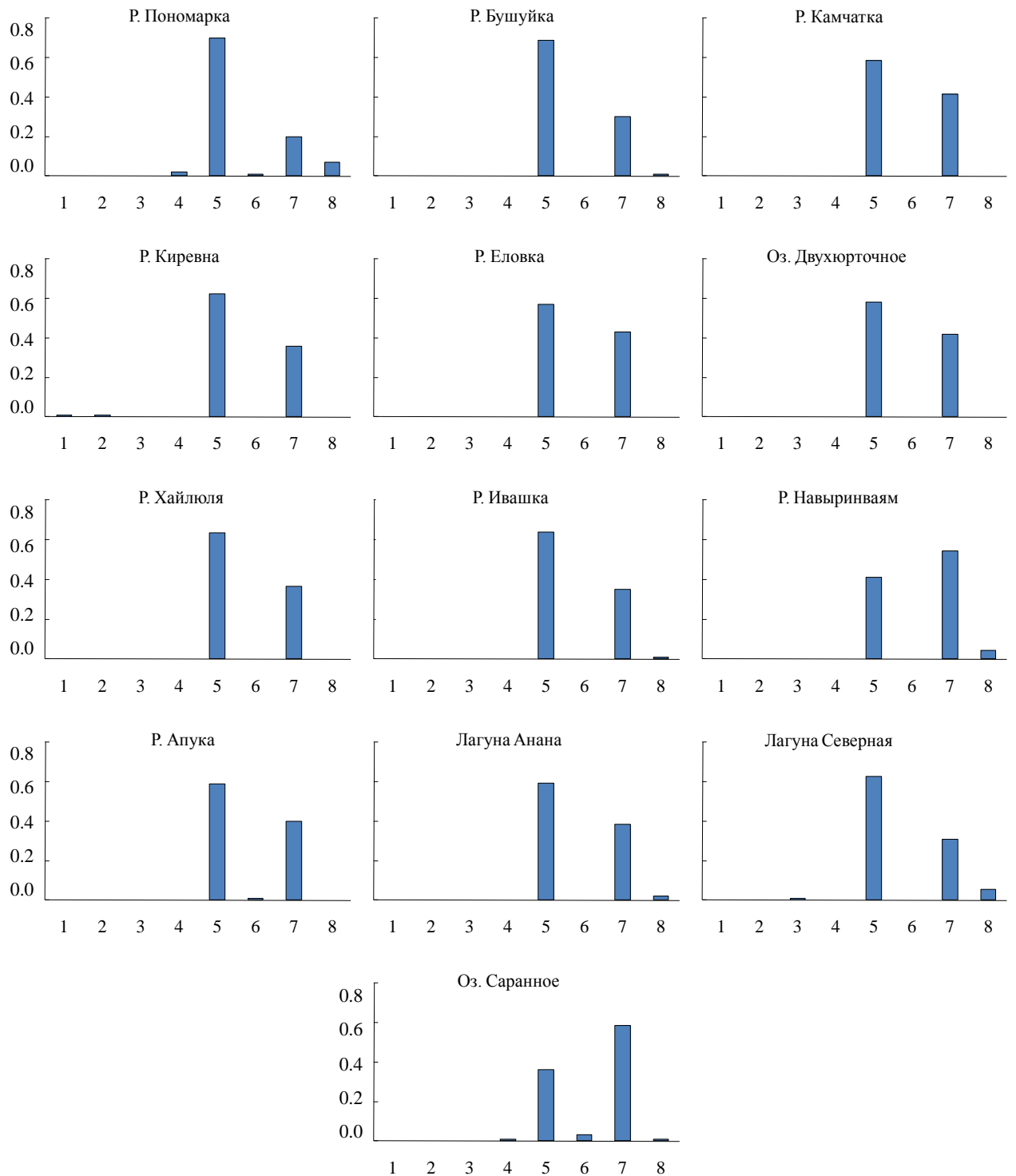


Рисунок 3.3. Распределения частот аллелей локуса *Ok1a* микросателлитной ядерной ДНК в выборках из локальных популяций нерки Камчатки. По вертикали — частота аллеля; 1–8 условные обозначения аллелей.

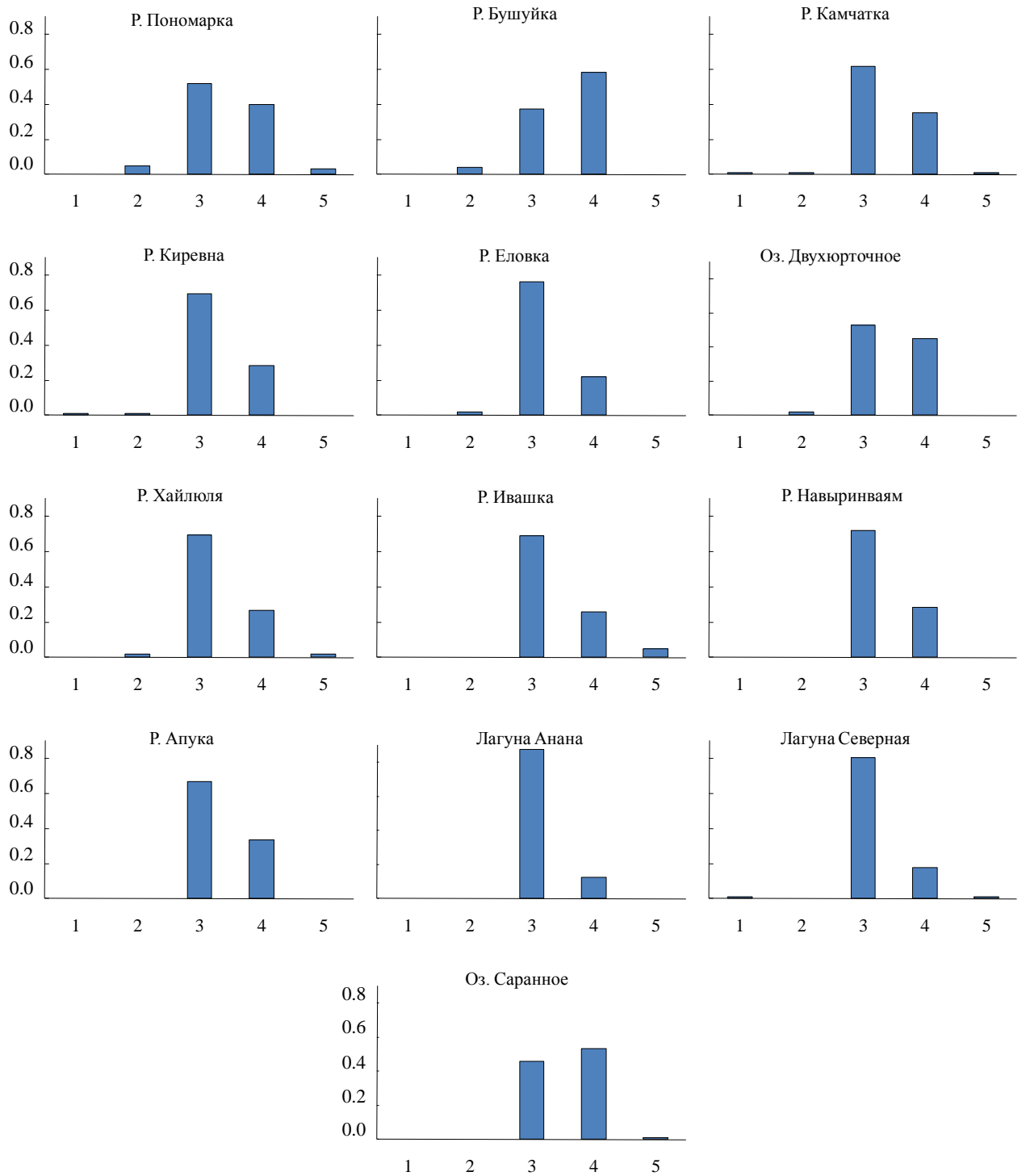


Рисунок 3.4. Распределения частот аллелей локуса *Ok1b* микросателлитной ядерной ДНК в выборках из локальных популяций нерки Камчатки. По вертикали — частота аллеля; 1–5 условные обозначения аллелей.

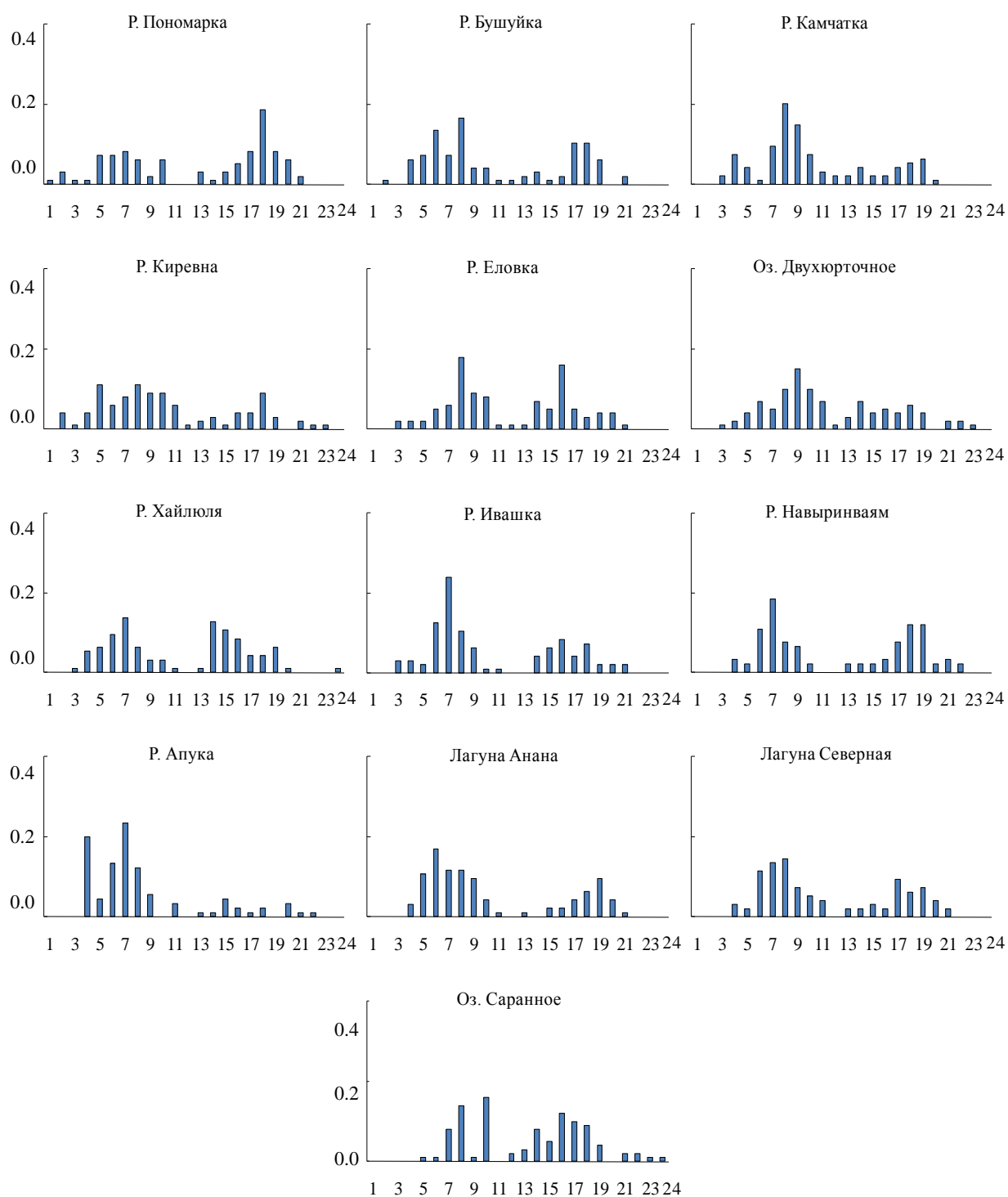


Рисунок 3.5. Распределения частот аллелей локуса *One104* микросателлитной ядерной ДНК в выборках из локальных популяций нерки Камчатки. По вертикали — частота аллеля; 1–24 условные обозначения аллелей.

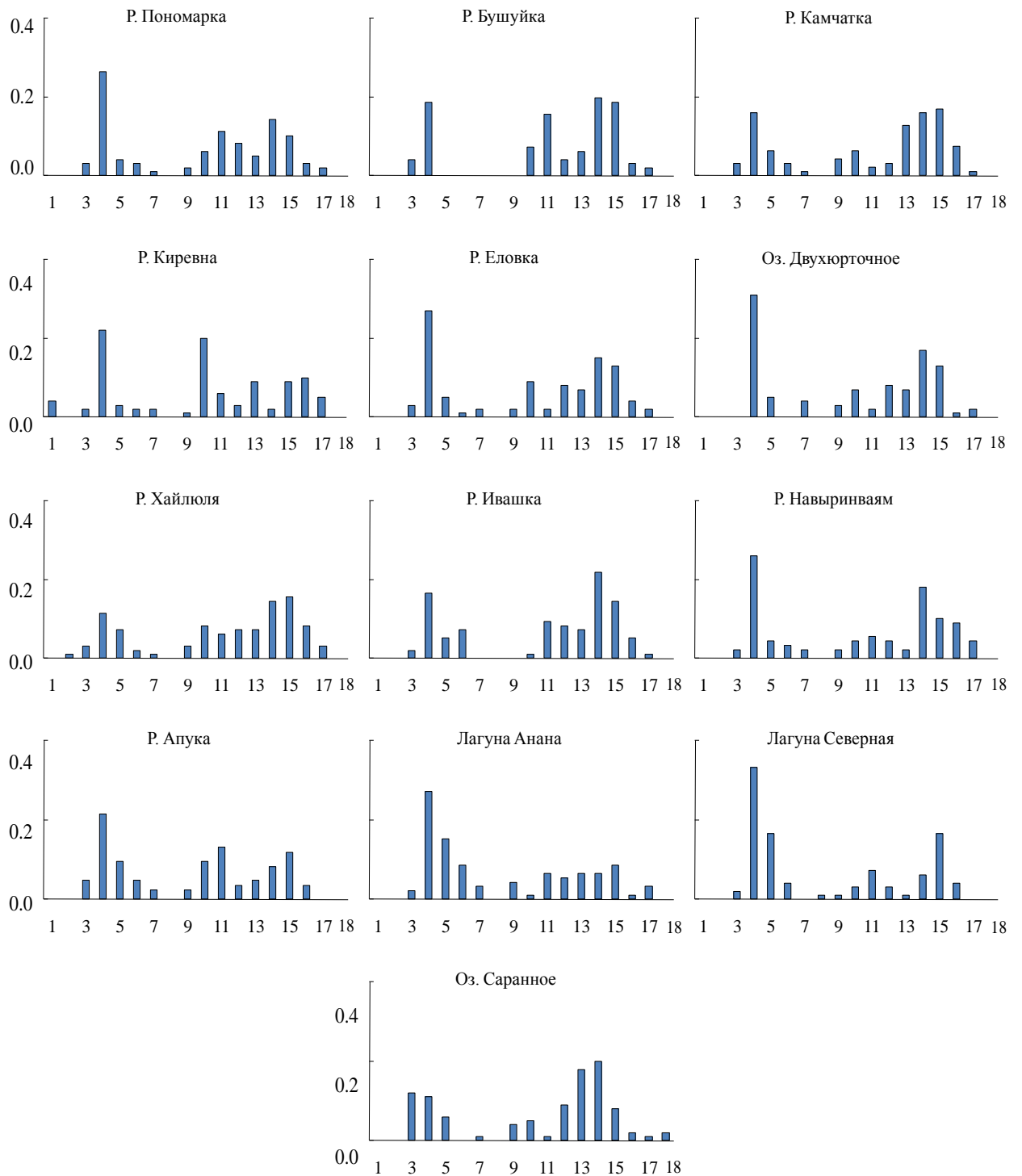


Рисунок 3.6. Распределения частот аллелей локуса *One109* микросателлитной ядерной ДНК в выборках из локальных популяций нерки Камчатки. По вертикали — частота аллеля; 1–18 условные обозначения аллелей.

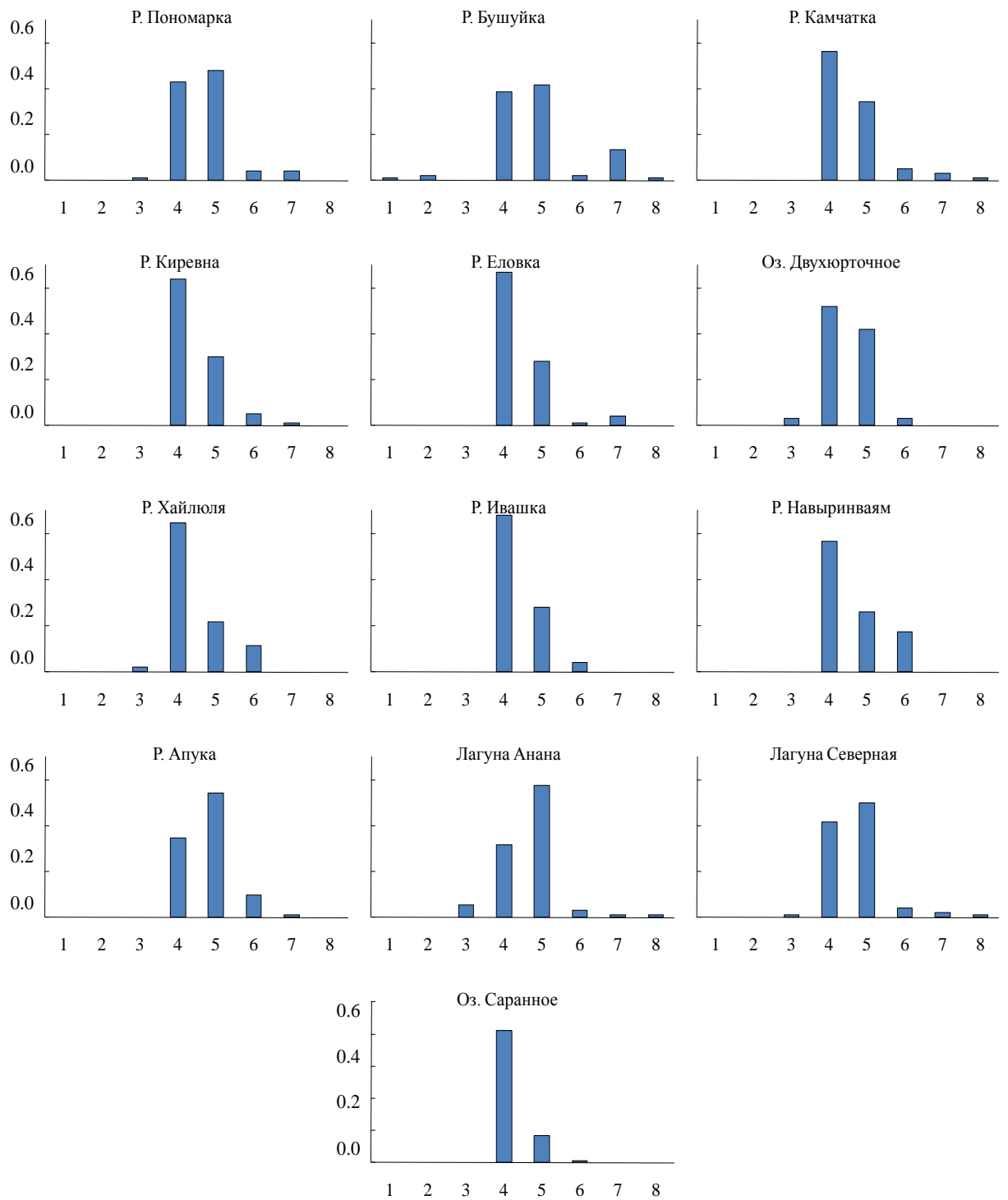


Рисунок 3.7. Распределения частот аллелей локуса *OtsG68* микросателлитной ядерной ДНК в выборках из локальных популяций нерки Камчатки. По вертикали — частота аллеля; 1–8 условные обозначения аллелей.

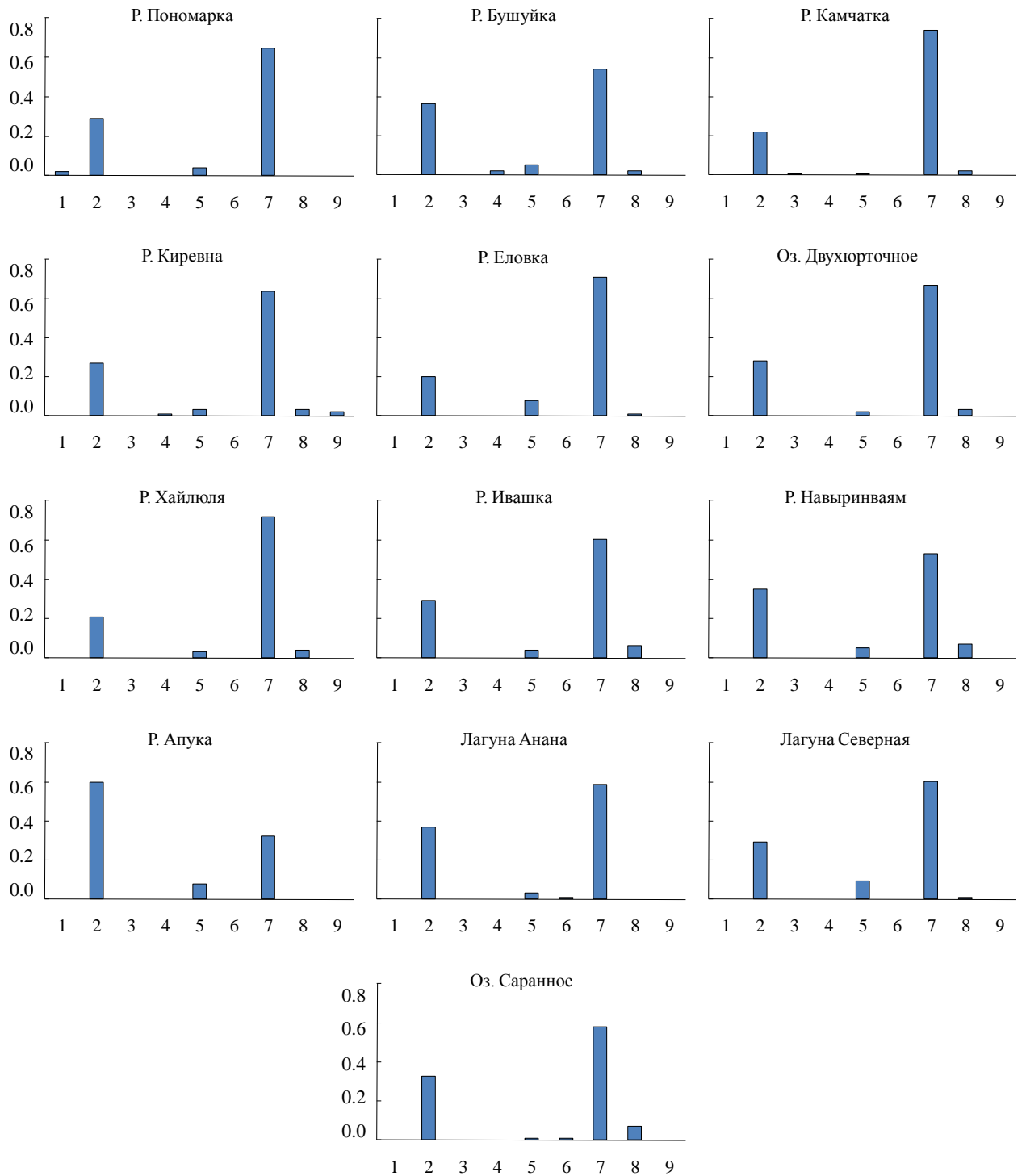


Рисунок 3.8. Распределения частот аллелей локуса *Okib* микросателлитной ядерной ДНК в выборках из локальных популяций нерки Камчатки. По вертикали — частота аллеля; 1–9 условные обозначения аллелей.

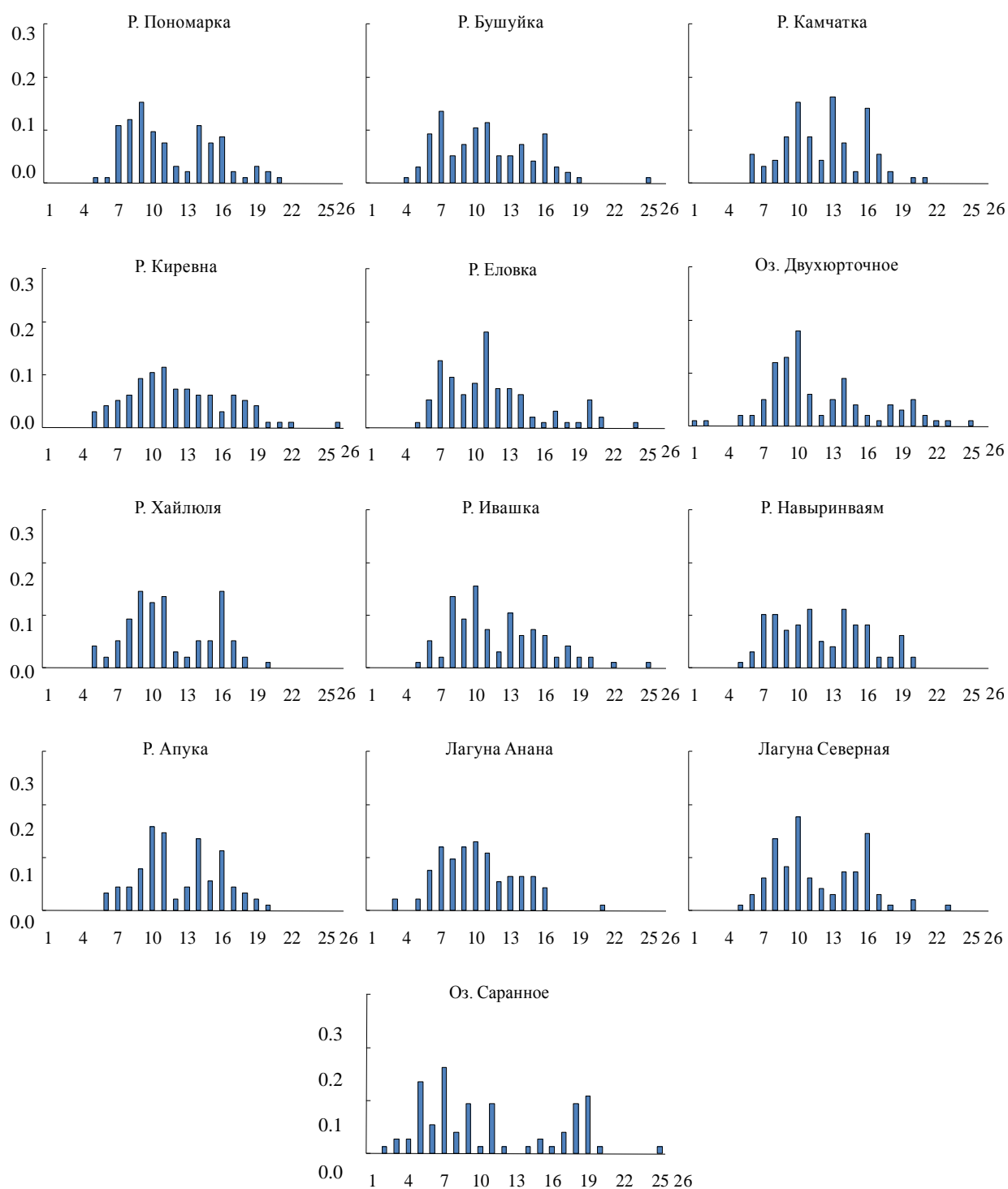


Рисунок 3.9. Распределения частот аллелей локуса *OtsG85* микросателлитной ядерной ДНК в выборках из локальных популяций нерки Камчатки. По вертикали — частота аллеля; 1–26 условные обозначения аллелей.

оз. Саранное. Основной аллель локуса *Oki1b* (112 п. н.) имеет наибольшую частоту (0.52–0.88) во всех проанализированных выборках, за исключением р. Бушуйка, где более выражен аллель длиной 116 п. н. По локусу *OtsG68* в семи популяциях восточного побережья Камчатки с частотой 0.52–0.68 и в оз. Саранное с частотой 0.82 преобладает аллель в 140 п. н., в остальных чаще встречается аллель в 144 п. н. (0.41–0.58). Локус *Oki6* характеризуется преобладанием аллеля длиной 88 п. н. во всех популяциях (0.53–0.74), кроме р. Апука, где у большей части особей выявлен аллель в 76 п. н. (0.60).

Оценки генетического разнообразия выборок — индекс Шеннона-Уивера, варьировали в популяциях восточного побережья Камчатки от 1.33 ± 0.312 (р. Апука) до 1.54 ± 0.329 (р. Киревна) (рис. 3.10), при среднем значении 1.42 ± 0.317 . В целом, можно отметить относительно низкие значения данного показателя в выборках из северных рек (Карагинский и Олюторский районы) по сравнению с бассейном р. Камчатка. Для командорской популяции индекс Шеннона-Уивера составил 1.36 ± 0.331 , и оказался сходным с величинами данного показателя в водоемах Карагинского и Олюторского районов.

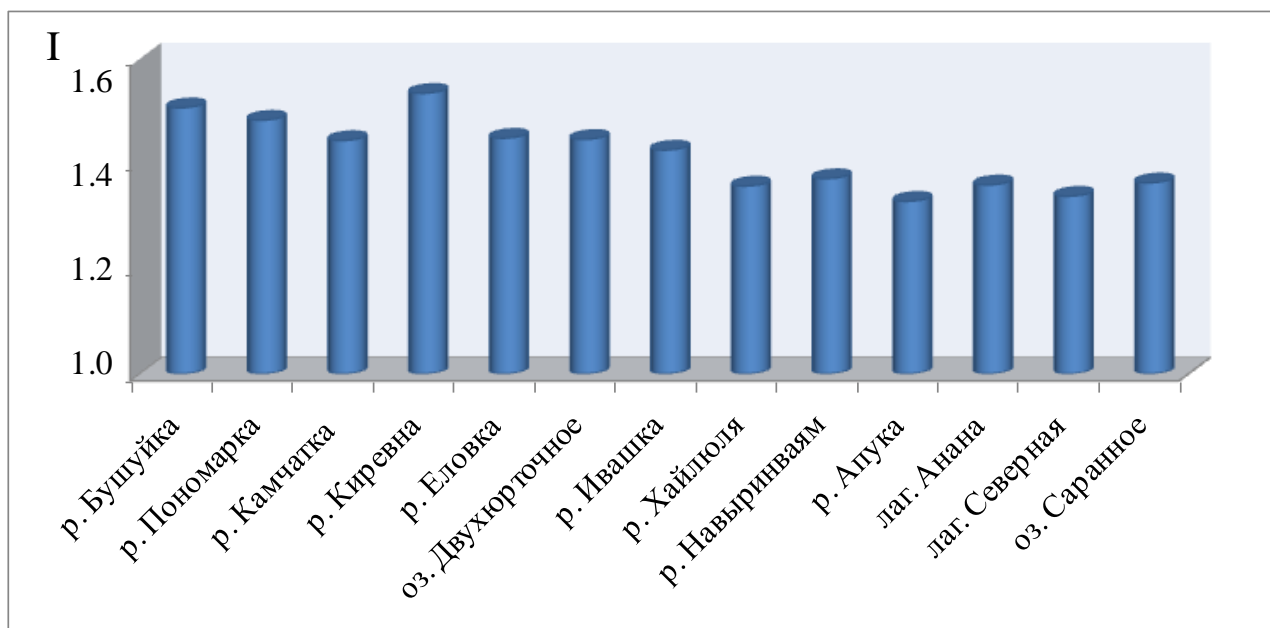


Рисунок 3.10. Уровень генетического разнообразия исследованных выборок (I — индекс Шеннона-Уивера).

3.2. Пространственная изменчивость аллельных частот

Нерка, как и все представители рода тихоокеанских лососей, в морской период жизни совершает обширные миграции, охватывающие большую часть субарктической зоны Тихого океана. Географические расстояния между реками восточного побережья Камчатки, в которые возвращаются на нерест производители, варьируют от нескольких километров до десятков и сотен. Для многих популяций рыб, в том числе и для лососей, известны случаи постепенного изменения генных частот в широтном, или в каком-либо другом направлении (Кирпичников, 1987; Olsen et al., 1996, 1998a,b; Варнавская, 2005, 2006; Withler, 1985; Seeb, Crane, 1999; Шпигальская, 2010). На основе разных комбинаций четырех эволюционных факторов: изоляция, миграция (поток генов), генетический дрейф нейтральных аллелей и отбор аллелей (адаптивный характер биохимического полиморфизма), были выделены семь гипотез возникновения клинальной изменчивости (Аронштам и др., 1977). Тем не менее, по мнению ряда ученых из всех возможных причин клинальной изменчивости главной у рыб является селекция или отбор, т.е. клина, в широком понимании этого явления, — это ответ вида на различия в среде обитания в разных участках занятого им ареала (Аронштам и др., 1977; Кирпичников, 1987).

Для нерки американского побережья Тихого океана была показана клинальная изменчивость по аллозимным локусам *Ldh-B1* и *Pgm-1*, частоты относительно редких аллелей возрастали по мере продвижения к северо-западу (Hodgins et al., 1969; Utter et al., 1973; Grant et al., 1980; Кирпичников, 1987). В настоящее время у нерки американского побережья выявлено восемь аллозимных локусов, аллельные частоты которых коррелируют с географической широтой устьев нерестовых рек, у нерки Азии — четыре (Варнавская, 2006). Вместе тем, у нерки наблюдаются и другие особенности в распределении частот высокополиморфных локусов, что, по мнению Н.В. Варнавской, указывает на множественность центров расселения этого вида

в период отступления плейстоценовых ледников (Варнавская, 2006). В этот период существовали высокогорные рефугиумы (Мелекесцев, 1974), в которых изолированные популяции нерки пережили оледенение (Варнавская, 2006). Этот факт был отмечен и другими исследователями (Withler, 1985). В.С. Кирпичников, подробно описав различные механизмы появления клин, отмечал, что на Камчатке (включая Командорские о-ва) у нерки наблюдается более сложное распределение частот аллелей белковых генов, носящее скорее сетчатый характер (Кирпичников, 1987).

В настоящем исследовании по частотам аллелей вышеописанных микросателлитных локусов были рассчитаны генетические дистанции Нея между исследуемыми выборками (Nei, 1972), а также значения F_{st} при попарном их сравнении (табл. 3.3, 3.4). Для обоих этих показателей, как меры генетической изменчивости, малые значения указывают на бóльшее сходство популяций, относительно бóльшие — на существующие различия между ними. В пакете программ Garmin MapSource, Version 6.5 были определены географические расстояния (по прямой) между устьями рек, в которых были отобраны выборки. Для того чтобы подтвердить существование или отсутствие взаимосвязи между генетическими дистанциями, коэффициентами F_{st} и географической удаленностью популяций Восточной Камчатки были рассчитаны коэффициенты корреляции (рис. 3.11, 3.12).

Несмотря на то, что для популяций нерки характерна сложная структура, в частности высокая генетическая гетерогенность в пределах крупных речных и озерных бассейнов, в результате обоих вариантов анализа выявлено наличие достоверной связи между географическими расстояниями и величиной генетических различий. С увеличением географических расстояний между нерестовыми водоемами возрастают генетические различия между локальными популяциями — показатели генетических дистанций Нея и коэффициенты F_{st} (рис. 3.11, 3.12). Поскольку у нерки различают реофильные (нерестящиеся в реках) и озерные (нерестящиеся на литорали и в притоках озер) формы, речные

Таблица 3.3. Значения попарных генетических дистанций Нея — под диагональю, и географических расстояний между устьями рек, из которых отобраны выборки (в километрах) — над диагональю

№	Популяция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	р. Пономарка, 2009	0.000	94	262	6	90	131	200	662	271	599	714	660	289
2	р. Киревна, 2003	0.061	0.000	243	98	40	38	180	685	247	611	742	690	382
3	р. Камчатка (верховья), 2009	0.067	0.028	0.000	258	274	254	422	920	489	852	975	921	483
4	р. Бушуйка, 2010	0.038	0.092	0.077	0.000	96	135	207	667	278	604	720	666	285
5	р. Еловка, 2010	0.093	0.033	0.034	0.124	0.000	60	149	653	218	581	711	659	368
6	оз. Двухюрточное, 2003	0.042	0.036	0.028	0.056	0.052	0.000	161	675	225	599	734	670	411
7	р. Хайлюля, 2010	0.059	0.036	0.041	0.099	0.048	0.056	0.000	516	70	438	576	528	394
8	р. Апука, 2010	0.084	0.117	0.133	0.090	0.166	0.110	0.111	0.000	465	101	73	54	615
9	р. Ивашка, 2010	0.056	0.054	0.059	0.093	0.069	0.064	0.021	0.078	0.000	380	526	481	437
10	р. Навыринваям, 2010	0.083	0.078	0.092	0.119	0.094	0.082	0.049	0.071	0.034	0.000	165	143	595
11	лагуна Северная, 2010	0.044	0.068	0.076	0.100	0.085	0.068	0.054	0.057	0.042	0.052	0.000	60	647
12	лагуна Анана, 2010	0.063	0.086	0.099	0.119	0.103	0.089	0.079	0.054	0.064	0.062	0.017	0.000	592
13	оз. Саранное, 2012	0.137	0.114	0.107	0.140	0.128	0.101	0.091	0.172	0.082	0.075	0.158	0.184	0.000

Таблица 3.4. Значения попарных величин F_{st} — под диагональю, и географических расстояний между устьями рек, из которых отобраны выборки (в километрах) — над диагональю

№	Популяция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	р. Пономарка, 2009	0.000	94	262	6	90	131	200	662	271	599	714	660	289
2	р. Киревна, 2003	0.026	0.000	243	98	40	38	180	685	247	611	742	690	382
3	р. Камчатка (верховья), 2009	0.027	0.003	0.000	258	274	254	422	920	489	852	975	921	483
4	р. Бушуйка, 2010	0.011	0.040	0.031	0.000	96	135	207	667	278	604	720	666	285
5	р. Еловка, 2010	0.044	0.008	0.006	0.057	0.000	60	149	653	218	581	711	659	368
6	оз. Двухюрточное, 2003	0.014	0.010	0.002	0.018	0.019	0.000	161	675	225	599	734	670	411
7	р. Хайлюля, 2010	0.028	0.011	0.014	0.049	0.016	0.023	0.000	516	70	438	576	528	394
8	р. Апука, 2010	0.043	0.063	0.075	0.048	0.087	0.058	0.066	0.000	465	101	73	54	615
9	р. Ивашка, 2010	0.029	0.028	0.033	0.052	0.034	0.035	0.004	0.046	0.000	380	526	481	437
10	р. Навыринваям, 2010	0.045	0.040	0.047	0.064	0.049	0.042	0.022	0.040	0.013	0.000	165	143	595
11	лагуна Северная, 2010	0.020	0.034	0.042	0.055	0.043	0.036	0.029	0.031	0.022	0.027	0.000	60	647
12	лагуна Анана, 2010	0.036	0.049	0.059	0.071	0.059	0.051	0.047	0.029	0.040	0.036	0.000	0.000	592
13	оз. Саранное, 2012	0.068	0.057	0.051	0.070	0.064	0.048	0.044	0.095	0.041	0.035	0.089	0.110	0.000

выборки были проанализированы отдельно. Для выборок из рек коэффициенты корреляции между географическим расстоянием и показателями генетических различий оказались несколько выше, чем при анализе всей совокупности исследованного материала (рис. 3.11, 3.12).

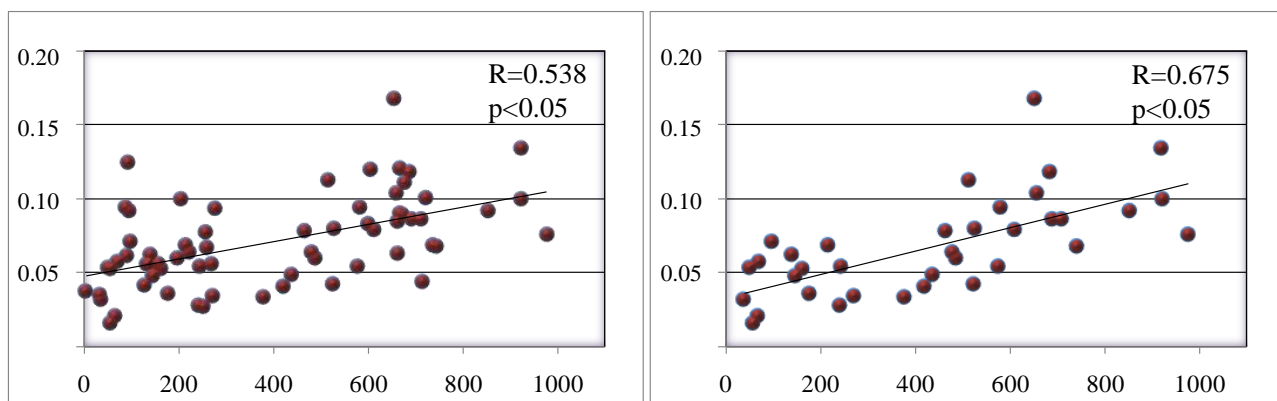


Рисунок 3.11. Корреляция между географическим расстоянием (ось абсцисс, км) и попарными генетическими дистанциями Нея (ось ординат) для всех исследованных выборок нерки восточного побережья Камчатки (слева) и только выборок из нерестовых рек (справа).

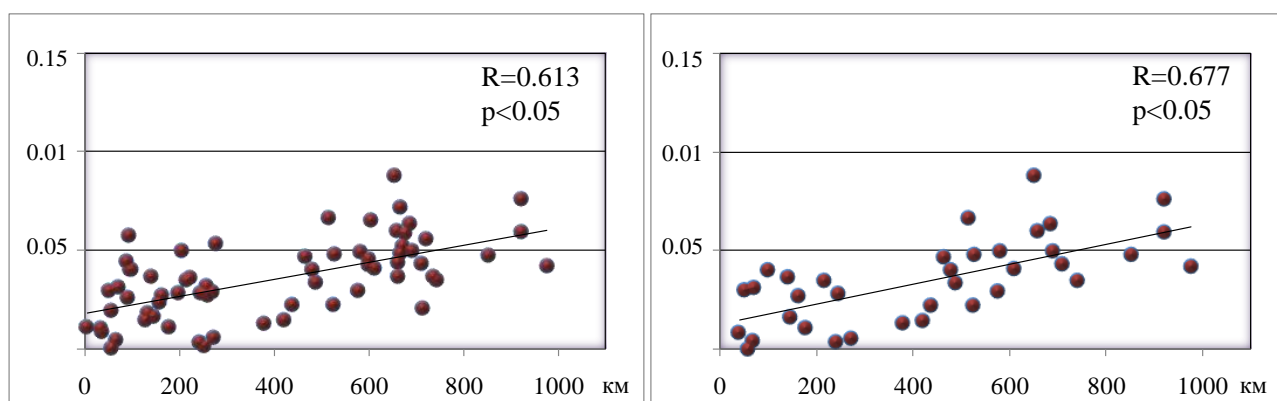


Рисунок 3.12. Корреляция между географическим расстоянием (ось абсцисс, км) и значениями F_{st} (ось ординат) при попарных сравнениях всех исследованных выборок нерки восточного побережья Камчатки (слева) и только выборок из нерестовых рек (справа).

Как было показано выше, частоты аллелей микросателлитных локусов значительно варьируют в выборках из разных популяций (рис. 3.2–3.9). Для анализа их географической изменчивости сопоставили частоты всех аллелей исследованных локусов с географической широтой водоемов, где были отобраны пробы. Аллельные варианты, для которых была обнаружена достоверная связь между частотой встречаемости в выборках и значениями широты соответствующих водоемов представлены на рисунках 3.13–3.15. В исследуемых популяциях таких аллелей было обнаружено 18 из 107 (19.26%). Только для одного из исследованных локусов — *Oki1a*, достоверной корреляции частот аллелей с географической широтой выявлено не было. По локусам *One104* и *Ots107* наблюдается наибольшая закономерность географической изменчивости. Несмотря на выявленный различный уровень полиморфизма (число аллелей составило, соответственно, 24 и 9), частоты четырех аллелей каждого из указанных локусов коррелируют с географической широтой. Частоты трех из пяти аллелей локуса *Oki1b* так же изменяются в широтном направлении. Для *One109* количество аллелей, частота которых достоверно коррелирует с географической широтой, составило три, для *Oki6* — два, а для локусов *OtsG68* и *OtsG85* — по одному. У трех локусов (*Ots107*, *Oki1b*, *Oki6*) в широтном направлении изменяются частоты ярко выраженных доминирующих аллелей (рис. 3.16).

По мнению Н.В. Варнавской, высокая доля локусов, обнаруживающих корреляции частот аллелей с географической широтой у нерки не случайна и указывает на следы формирования современной внутривидовой популяционной структуры (Варнавская, 2006). Так же необходимо отметить, что для большого числа промысловых видов рыб генетическая изменчивость, приуроченная к географическому расположению районов воспроизводства, позволяет с высокой степенью достоверности идентифицировать локальные стада в смешанных уловах (Варнавская, 2006; Шпигальская и др., 2011).

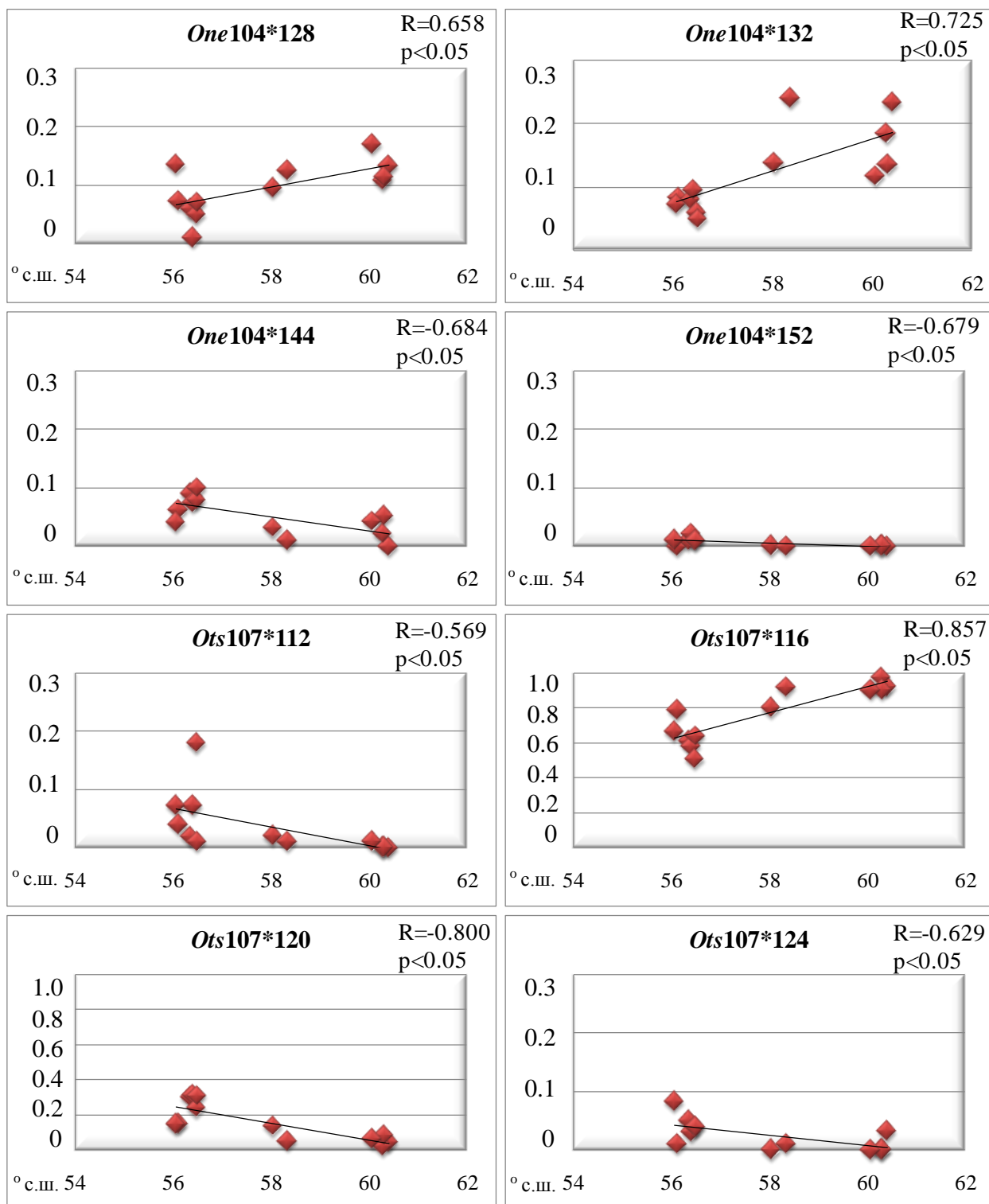


Рисунок 3.13. Корреляция между географической широтой водоема и частотами аллелей микросателлитных локусов в популяциях нерки восточного побережья Камчатки.

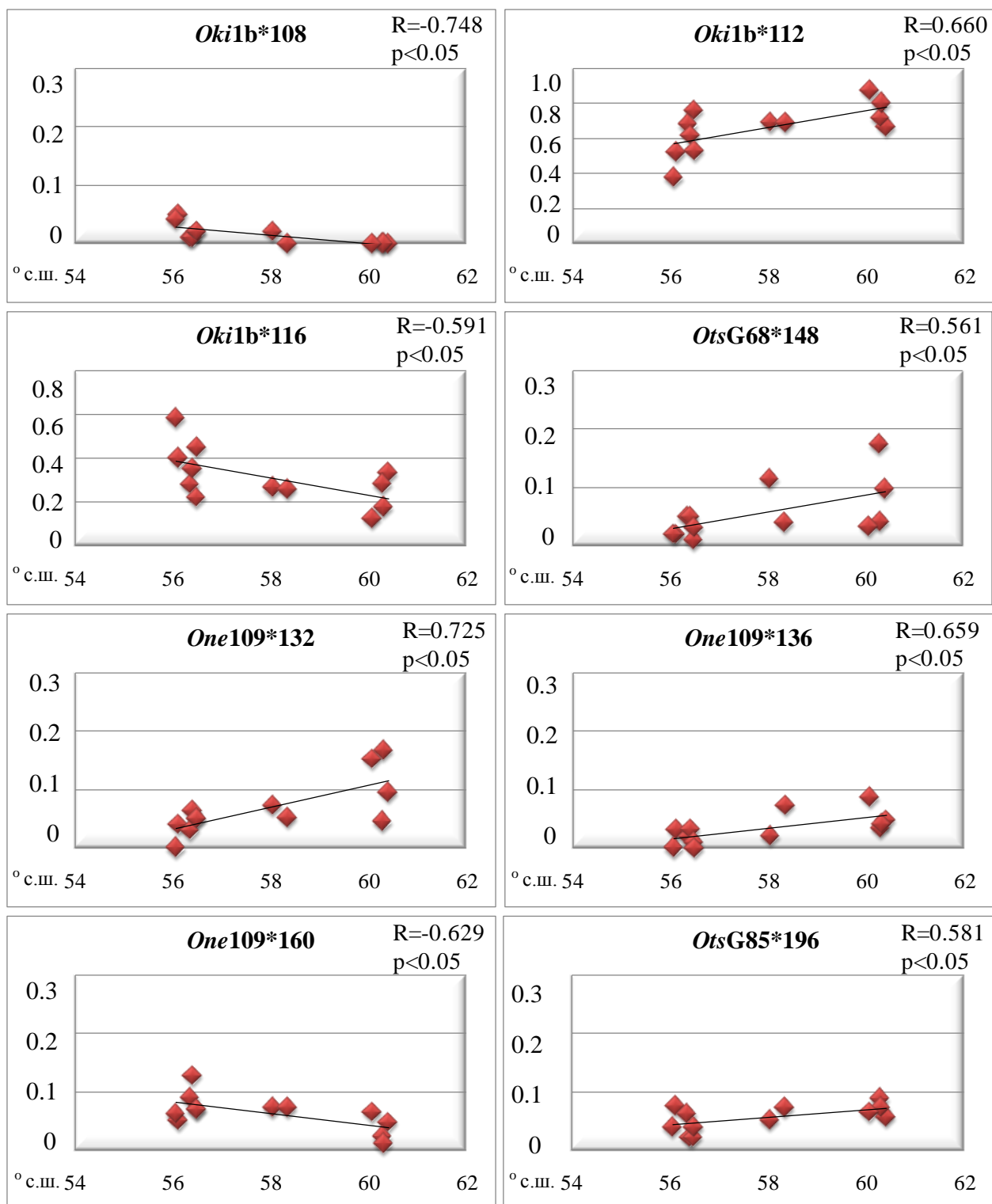


Рисунок 3.14. Корреляция между географической широтой водоема и частотами аллелей микросателлитных локусов в популяциях нерки восточного побережья Камчатки.

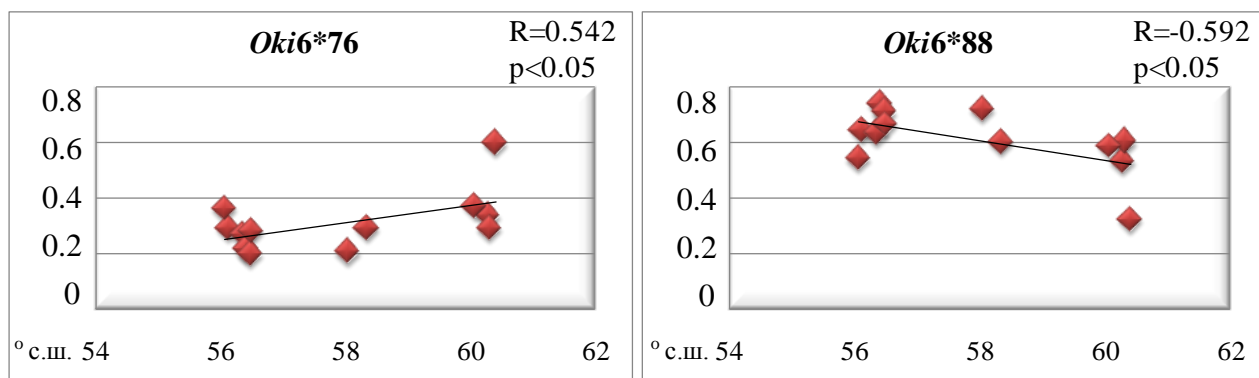


Рисунок 3.15. Корреляция между географической широтой водоема и частотами аллелей микросателлитных локусов в популяциях нерки восточного побережья Камчатки.

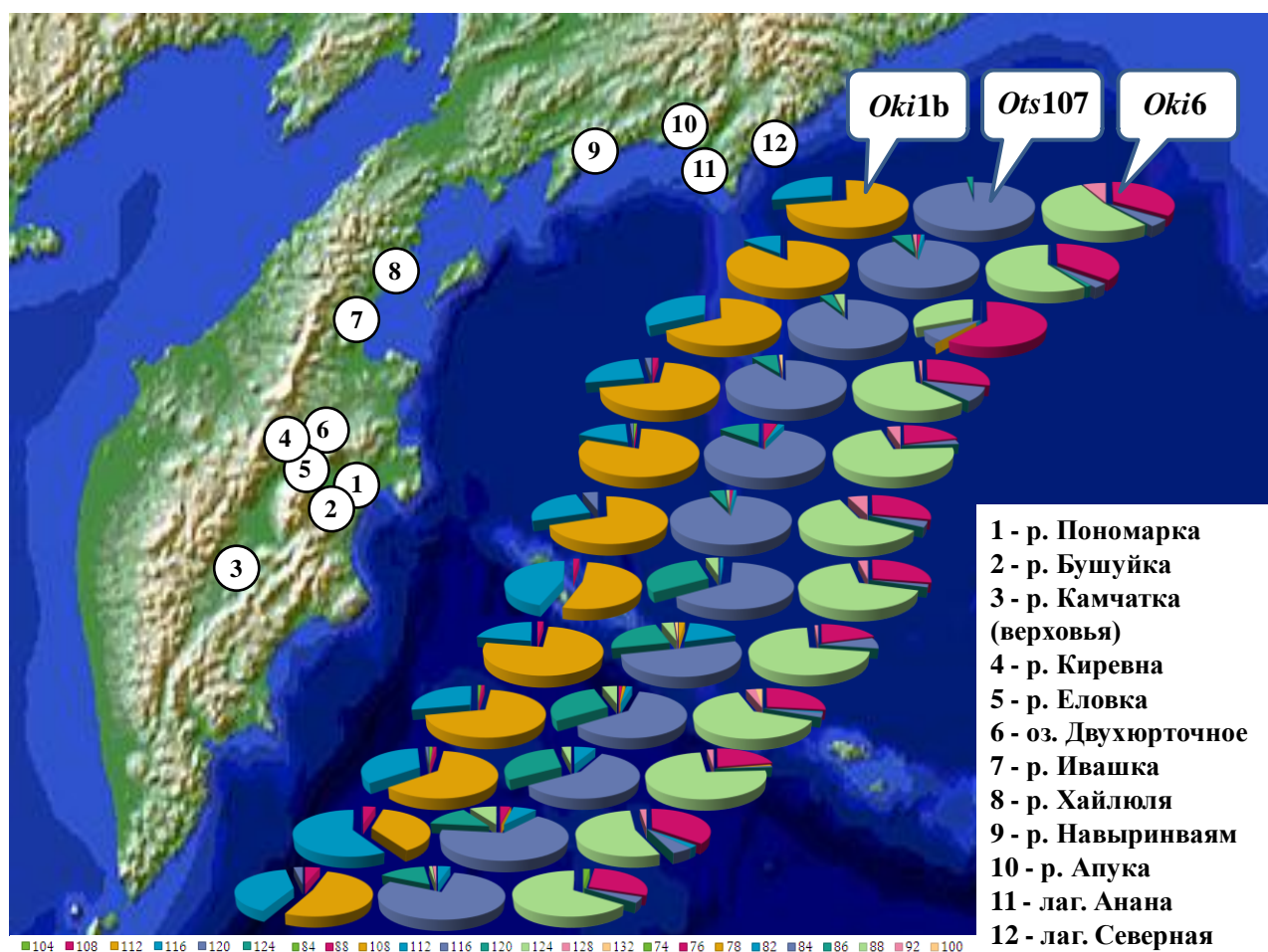


Рисунок 3.16. Изменчивость частот доминирующих аллелей трех микросателлитных локусов, достоверно коррелирующих с географической широтой нерестовых водоемов (круговые дендрограммы располагаются снизу вверх, согласно порядковым номерам выборок).

3.3. Межпопуляционная генетическая дифференциация

Ранее, в результате популяционных исследований нерки на основе анализа аллозимной изменчивости были определены уровни иерархии внутривидовой подразделенности — континенты (азиатская и североамериканская части ареала), регионы и нерестовые локальности, включающие сезонные расы и экологические формы (Алтухов и др., 1997). Для нерки Азии основными регионами воспроизводства, в соответствии с вышеупомянутой схемой иерархии, являются Западная Камчатка, бассейн р. Камчатка и Восточная Камчатка (Алтухов и др., 1997). Было показано, что степень межпопуляционного генетического разнообразия, как по генам, выявляемым методами биохимической генетики, так и по гаплотипам митохондриальной ДНК не связана с географической удаленностью исследованных локальностей — гетерогенность в пределах крупной речной системы может превышать гетерогенность между регионами, а относительные величины генного разнообразия на разных уровнях внутривидового подразделения сходны (Withler, 1985; Varnavskaya et al., 1994a,b; Алтухов и др., 1997; Брыков и др., 2005). Несколько иная картина внутривидовой подразделенности нерки на азиатской части ареала была получена при анализе аллельной изменчивости микросателлитных локусов. Исследования популяционной структуры с использованием полиморфных микросателлитов позволили сделать заключение о высокой разрешающей способности данной группы популяционно-генетических маркеров и выявить достаточно четкую подразделенность нерки Азии, соответствующую географической приуроченности исследованных локальностей (Beacham et al., 2006a,b; Хрусталева, 2007; Хрусталева и др., 2010).

В настоящей работе на основе изменчивости частот восьми микросателлитных локусов был рассчитан показатель дифференциации θ_{st} — для популяций нерки восточного побережья Камчатки и для этих же популяций, включая дополнительно выборку из оз. Саранное (о. Беринга,

Командорские о-ва). Средние значения величины межпопуляционной дифференциации (θ_{st}) по восьми локусам для двух вышеуказанных вариантов анализа составили 2.93 и 3.30%, соответственно (табл. 3.5), и оказались статистически значимыми (95%-ный бутстреп-интервал положительный). Максимальный вклад в дифференциацию нерки исследованных локальностей внес локус *Ots107*. При девяти выявленных аллелях, значение θ_{st} составило около 9.8%. Минимальный вклад внес локус *OtsG85* — менее 0.5%. Указанные ранее высокополиморфные локусы — *One109*, *One104* и *OtsG85*, у которых не выражен основной аллель, а частота большей части аллельных вариантов не превышает значение 0.10, оказались для проанализированных выборок наименее дифференцирующими.

Таблица 3.5. Показатель дифференциации θ_{st} нерки восточного побережья Камчатки и Командорских о-вов по восьми микросателлитным локусам (в %)

Локус	θ_{st} восточное побережье Камчатки	θ_{st} восточное побережье Камчатки и оз. Саранное
<i>Ots107</i>	9.78	9.79
<i>Oki1a</i>	1.56	2.89
<i>Oki1b</i>	6.33	7.00
<i>One104</i>	1.48	1.60
<i>One109</i>	1.18	1.38
<i>OtsG68</i>	5.12	6.67
<i>Oki6</i>	3.55	3.22
<i>OtsG85</i>	0.46	0.47
Среднее	2.93	3.30
95%-ный бутстреп интервал	1.60–5.00	1.78–5.56

Сравнение выборок с использованием показателя генетической дифференциации F_{st} выявило достоверные различия в большинстве случаев попарных сравнений (табл. 3.4). Исключением являются шесть пар географически близких популяций, различия между которыми не достигли статистически значимого уровня: р. Киревна – р. Камчатка, р. Камчатка –

оз. Двухюрточное, р. Киревна – р. Еловка, р. Камчатка – р. Еловка, р. Хайлюля – р. Ивашка, лагуна Анана – лагуна Северная. Кроме того, для указанных пар оказались свойственны наименьшие величины генетических дистанций Нея (табл. 3.3). В соответствии с полученными результатами, наиболее дифференцированной является нерка рек Апука (Олюторский з-в) и Бушуйка (приток оз. Азабачье в бассейне р. Камчатка).

Представление полученных результатов в виде бескорневого NJ-дерева отражает четкое соответствие генетических различий географической удаленности исследованных локальностей и последовательность формирования

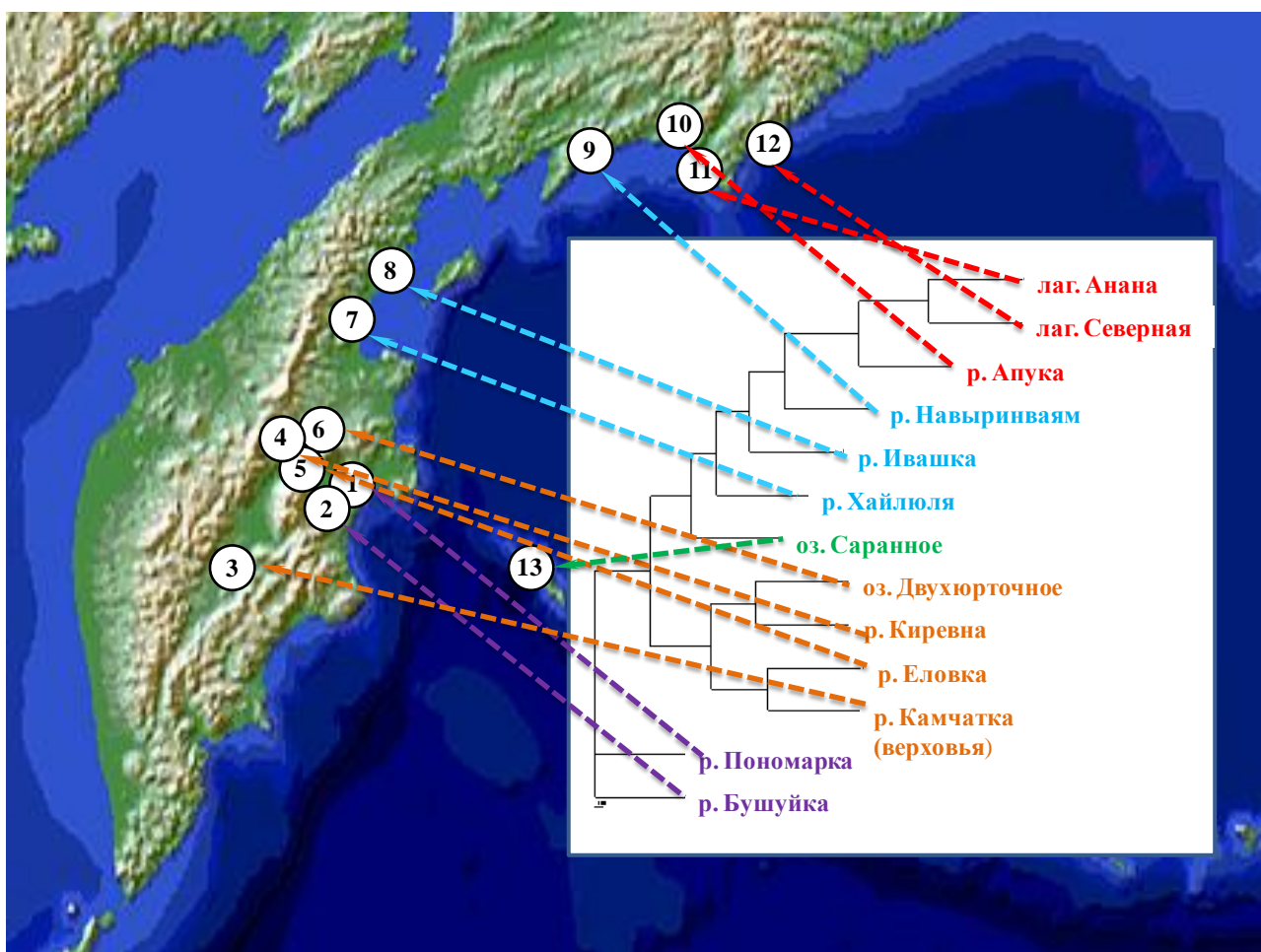


Рисунок 3.17. NJ-дендрограмма, построенная по дистанциям Нея (Nei, 1972), отражающая соответствие степени генетического сходства популяций их географической близости.

(заселения) водоемов неркой с юга на север (рис. 3.17). Присоединение к «ближайшему соседу» происходит строго последовательно вдоль восточного побережья п-ова Камчатка от наиболее северных популяций — лагуны Северная и Анана, к относительно южным, расположенным в бассейне р. Камчатка. Командорская популяция генетически наиболее близка к рекам Карагинского залива — Хайлюля и Ивашка. Относительная обособленность рек Пономарка и Бушуйка (бассейн оз. Азабачье), вероятно, может объясняться принадлежностью нерестящихся в них особей не к речной, а к озерной форме.

Кластеризация выборок нерки Восточной Камчатки, выполненная по хордовым дистанциям Кавалли-Сфорца и Эдвардса и представленная в виде консенсусного NJ-дерева (рис. 3.18), позволяет выделить два основных кластера с высокой бутстреп-поддержкой — бассейн р. Камчатка и северо-восточные популяции (Карагинский, Олюторский районы).

Использование многомерного шкалирования на основе дистанций Нея (рис. 3.19) позволило в пределах группы выборок из бассейна р. Камчатка более четко выделить оз. Азабачье — рр. Бушуйка и Пономарка, а северо-восточные популяции разделить на два кластера, соответствующие их географическому положению.

Таким образом, включенные в анализ выборки образовали пять относительно дифференцированные групп — «оз. Азабачье», «бассейна р. Камчатка», «Карагинский р-н» (включающий р. Навыринваям, расположенную на юге Олюторского р-на), «север Олюторского р-на» и «Командорские о-ва» (далее — популяционные группы № I, II, III, IV и V, соответственно).

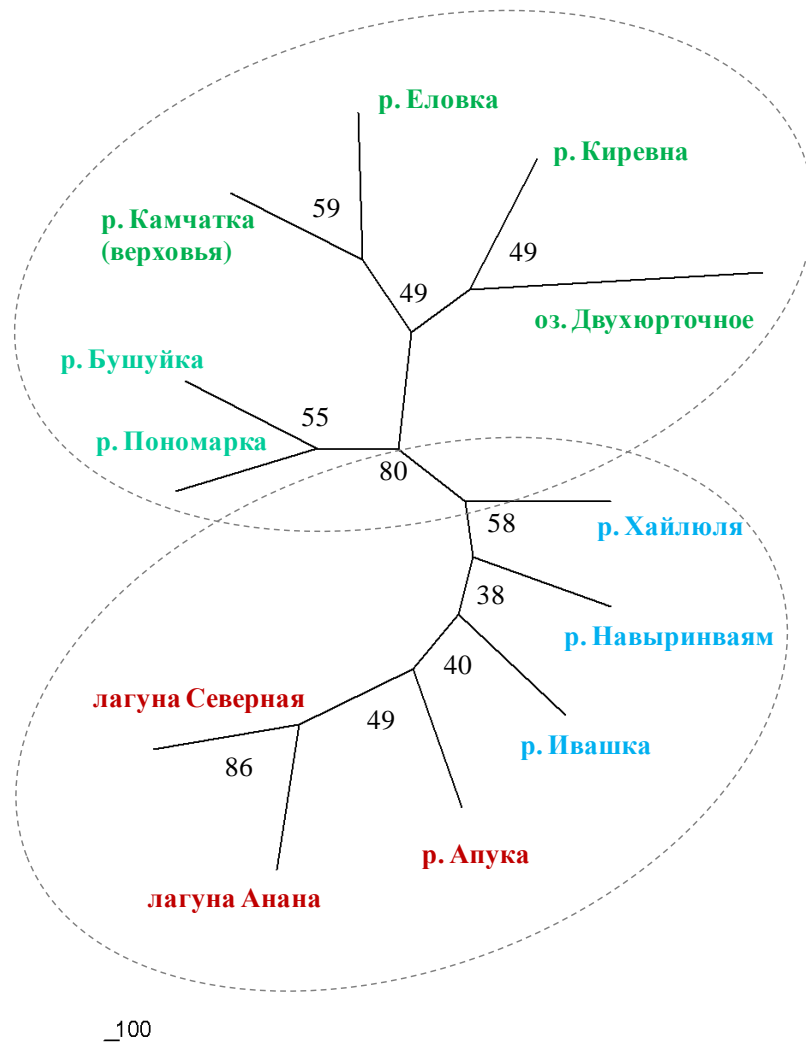


Рисунок 3.18. NJ-дендрограмма, построенная по хордовым дистанциям Кавалли-Сфорца и Эдвардса (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967) на основе аллельной изменчивости микросателлитных локусов.

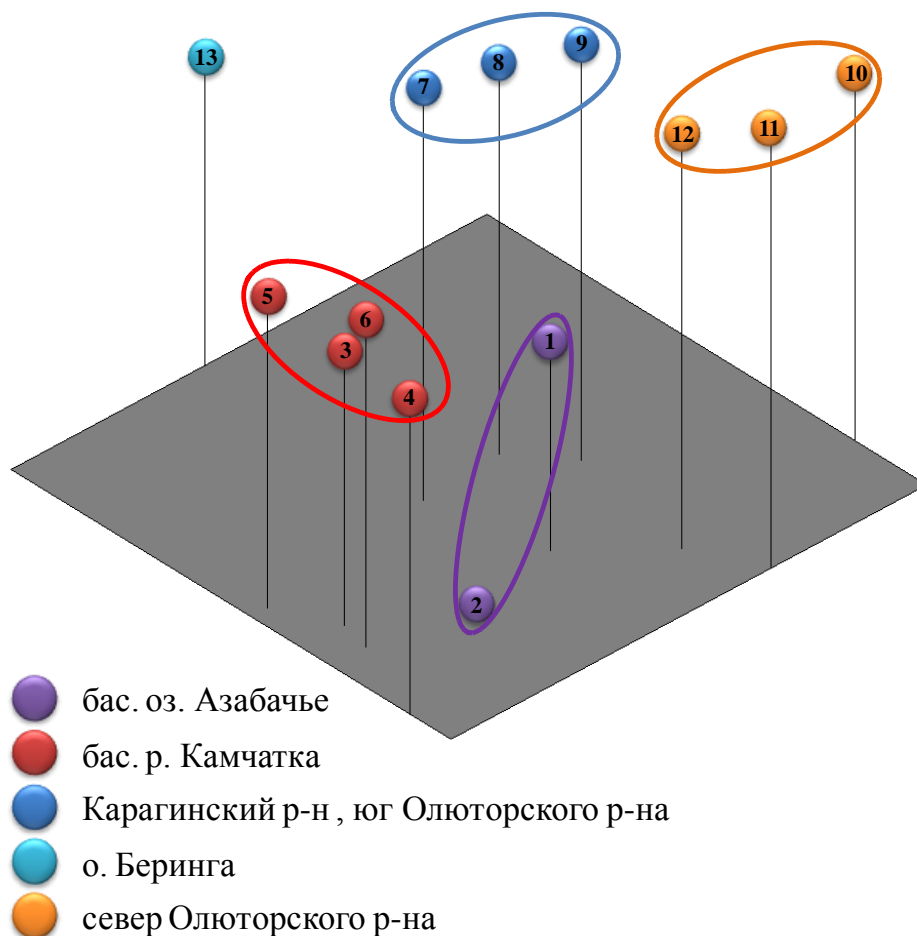


Рисунок 3.19. Результаты многомерного шкалирования выборок из восточнокамчатских популяций нерки (генетические дистанции Неи). Номера выборок соответствуют таковым в таблице 2.1.

Для количественной оценки величины генетических различий между выделенными группами провели иерархический анализ молекулярной дисперсии (AMOVA), для чего разложили общую молекулярную дисперсию на три иерархических уровня (табл. 3.6). Было показано, что основная часть молекулярного разнообразия (95.47%) имеет место внутри выборок, на долю межгрупповой компоненты приходится 3.33%, что значительно превосходит дисперсию между выборками внутри групп (1.20%).

Таблица 3.6. Результаты иерархического анализа генетических различий

Уровень разнообразия	d.f.	Абсолютные оценки	Процент дисперсии
Между выборками	8	0.02471	1.20%
Между выделенными группами	4	0.06862	3.33%
Внутри выборок	1263	1.96843	95.47%
Общее	1275	2.06176	100.00%

Дифференциация популяционных групп статистически значима во всех случаях попарных сравнений (табл. 3.7, среднее по всем локусам значение θ_{st} , %). Полученные результаты позволили заключить, что нерка оз. Саранное в наибольшей степени отлична от других восточнокамчатских популяций. Кроме того, наиболее выраженные отличия имеют место между выборками из бассейна р. Камчатка, включая оз. Азабачье, и северной части Олюторского р-на.

Следует отметить, что по исследованным микросателлитам величины θ_{st} заметно различаются, и в отдельных случаях относительно малоинформативные локусы вносят значительный вклад в межгрупповую дифференциацию. Так, по локусу *Oki1a* имеют место значительные различия между особями групп № 1 и № 5, по локусу *Oki6* — групп № 2 и № 4 (табл. 3.7).

При формировании наборов маркеров для анализа генетической изменчивости популяций в пределах пяти выделенных групп, необходимо учитывать, что вклад отдельных локусов во внутригрупповую (межпопуляционную) дифференциацию неодинаков (рис. 3.20). Так, нерка Бассейна р. Камчатка (популяционные группы № 1 и № 2) наиболее гетерогенна по локусу *Oki1b*, группа популяций № 3 — по локусам *Ots107* и *Oki1a*, № 4 — по локусам *Oki1b* и *Oki6*. В среднем по всем локусам величина внутригрупповой межпопуляционной дифференциации (θ_{st}) невелика, составляя 0.8% для групп № 1 и № 2, 1.0% для группы популяций № 3 и 1.6% для группы № 4 (95%-ный бутстреп-интервал положительный, нижняя граница от 0.2 до 0.4%. Нерку Командорских о-вов не анализировали, поскольку она представлена в данном исследовании только одной выборкой из оз. Саранное.

Таблица 3.7. Дифференциация (θ_{st} , %) популяционных групп нерки восточного побережья Камчатки по восьми микросателлитным локусам

Популяционные группы	<i>Ots107</i>	<i>Oki1a</i>	<i>Oki1b</i>	<i>One104</i>	<i>One109</i>	<i>OtsG68</i>	<i>Oki6</i>	<i>OtsG85</i>	Среднее	95% – бутстреп-интервал	
										нижний	верхний
№ 1 «оз. Азабачье» – № 2 «бассейн р. Камчатка»	3.40	3.12	6.07	1.16	0.63	4.27	1.27	0.22	2.17	1.08	3.67
№ 1 «оз. Азабачье» – № 3 «Карагинский р-н, юг Олюторского р-на»	6.12	3.98	10.06	1.08	0.18	7.89	0.02	0.07	2.91	0.09	5.77
№ 1 «оз. Азабачье» – № 4 «север Олюторского р-на»	6.94	1.79	17.93	0.98	1.42	0.95	0.97	0.09	2.99	0.79	7.36
№ 1 «оз. Азабачье» – № 5 «оз. Саранное»	4.39	18.37	0.48	1.18	2.65	19.39	0.26	0.00	5.13	0.81	11.19
№ 2 «бассейн р. Камчатка» – № 3 «Карагинский р-н, юг Олюторского р-на»	15.91	0.22	0.36	1.55	0.53	0.97	0.48	0.05	1.99	0.26	5.31
№ 2 «бассейн р. Камчатка» – № 4 «север Олюторского р-на»	16.66	-0.04	3.30	1.28	1.11	8.04	5.66	0.13	3.70	1.25	7.45
№ 2 «бассейн р. Камчатка» – № 5 «оз. Саранное»	12.86	7.35	7.16	1.46	1.84	6.92	1.53	0.00	4.13	1.92	7.41
№ 3 «Карагинский р-н, юг Олюторского р-на» – № 4 «север Олюторского р-на»	-0.25	0.08	1.03	0.45	1.48	12.26	2.57	-0.18	2.23	0.28	5.43
№ 3 «Карагинский р-н, юг Олюторского р-на» – № 5 «оз. Саранное»	-0.61	5.84	11.80	2.39	1.21	4.66	-0.35	0.00	2.90	0.91	5.76
№ 4 «север Олюторского р-на» – № 5 «оз. Саранное»	0.45	9.08	20.98	2.91	3.41	25.35	1.20	0.00	7.45	2.28	7.45
Между всеми группами	10.48	2.76	6.38	1.30	1.15	7.48	1.84	0.03	3.06	1.30	5.50

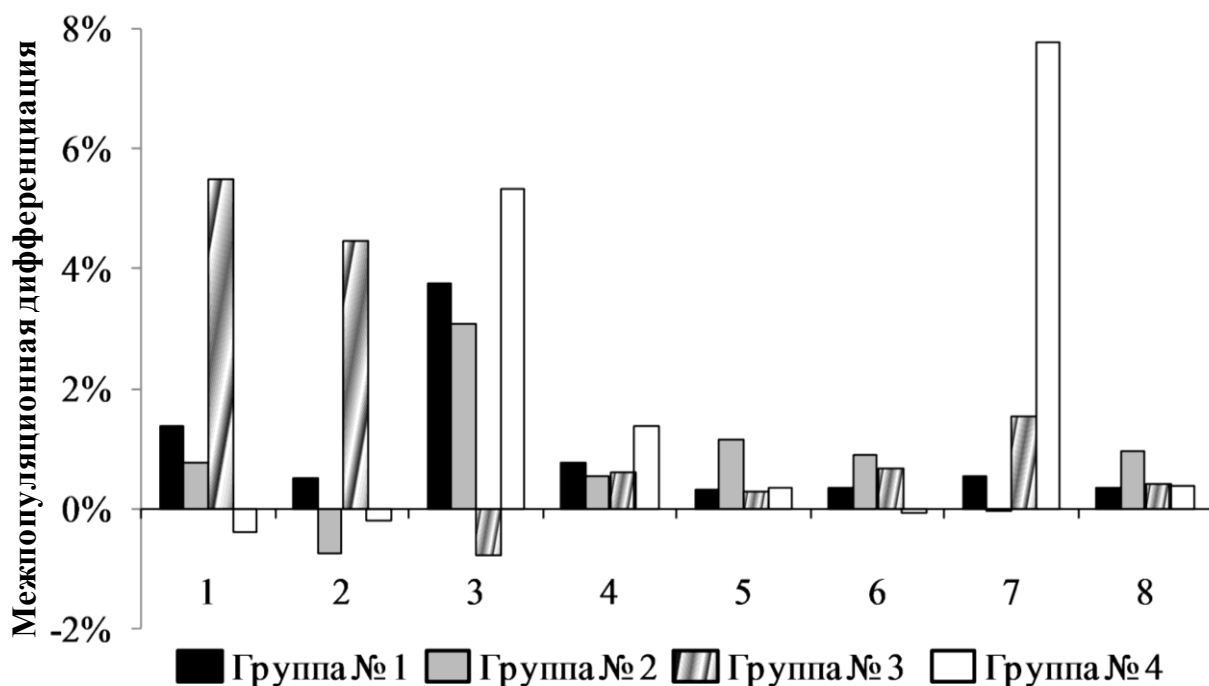


Рисунок 3.20. Вклад отдельных локусов в дифференциацию популяций в пределах каждой из четырех выделенных групп (θ_{st} , %); 1 — *Ots107*, 2 — *Oki1a*, 3 — *Oki1b*, 4 — *One104*, 5 — *One109*, 6 — *OtsG68*, 7 — *Oki6*, 8 — *OtsG85*; группы выборок: № 1 — «оз. Азабачье», № 2 — «бассейн р. Камчатка», № 3 — «Карагинский р-н, юг Олюторского р-на», № 4 — «север Олюторского р-на» (№ 5 отсутствует, поскольку группа представлена одной выборкой).

Таким образом, исходя из вышеизложенного, можно заключить, что нерка исследованных локальностей Восточной Камчатки характеризуется статистически значимой неоднородностью распределения частот аллелей микросателлитных локусов. Имеет место соответствие степени генетического сходства популяций их географической близости. Уровень различий между популяционными группами значительно превышает уровень межпопуляционной дифференциации.

ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НЕРКИ ЗАПАДНОЙ КАМЧАТКИ (на примере бассейна р. Озерная)

4.1. Дифференциация сезонно-экологических форм нерки оз. Курильское (бассейн р. Озерная)

Исходя из того, что в нерестовом ходе нерки в бассейне оз. Курильское четко не выражены сезонные периоды, как не выражены они и в сроках нереста рыб, а также с учетом относительно низкой численности особей раннего времени хода, долгое время существовала точка зрения, что озерновское стадо нерки однородно и представлено только одной сезонной расой — поздней (Егорова, 1970, 1977; Селифонова, 1978; Крогиус, 1983). Однако по результатам анализа аллозимных генов были выявлены достоверные отличия между выборками различного времени нерестового хода (Мацак, 1983а,б). Кроме того, было показано сходство между выборками из р. Озерная определенного периода нерестового хода с выборками из разных нерестилищ оз. Курильское, что позволило выделить три сезонно-экологические формы — ранняя (весенняя) речная, поздняя (летняя) речная и поздняя (летняя) литоральная (Мацак, 1983а,б, 1989; Варнавская, 1988а, 2006). Вероятно, генетические различия у производителей разного времени нерестового хода объясняются их относительной репродуктивной изоляцией, а также наличием субпопуляций, размножающихся на пространственно разобщенных нерестилищах.

В настоящей работе был проведен сравнительный анализ выборок нерки с литоральных и речных типов нерестилищ в бассейне оз. Курильское, относящихся к различным периодам нерестового хода. Используются опубликованные и находящиеся в общем доступе данные по аллельным частотам 14-ти микросателлитных локусов — *Ots2*, *Ots3*, *Ots100*, *Ots103*, *Ots107*, *Ots108*, *One8*, *Omy77*, *Oki1a*, *Oki1b*, *Oki6*, *Oki9*, *Oki16*, *Oki29* (Варнавская, 2006).

Для выявления уровня внутривидовой подразделенности нерки оз. Курильское включенные в анализ выборки сгруппировали в зависимости от

времени нереста (раннего и позднего хода) и локализации нерестилищ (речные и литоральные) (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Сезонно-экологические группы, включенных в анализ выборок нерки оз. Курильское

№	Локальность		Дата сбора	Объем выборки, экз.
1	Речные раннего хода	р. Кирушутк	15.08.1989	72
2		р. Выченкия	28.07.2000	100
3		р. Кирушутк	31.07.2000	50
4		р. Гаврюшка	02.08.2000	50
5		р. Этамынк	05.08.2000	50
6	Литоральные раннего хода	бух. Южная	24.08.1989	45
7		бух. Гаврюшка	23.08.1989	35
8		бух. Гаврюшка	17.08.2000	50
9		бух. Гаврюшка, м. Тугумынк	18.08.2000	50
10		бух. Южная	28.08.2000	53
11		бух. Северная дальняя	30.08.2000	50
12		бух. Хакыцин	31.08.2000	50
13	Литоральные позднего хода	бух. Оладочная	23.09.1989	45
14		бух. Оладочная	08.10.2000	50
15		бух. Северная ближняя	09.10.2000	50
16		бух. Озерная	09.10.2000	50

Сравнительный анализ частот микросателлитных локусов в выборках, отобранных в 1989 г., выявил статистически значимые различия между речной формой нерки раннего хода и литоральной формой позднего хода по четырем локусам (табл. 4.2).

Результаты оценки гетерогенности выборок 2000 г. представлены в таблице 4.3. По пяти из четырнадцати локусов выявлены различия между группами речных и литоральных выборок раннего периода нерестового хода, по восьми локусам — между выборками с литоральных нерестилищ, собранных в августе (ранние) и октябре (поздние). Наибольшие отличия — по всем локу-

Таблица 4.2. Оценка внутривидовой гетерогенности по частотам микросателлитных локусов у представителей разных сезонно-экологических форм нерки оз. Курильское в 1989 г. (χ^2 -критерий)

Локус	Речные раннего хода – литоральные позднего хода	<i>df</i>
<i>Oki1a</i>	8.53*	3
<i>Oki1b</i>	6.24	3
<i>Oki6</i>	9.27	7
<i>Oki10</i>	41.13	34
<i>Oki16</i>	22.19	14
<i>Oki29</i>	29.47*	16
<i>Omy77</i>	3.50	6
<i>One8</i>	10.35	10
<i>Ots2</i>	12.26	10
<i>Ots3</i>	6.43	7
<i>Ots100</i>	25.00*	15
<i>Ots103</i>	22.11	18
<i>Ots107</i>	10.70	5
<i>Ots108</i>	39.88*	17

Примечание. * — $P < 0.05$, *df* — число степеней свободы.

Таблица 4.3. Оценка внутривидовой гетерогенности по частотам микросателлитных локусов у представителей разных сезонно-экологических форм нерки оз. Курильское в 2000 г. (χ^2 -критерий)

Локус	Речные раннего хода – литоральные раннего хода	<i>df</i>	Речные раннего хода – литоральные позднего хода	<i>df</i>	Литоральные раннего хода – литоральные позднего хода	<i>df</i>
<i>Oki1a</i>	4.75	3	9.04*	3	7.35	4
<i>Oki1b</i>	1.40	3	15.00*	4	8.90	4
<i>Oki6</i>	10.74	8	19.92*	7	17.80*	7
<i>Oki10</i>	98.09*	55	86.09*	62	67.74	55
<i>Oki16</i>	21.73	13	48.43*	14	27.30*	12
<i>Oki29</i>	19.54	17	19.54	17	40.02*	18
<i>Omy77</i>	16.64*	7	37.40*	8	11.92	6
<i>One8</i>	56.44*	11	62.81*	11	22.15*	10
<i>Ots2</i>	36.57*	13	37.70*	11	25.70*	12
<i>Ots3</i>	17.59*	8	15.50*	8	7.73	6
<i>Ots100</i>	29.50	19	66.90*	20	35.70*	17
<i>Ots103</i>	30.49	21	49.75*	22	39.29*	20
<i>Ots107</i>	4.47	5	10.28	6	7.36	6
<i>Ots108</i>	26.40	17	32.46*	16	28.80*	17

Примечание. * — $P < 0.05$, *df* — число степеней свободы.

сам, за исключением *Oki29* и *Ots107*, обнаружены при сравнения выборок, различающихся не только временем сбора — август и октябрь, но и типом нерестилищ, т.е. наибольшая степень дифференциации в бассейне оз. Курильское характерна для речной ранней и литоральной поздней форм нерки.

Результаты применения метода многомерного шкалирования подтвердили наибольшее генетическое своеобразие нерки раннего времени хода и позволили выделить выборки из рр. Кирушутк, Выченкия, Этамынк и Гаврюшка, относящиеся к ранней речной форме, в достаточно обособленную группу (рис. 4.1).

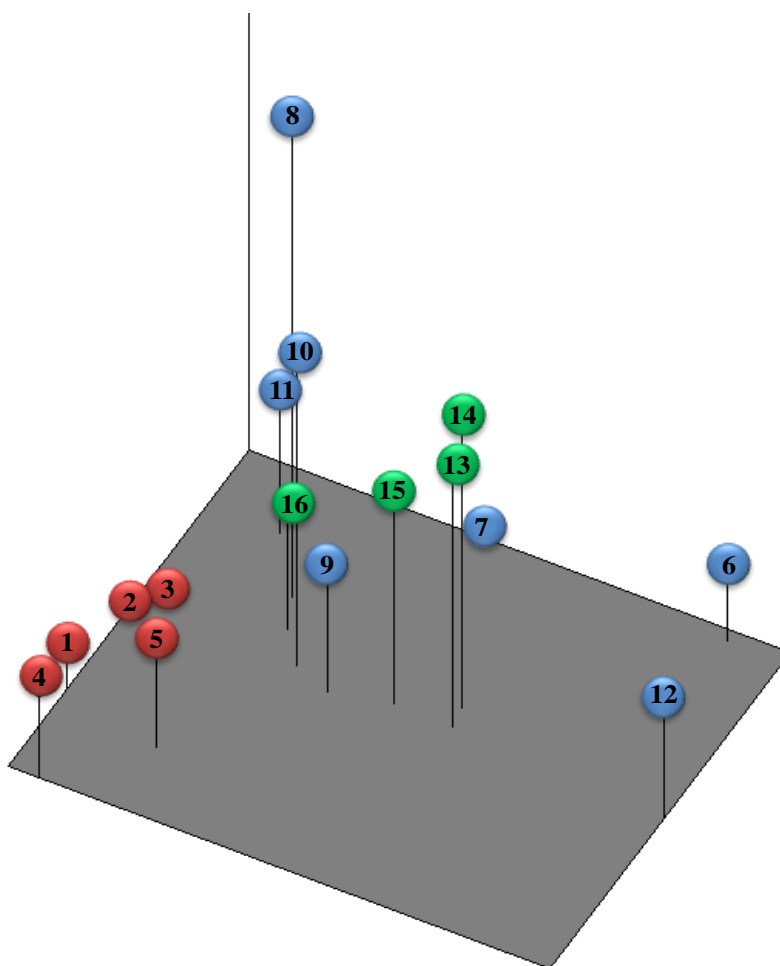


Рисунок 4.1. Результаты многомерного шкалирования выборок из бассейна оз. Курильское 1989 и 2000 гг. на основе хордовых генетических дистанций. Красным цветом обозначены речные выборки раннего хода, синим — литоральные раннего хода, зеленым — литоральные позднего хода. Номера выборок соответствуют таковым в таблице 4.1.

4.2. Характеристика дискриминирующей способности микросателлитных локусов нерки бассейна р. Озерная

Массовый ход нерки в р. Озерная наблюдается с середины июля до начала сентября, рунный ход — с конца июля по середину августа (Бугаев, 2011). Для проведения исследования были отобраны четыре выборки производителей нерки из уловов закидных неводов ОАО «Озерновский РКЗ № 55» в нижнем течении реки р. Озерная, относящихся к различным периодам нерестового хода (рис. 4.2). Исходя из того, что в нерестовом ходе четко не выражены сезонные периоды, выборки были отобраны с приблизительно равными временными интервалами (13.07.2011 г., 22.07.2011 г., 02.08.2011 г. и 16.08.2011 г.). Соответственно, особи, пойманные 13.07, условно отнесены в настоящем исследовании к «ранним», а выборка от 16.08, отобранная более чем с месячным интервалом, считалась «поздней».

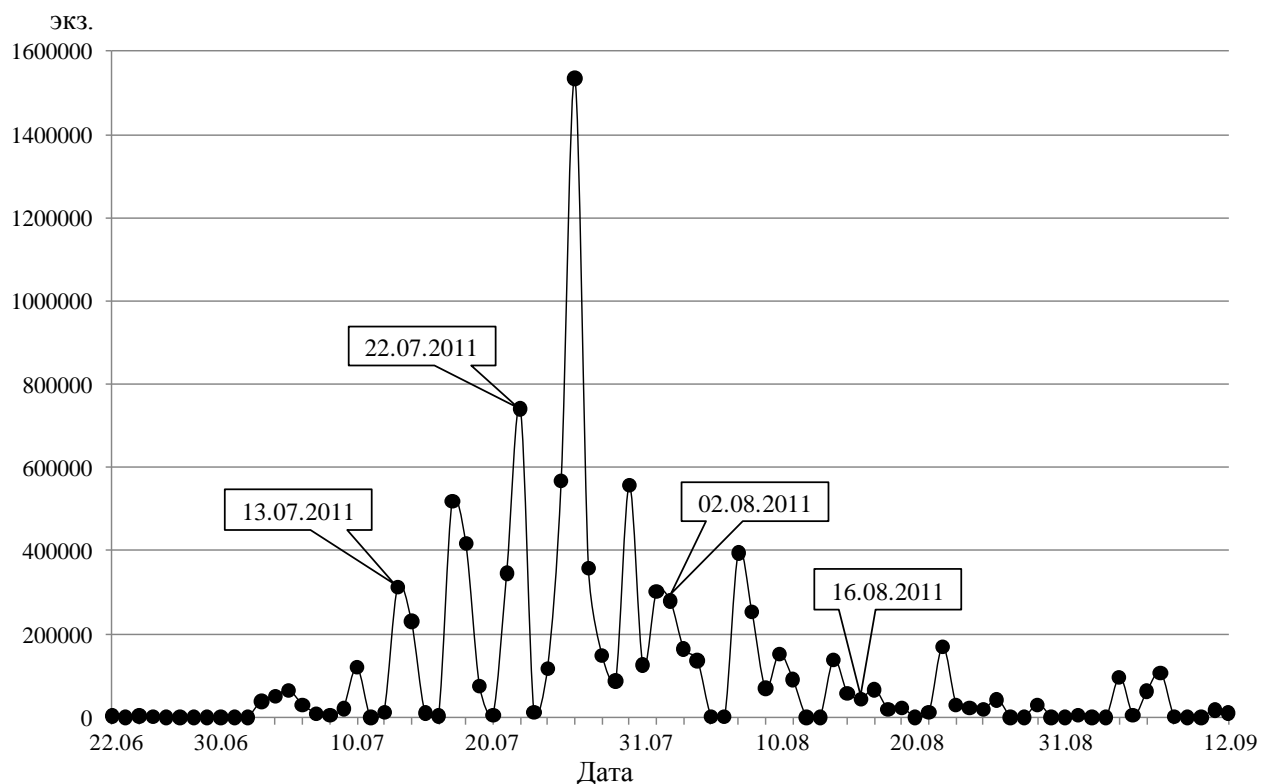


Рисунок 4.2. Динамика нерестового хода нерки р. Озерной в 2011 г. Выносками обозначены даты сбора четырех исследованных выборок.

Данный раздел исследования включал три этапа:

- апробация и подбор микросателлитных локусов, для которых возможна относительно устойчивая и объективная интерпретация аллельных вариантов;
- оценка генетических различий двух наиболее удаленных по времени выборок по максимально возможному числу микросателлитных локусов;
- оценка генетической изменчивости всех включенных в анализ выборок по наиболее дифференцирующим микросателлитам.

Для анализа генетической изменчивости выборок нерки р. Озерная была проведена апробация тридцати шести микросателлитных локусов (см. табл. 2.3). Из них для анализа выборок от 13.07.2011 г. и 16.08.2011 г. было отобрано девятнадцать (табл. 4.4). Всего было обнаружено 194 аллеля в двух выборках. Число аллелей варьировало в широком диапазоне — от 3-х до 25, при среднем значении 10.2. Наиболее полиморфными оказались локусы *OtsG85* и *One104*, наименее — *Ots107*.

Характеристики генетической изменчивости выборок представлены на рисунке 4.3 и в таблице 4.5. Среднее число аллелей в «ранней» выборке нерки — 9.0, было несколько выше данного показателя в «поздней» — 8.7. При сравнении выборок по числу информативных аллелей — 4.58 в «ранней» против 4.63 в «поздней», и эффективных аллелей — 4.79 против 4.88, можно отметить, что значения указанных параметров незначительно выше в «поздней» выборке.

В выборке от 13.07 наблюдались значимые отклонения от равновесия Харди-Вайнберга по локусу *Ots103*, а в выборке от 16.08 — по локусам *Oki1b* и *Ots100*.

Показатель дифференциации θ_{st} по всем локусам составил 0.96% (бутстреп-интервал положительный), что указывает на достоверные отличия частот аллелей в исследованных выборках.

Двухмерное распределение «ранней» и «поздней» выборок по принадлежности к собственной популяции на основании анализа полиморфизма 19-ти микросателлитных локусов представлено на рисунке 4.4.

Таблица 4.4. Характеристика микросателлитных локусов «ранней» и «поздней» выборки нерки р. Озерная

№ п/п	Локус	Число аллелей	Размер фрагмента, п. н.	H_e	H_o	f	θ_{st}
1	<i>Oki1a</i>	4	144–160	0.463	0.495	-0.069	5.96
2	<i>Oki1b</i>	4	108–120	0.513	0.606	-0.183	1.20
3	<i>OtsG68</i>	6	136–152	0.561	0.542	0.034	1.48
4	<i>Ots107</i>	4	88–120	0.257	0.253	0.018	2.87
5	<i>Oki6</i>	4	76–92	0.432	0.417	0.036	6.71
6	<i>One104</i>	18	120–188	0.910	0.926	-0.018	0.86
7	<i>One109</i>	16	120–180	0.903	0.857	0.051	0.62
8	<i>Omy77</i>	6	105–121	0.554	0.528	0.046	-0.10
9	<i>Ots100</i>	13	156–200	0.819	0.740	0.097	-0.27
10	<i>Ots103</i>	25	108–232	0.928	0.865	0.069	-0.24
11	<i>One105</i>	8	126–154	0.656	0.680	-0.036	0.25
12	<i>OtsG253</i>	13	114–158	0.823	0.828	-0.006	-0.76
13	<i>Omm1070</i>	21	144–260	0.898	0.818	0.089	0.04
14	<i>Ots3</i>	6	76–98	0.308	0.327	-0.060	7.10
15	<i>Ots108</i>	17	176–242	0.913	0.860	0.059	-0.03
16	<i>Omy1037</i>	7	193–221	0.621	0.560	0.098	0.05
17	<i>Oki23</i>	3	218–238	0.539	0.470	0.129	0.00
18	<i>Omy301</i>	4	64–70	0.134	0.140	-0.048	2.56
19	<i>OtsG85</i>	15	152–208	0.889	0.882	0.008	0.23
Среднее		10.21		0.639	0.621	0.029	0.95
95%-ный бутстреп-интервал						0.2–2.0	

Примечание. п. н. — пары нуклеотидов, H_e — средняя ожидаемая гетерозиготность, H_o — средняя наблюдаемая гетерозиготность, f — индекс фиксации, показатель дифференциации — θ_{st} , в %.

Распределение исследованных особей в соответствии с принадлежностью к собственной популяции (выборке) представленное на основании наличия и частоты встречаемости аллелей микросателлитов, общих для каждой из групп (Раеткау et al., 2004), показало, что обе анализируемые выборки консолидированы и формируют два достаточно обособленных и относительно слабо перекрывающихся массива. Вероятность отнесения особи к собственной популяции (выборке) составила 94%. Тем не менее, наличие между ними

перекрывающейся области указывает на отсутствие полной репродуктивной изоляции (рис. 4.4).

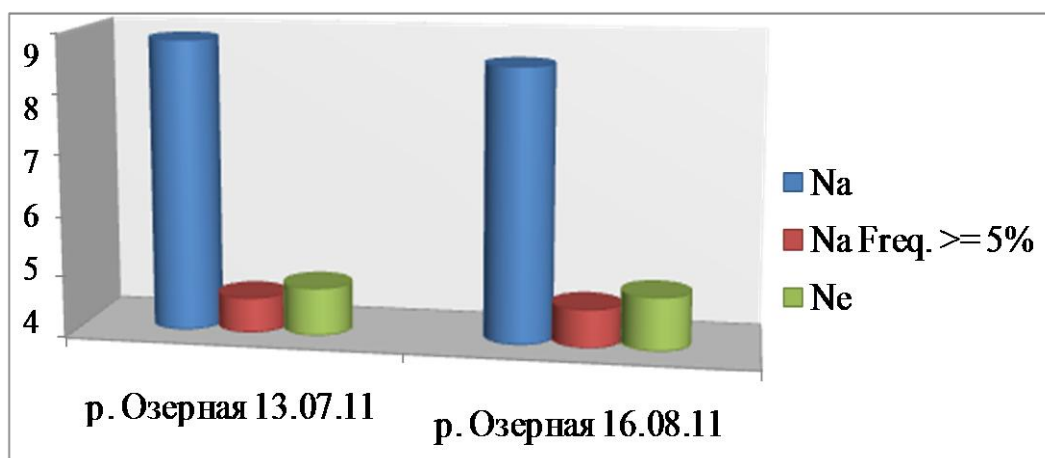


Рисунок 4.3. Аллельные профили выборок нерки р. Озерная (Na — среднее число аллелей на локус; $Na \geq 5\%$ — среднее число информативных аллелей на локус; Ne — среднее число эффективных аллелей на локус).

Таблица 4.5. Генетическая изменчивость выборок нерки р. Озерная по девятнадцати микросателлитным локусам

Локус	Характеристики популяции	р. Озерная, 13.07.11.	р. Озерная, 16.08.11.	Среднее по выборкам	Локус	Характеристики популяции	р. Озерная, 13.07.11.	р. Озерная, 16.08.11.	Среднее по выборкам
<i>Oki1a</i>	A	4	3	3.5	<i>Oki6</i>	A	3	4	3.5
	H_e	0.394	0.504	0.449		H_e	0.291	0.554	0.423
	H_o	0.469	0.520	0.494		H_o	0.260	0.587	0.423
	f	-0.194	-0.003	-0.104		f	0.108	-0.060	-0.002
	p	0.230	0.890			p	0.221	0.743	
<i>Oki1b</i>	A	4	4	4	<i>One104</i>	A	18	14	16
	H_e	0.470	0.549	0.510		H_e	0.914	0.899	0.907
	H_o	0.510	0.700	0.605		H_o	0.911	0.940	0.925
	f	-0.085	-0.279	-0.189		f	0.004	-0.046	-0.021
	p	0.511	0.034*			p	0.717	0.265	
<i>OtsG68</i>	A	5	4	4.5	<i>One109</i>	A	14	12	13
	H_e	0.576	0.536	0.556		H_e	0.902	0.897	0.899
	H_o	0.580	0.500	0.540		H_o	0.844	0.869	0.857
	f	-0.008	0.671	0.028		f	0.064	0.031	0.048
	p	0.976	0.510			p	0.165	0.508	

Окончание таблицы 4.5

<i>Ots107</i>	A	4	4	4	<i>Omy77</i>	A	5	4	4.5
	H_e	0.168	0.330	0.249		H_e	0.552	0.562	0.557
	H_o	0.178	0.320	0.249		H_o	0.500	0.564	0.532
	f	-0.058	0.031	0.001		f	0.095	-0.004	0.045
	p	0.553	0.553			p	0.267	0.862	
<i>Ots100</i>	A	12	11	11.5	<i>Ots103</i>	A	19	21	20
	H_e	0.806	0.834	0.820		H_e	0.929	0.929	0.929
	H_o	0.760	0.720	0.740		H_o	0.820	0.913	0.866
	f	0.576	0.138	0.098		f	0.112	0.017	0.068
	p	0.250	0.010*			p	0.005**	0.463	
<i>One105</i>	A	8	8	8	<i>OtsG253</i>	A	12	10	11
	H_e	0.624	0.687	0.655		H_e	0.838	0.814	0.826
	H_o	0.720	0.640	0.680		H_o	0.880	0.755	0.827
	f	-0.155	0.069	-0.037		f	-0.050	0.048	-0.002
	p	0.081	0.332			p	0.505	0.473	
<i>Omm107</i> 0	A	14	19	17.5	<i>Oki23</i>	A	3	3	3
	H_e	0.879	0.924	0.902		H_e	0.531	0.546	0.539
	H_o	0.787	0.866	0.827		H_o	0.440	0.500	0.470
	f	0.106	0.063	0.085		f	0.175	0.085	0.128
	p	0.053	0.119			p	0.131	0.462	
<i>Ots3</i>	A	6	5	5.5	<i>Omy301</i>	A	3	4	3.5
	H_e	0.467	0.156	0.311		H_e	0.059	0.205	0.132
	H_o	0.489	0.163	0.326		H_o	0.060	0.220	0.140
	f	-0.048	-0.047	-0.048		f	-0.014	-0.076	-0.061
	p	0.505	0.525			p	0.061	0.918	
<i>Ots108</i>	A	17	15	16	<i>OtsG85</i>	A	14	15	14.5
	H_e	0.922	0.904	0.913		H_e	0.880	0.897	0.889
	H_o	0.860	0.860	0.860		H_o	0.866	0.900	0.883
	f	0.068	0.049	0.058		f	0.016	-0.003	0.006
	p	0.077	0.229			p	0.558	0.793	
<i>Omy1037</i>	A	6	5	5.5	Среднее на локус	A	9	8.684	8.842
	H_e	0.669	0.568	0.619		H_e	0.624	0.6478	0.636
	H_o	0.600	0.520	0.560		H_o	0.607	0.636	0.621
	f	0.104	0.086	0.096		f	0.029	0.017	0.023
	p	0.192	0.322			p			

Примечание. A — число аллелей, H_e — средняя ожидаемая гетерозиготность, H_o — средняя наблюдаемая гетерозиготность, f — внутривидовой коэффициент инбридинга, p — вероятность соответствия наблюдаемых генотипических распределений равновесию Харди-Вайнберга (* — $P < 0.05$, ** — $P < 0.01$).

Таким образом, можно подчеркнуть, что выборки нерки из р. Озерная, собранные с разрывом во времени более месяца, статистически достоверно отличаются по частотам аллелей 19-ти локусов, хотя вклад отдельных локусов в дифференциацию значительно различается. Так, значения θ_{st} оказались в

отрицательном диапазоне по пяти локусам — *Omy77*, *Ots100*, *Ots103*, *OtsG253* и *Ots108*, а по шести микросателлитам — *One104*, *One109*, *One105*, *Omm1070*, *Omy1037* и *Oki23*, величина данного показателя была ниже 0.9% (табл. 4.4). Полученные результаты позволили для дальнейшего анализа отобрать только семь относительно информативных локусов — *Oki1a*, *Oki1b*, *OtsG68*, *Ots107*, *Oki6*, *Ots3*, *Omy301*. Для отобранных локусов показатель дифференциации θ_{st} превышал 1.0%, находясь в интервале от 1.2% (*Oki1b*) до 7.1% (*Ots3*) (табл. 4.4).

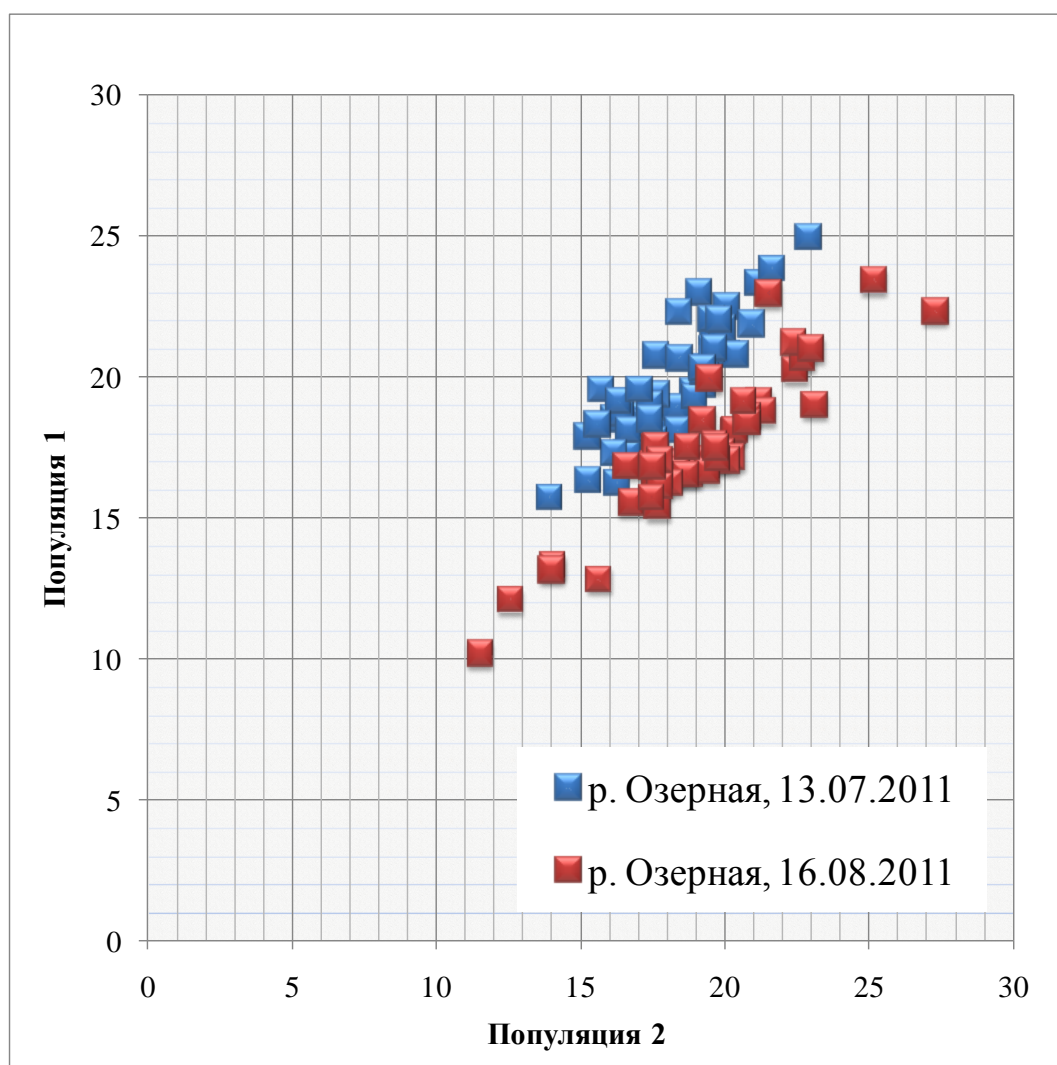


Рисунок 4.4. Двухмерное распределение «ранней» и «поздней» выборок нерки р. Озерная по принадлежности к собственной популяции на основании частот аллелей 19-ти микросателлитных локусов

На основе изменчивости частот аллелей семи вышеуказанных локусов были проанализированы особи из четырех выборок различного времени нерестового хода (табл. 4.6). В соответствии с распределениями частот аллельных вариантов, представленных на рисунке 4.5, в ряде случаев имеет место заметная тенденция к уменьшению или увеличению данных значений в выборках в зависимости от времени их сбора. В качестве примера можно отметить локус *Ots3* — частота аллеля 92 п. н. составила 0.72, 0.78, 0.88, 0.92 в выборках от 13.07., 22.07., 02.08. и 16.08., соответственно.

По семи локусам среднее значение θ_{sb} , указывая на значимую дифференциацию выборок, оказалось несколько выше, чем в предыдущем варианте анализа двух выборок по девятнадцати микросателлитам и составило 1.44%, при положительном бутстреп-интервале (нижняя граница 0.9), хотя по каждому отдельному локусу величины оценок изменились в меньшую сторону (табл. 4.7 и 4.4). Наибольший уровень дифференциации выявлен по локусу *Ots3*, наименьший — по *Ots107*.

Таблица 4.6. Генетическая изменчивость выборок нерки р. Озерная по семи микросателлитным локусам

Локус	Характеристики выборки	Выборки				Среднее по выборкам
		13.07.	22.07.	02.08.	16.08.	
<i>Oki1a</i>	A	4	3	4	3	3.5
	H_e	0.393	0.499	0.505	0.503	0.475
	H_o	0.469	0.416	0.487	0.520	0.473
	f	-0.194	0.167	0.036	-0.032	-0.004
	p	0.216	0.168	0.685	0.926	
<i>Oki1b</i>	A	4	4	4	4	4.0
	H_e	0.470	0.489	0.425	0.548	0.483
	H_o	0.510	0.488	0.357	0.700	0.504
	f	-0.084	0.084	0.163	-0.278	-0.042
	p	0.501	0.437	0.181	0.281*	
<i>OtsG68</i>	A	4	4	3	4	3.8
	H_e	0.567	0.559	0.559	0.535	0.553
	H_o	0.580	0.571	0.580	0.500	0.557
	f	-0.023	-0.022	-0.036	0.067	-0.004
	p	0.927	0.826	0.896	0.488	

Окончание таблицы 4.6

<i>Ots107</i>	A	4	5	4	4	4.3
	H_e	0.168	0.286	0.293	0.330	0.269
	H_o	0.177	0.300	0.285	0.320	0.270
	f	-0.058	-0.047	0.027	0.031	-0.004
	p	0.573	0.986	0.448	0.521	
<i>Oki6</i>	A	3	4	4	4	3.8
	H_e	0.291	0.506	0.434	0.554	0.447
	H_o	0.260	0.520	0.460	0.586	0.456
	f	0.107	-0.026	-0.058	-0.059	-0.022
	p	0.246	0.981	0.722	0.691	
<i>Ots3</i>	A	5	5	5	5	5.0
	H_e	0.437	0.371	0.222	0.155	0.296
	H_o	0.489	0.340	0.220	0.163	0.303
	f	-0.120	0.086	0.009	-0.047	-0.021
	p	0.334	0.258	0.525	0.535	
<i>Omy301</i>	A	3	3	3	3	3.0
	H_e	0.059	0.078	0.186	0.203	0.131
	H_o	0.060	0.060	0.200	0.220	0.135
	f	-0.013	0.023	-0.075	-0.080	-0.023
	p	0.050	0.041*	0.783	0.925	
Среднее на локус	A	3.857	4	3.857	3.857	3.892
	H_e	0.341	0.398	0.375	0.404	0.380
	H_o	0.363	0.379	0.370	0.430	0.385
	f	-0.067	0.048	0.014	-0.063	-0.015

Примечание. A — число аллелей, H_e — средняя ожидаемая гетерозиготность, H_o — средняя наблюдаемая гетерозиготность, f — внутривидовой коэффициент инбридинга, p — вероятность соответствия наблюдаемых генотипических распределений равновесию Харди-Вайнберга, * — статистически значимое отклонение от равновесия Харди-Вайнберга.

Таблица 4.7. Показатель дифференциации четырех выборок нерки р. Озерная по семи микросателлитным локусам (θ_{st} , в %)

Локус	θ_{st}
<i>Oki1a</i>	1.95
<i>Oki1b</i>	0.65
<i>OtsG68</i>	1.05
<i>Ots107</i>	0.60
<i>Oki6</i>	1.91
<i>Ots3</i>	2.82
<i>Omy301</i>	1.08
Среднее	1.44
95%-ный бутстреп-интервал	0.9–2.0

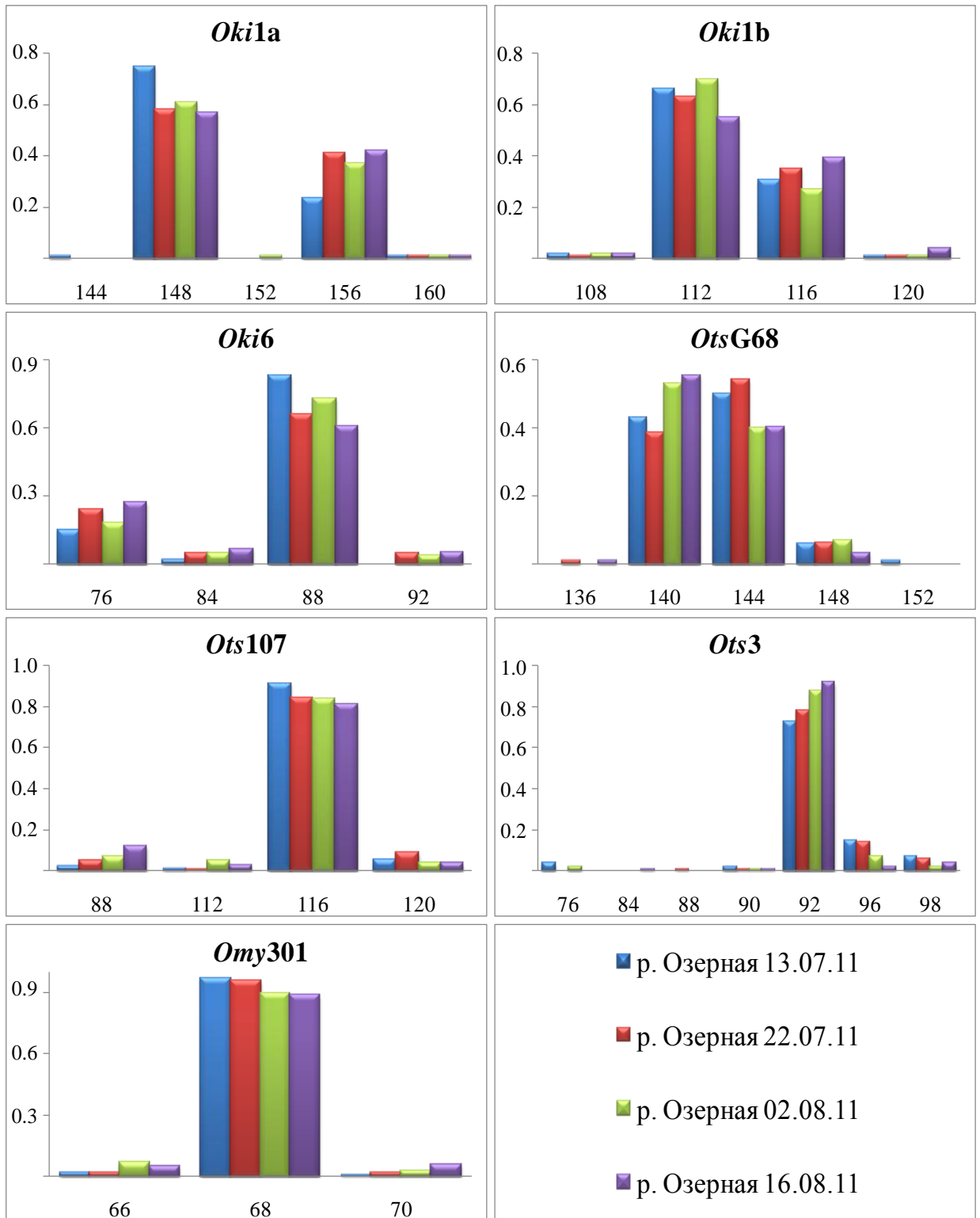


Рисунок 4.5. Распределение частот семи микросателлитных локусов в выборках нерки р. Озерная различных периодов нерестового хода (по оси абсцисс — размер выявленных аллелей (п. н.), по оси ординат — частота встречаемости аллелей).

4.3. Гетерогенность нерестового хода нерки р. Озерная

Представление полученных результатов анализа дифференциации четырех, различающихся по времени хода, выборок в виде NJ-дендрограммы, построенной по стандартным генетическим расстояниям Нея, отражает генетические различия между неркой раннего и позднего хода (рис. 4.6). В наибольшей степени отличной от других является выборка наиболее ранней даты сбора.

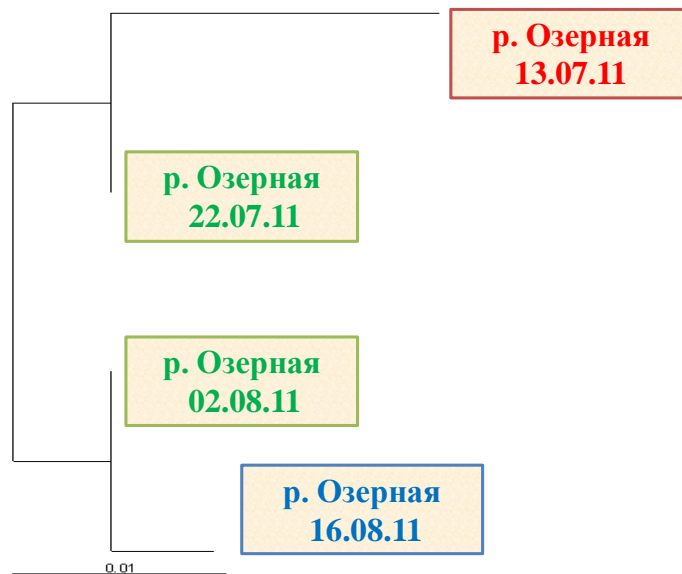


Рисунок 4.6. NJ-дендрограмма, построенная по стандартным генетическим расстояниям Нея на основе аллельной изменчивости семи микросателлитных локусов.

Статистические оценки попарных различий представлены в таблице 4.8 и соответствуют ранее представленным результатам — наиболее ранняя выборка от 13.07 достоверно отличается от всех остальных. Между тремя другими выборками уровень различий не достигает статистической значимости.

Для подтверждения полученных результатов, был проведен кластерный анализ выборок различных периодов нерестового хода р. Озерная и

исследованных ранее выборок производителей, собранных непосредственно на нерестилищах оз. Курильское. Используются опубликованные данные по частотам общих для обоих исследований локусов *Ots3*, *Ok1a*, *Ok1b*, *Ok1c* и *Ots107* (Варнавская, 2006).

Таблица 4.8. Оценки уровня попарной генетической дифференциации между выборками нерки: F_{st} — над диагональю (* — различия статистически незначимы, $P > 0.05$), дистанции Нея — под диагональю

№ выборки	Выборка	1	2	3	4
1	р. Озерная, 13.07		0.009	0.012	0.037
2	р. Озерная, 22.07	0.012		0.006*	0.008*
3	р. Озерная, 02.08	0.015	0.010		0.004*
4	р. Озерная, 16.08	0.039	0.013	0.090	

В результате кластерного анализа с использованием хордовых генетических дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967) методом COMPLET (полной связи) было получено графическое отображение генетической дифференциации исследованных выборок (рис. 4.7). На представленной дендрограмме можно отметить две достаточно обособленные ветви, одну из которых образовали выборки, приуроченные к речным и литоральным нерестилищам оз. Курильское и относящиеся к раннему периоду нереста. Генетически близкой к данной группе выборок оказалась нерка начала нерестового хода из р. Озерная (13.07.2011 г.). Важно отметить, что указанная выборка характеризуется дефицитом гетерозигот ($f < 0$, табл. 4.6) по трем из пяти использованных в анализе локусов (*Ots3*, *Ok1a*, *Ok1b*), что может указывать на эффект Валунда (Алтухов, 1983; Хедрик, 2003) и, соответственно, генетическую неоднородность составивших ее особей. С учетом сложной популяционной структуры нерки бассейна оз. Курильское, в пределах которой имеет место подразделенность на субпопуляционном уровне, а также результатов кластеризации, можно с большой долей вероятности предположить, что смешанная «ранняя» выборка из устья р. Озерная состоит из

особей, возвращающихся к местам нереста в реки Выченкия, Гаврюшка, Этамынк.

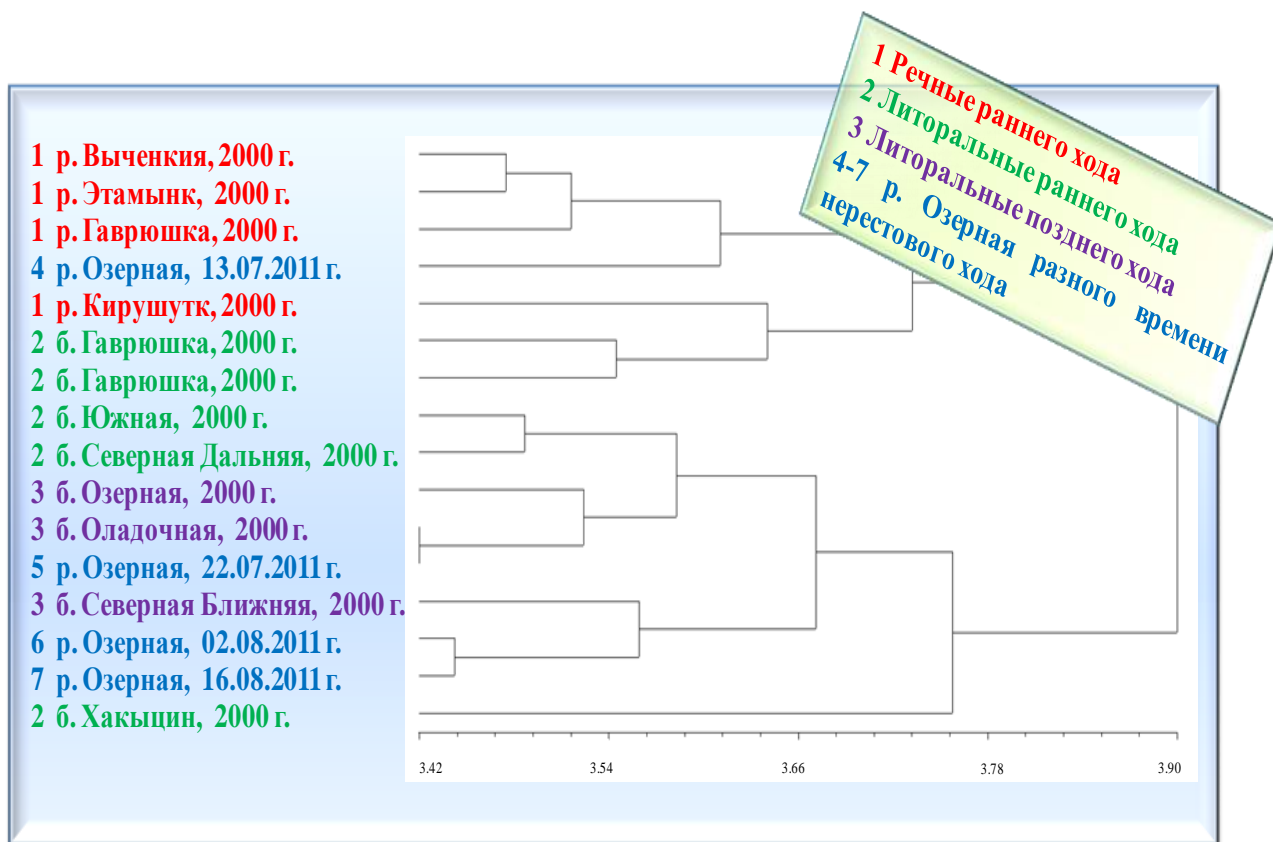


Рисунок 4.7. COMPLET-дендрограмма, построенная по матрицам хордовых генетических дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса, вычисленных на основе аллельной изменчивости пяти микросателлитных локусов в выборках нерки речной и литоральной форм различных периодов нереста в бассейне оз. Курильское.

Выборки литоральной формы нерки оз. Курильское, характеризующейся относительно поздними сроками нереста, образовали другой кластер, в состав которого также вошли три выборки из уловов закидных неводов в р. Озерная, отобранные в период с 22 июля по 16 августа (рис. 4.7).

Наиболее поздняя выборка из устья р. Озерная характеризуется дефицитом гетерозигот по четырем из пяти локусов, свидетельствующим о генетической неоднородности и, соответственно, позволяющим предположить в ее составе особей с различных литоральных нерестилищ.

Таким образом, на основании представленных данных подтверждена генетическая гетерогенность нерестового хода нерки в р. Озерная. Особей, анадромная миграция которых начинается до середины июля, вероятно, можно охарактеризовать как раннюю речную форму. Полученные результаты определяют необходимость продолжения и расширения исследований в данном направлении с целью получения точных идентификационных оценок уловов в р. Озерная и пропорционального распределения промысловой нагрузки на субпопуляции нерки бассейна оз. Курильское, т.е. рациональной эксплуатации данного запаса с учетом популяционной структуры и сохранения природного биоразнообразия.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ТЕМПОРАЛЬНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

В связи с большой протяженностью, как азиатской, так и североамериканской частей ареала нерки, труднодоступностью нерестовых водоемов и трудоемкостью отбора проб, сбор материала, как правило, осуществляется в течение ряда лет. Кроме того, одной из задач популяционно-генетических исследований промысловых видов рыб является создание и постоянное расширение реперных баз данных, которые в течение длительного периода можно было бы использовать не обновляя, а лишь пополняя выборками из неисследованных ранее регионов воспроизводства. Вышесказанное определило необходимость оценки, насколько аллельные частоты микросателлитных локусов устойчивы во времени и можно ли пренебречь величиной межгодовой изменчивости при проведении популяционных исследований.

Результаты совместного анализа выборок из нерестовых водоемов Восточной Камчатки (2003 и 2009–2011 гг.) и из р. Озерная (2010 и 2011 гг.) методом многомерного шкалирования на основе хордовых генетических дистанций по восьми микросателлитным локусам — *Ots107*, *Oki1a*, *Oki1b*, *One104*, *One109*, *OtsG68*, *OtsG85*, *Oki6*, а также вариант анализа на основе четырех локусов — *Ots107*, *Oki1a*, *Oki1b* и *Oki6*, позволяющий включить в состав анализируемых локальностей выборки с нерестилищ оз. Курильское 1989 и 2000 гг. сбора (опубликованные Н.В. Варнавской (2006) частоты, общие в обоих исследованиях), представлены на рисунке 5.1. Независимо от величины временного интервала между выборками, в первом и во втором вариантах многомерного шкалирования выборки из бассейна оз. Курильское образовали компактные, достаточно обособленные группы, что свидетельствует о меньшей межгодовой генетической изменчивости, чем межпопуляционной и, тем более, межрегиональной. Объяснением того, что при использовании в анализе данных по частотам аллелей четырех локусов, в состав группы выборок бассейна

оз. Курильское вошли выборки из рек Карагинского залива, является отсутствие в анализе локусов, дифференцирующих данный регион. Кроме того, необходимо отметить, что кластеризация восточнокамчатских выборок также соответствует генетическому сходству особей из относительно близко расположенных нерестовых водоемов, несмотря, например, на семилетний период сбора материала из бассейна р. Камчатка.

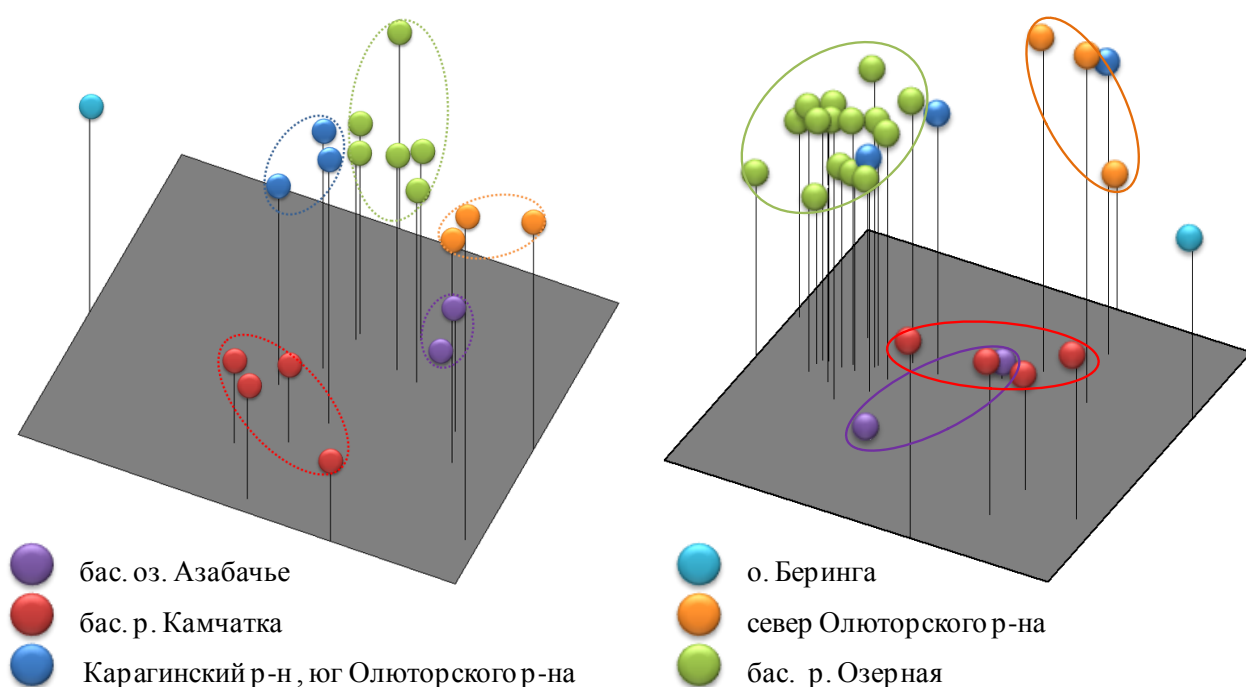


Рисунок 5.1. Результаты многомерного шкалирования выборок из популяций нерки Камчатки (трехмерные диаграммы построены с использованием хордовых генетических дистанций на основе аллельной изменчивости восьми микросателлитных локусов в выборках из восточнокамчатских популяций и из р. Озерная (2010 и 2011 гг.) — слева, и на основе аллельной изменчивости четырех микросателлитных локусов в выборках из восточнокамчатских популяций и из р. Озерная (1989, 2000, 2010 и 2011 гг.) — справа).

Для количественной оценки величины генетических различий между неркой смежных лет воспроизводства выборки из р. Озерная (табл. 2.1) проанализировали, объединив их в две группы — 2010 и 2011 гг. Для

исследования использовали частоты восьми микросателлитных локусов (*Ots107*, *Oki1a*, *Oki1b*, *One104*, *One109*, *OtsG68*, *OtsG85*, *Oki6*). В результате иерархического анализа молекулярной вариации (AMOVA) общую молекулярную дисперсию разложили на три иерархических уровня (табл. 5.1). В соответствии с полученными результатами, различия между группами выборок смежных лет отсутствуют.

Таблица 5.1. Результаты иерархического анализа генетических различий выборок 2010 и 2011 гг.

Уровень разнообразия	d.f.	Абсолютные оценки	Процент дисперсии
Между выборками	4	0.01677	0.88%
Между смежными годами	1	-0.00042	-0.02%
Внутри выборок	594	1.89508	99.14%
Общее	599	1.91144	100%

Для оценки стабильности и воспроизводимости результатов, получаемых на основе изменчивости микросателлитных локусов, по ранее опубликованным аллельным частотам четырнадцати микросателлитов (Варнавская, 2006) были оценены различия выборок нерки, собранных с интервалом в 11 лет на каждом из двух типов нерестилищ бассейне оз. Курильское — бух. Оладочная (литоральная форма) и р. Кирушутк (речная форма) (табл. 5.2).

По результатам G-теста, между выборками 1989 и 2000 гг., отобранными на нерестилище в бух. Оладочная, статистически подтвержденных различий по четырнадцати микросателлитным локусам не выявлено. Отсутствие различий имеет место и для выборок из р. Кирушутк по всем локусам, за исключением наиболее полиморфного *Oki10*, для оценки временной устойчивости частот аллелей которого требуется значительное увеличение объема выборок. Показано наличие 69-ти аллельных вариантов данного локуса в бассейне оз. Курильское (Варнавская, 2006).

На рисунке 5.2 представлена COMPLETE-дендрограмма, построенная на основе хордовых генетических дистанций, определенных по частотам 14-ти

микросателлитных локусов в выборках с различных типов нерестилищ и собранных в 1989 и 2000 гг. Кластеризации выборок в зависимости от года сбора не прослеживается. Относительно обособленную группу образуют речные выборки раннего периода нерестового хода 1989 и 2000 гг.

Таблица 5.2. Оценка темпоральной стабильности аллельных частот микросателлитных локусов в выборках нерки 1989 и 2000 гг. с нерестилищ в бух. Оладочная (литоральная форма) и р. Кирушутк (речная форма) (использован G-тест)

Локус	бух. Оладочная	<i>df</i>	р. Кирушутк	<i>df</i>
<i>Oki1a</i>	0.07	1	1.14	1
<i>Oki16</i>	3.20	4	5.39	3
<i>Oki6</i>	0.89	2	2.89	2
<i>Oki10</i>	8.28	9	29.58*	12
<i>Oki1b</i>	0.19	1	1.58	1
<i>Oki29</i>	3.89	5	8.98	6
<i>Omy77</i>	0.17	2	1.37	2
<i>One8</i>	1.97	4	3.58	4
<i>Ots2</i>	5.53	4	7.84	4
<i>Ots100</i>	6.31	6	13.51	8
<i>Ots103</i>	10.94	11	3.35	10
<i>Ots107</i>	0.76	2	3.35	2
<i>Ots3</i>	4.80	3	0.48	3
<i>Ots108</i>	18.31	8	17.2	11

Примечание. * — $P < 0.05$, *df* — число степеней свободы.

Полученные результаты позволили заключить, что данные по частотам аллелей микросателлитных локусов, являющихся темпорально стабильными маркерами популяционной структуры, могут служить эффективным инструментом долговременного мониторинга популяционных генофондов, а так же использоваться для создания устойчивых во времени реперных баз данных с целью получения идентификационных оценок при решении практических задач рыбопромысловой науки.

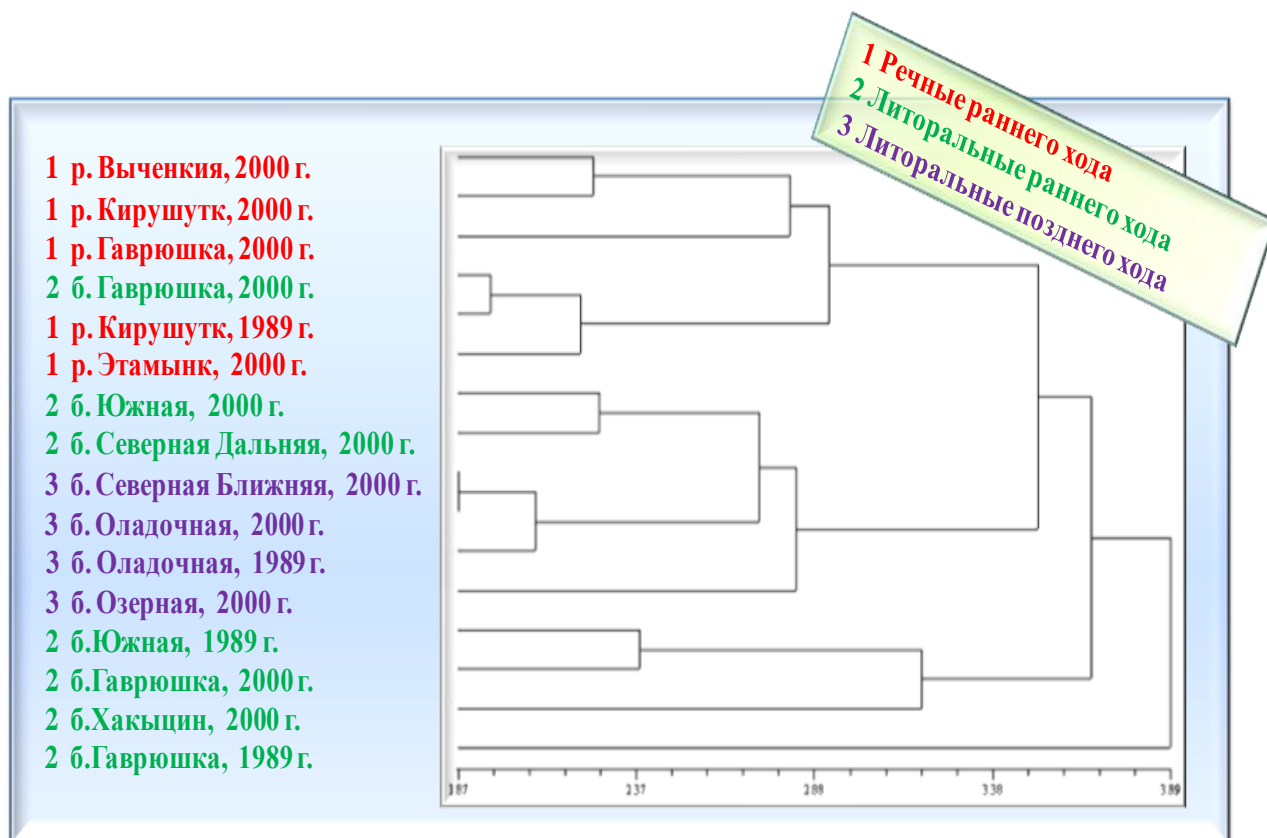


Рисунок 5.2. COMPLET-дендрограмма, построенная по матрицам хордовых генетических дистанций, вычисленных на основе аллельной изменчивости 14-ти микросателлитных локусов в выборках 1989 и 2000 гг.

ГЛАВА 6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОРСКИХ СМЕШАННЫХ ВЫБОРОК НЕРКИ НА ОСНОВЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ АЛЛЕЛЬНЫХ ЧАТОТ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

Для идентификации нерки в смешанных уловах применяют различные методы — мечение, анализ структуры чешуи и морфологических признаков, выявление паразитов, специфичных для определенных районов, а так же генетические. Генетические маркеры удобны тем, что устойчивы во времени, доказана их наследуемость, при соблюдении стандартной процедуры исследования обеспечивается объективность и повторяемость результатов (Алтухов, 1983; Варнавская, 2006).

6.1. Оценка разрешающей способности реперных данных

Подтверждением достаточно высокой дискриминирующей способности использованных маркеров популяционно-генетической изменчивости нерки восточного побережья Камчатки являются результаты симуляционного анализа выборок по нулевому сценарию (табл. 6.1 и 6.2), выполненного по частотам восьми микросателлитных локусов (см. табл. 3.1), в результате которого получены вероятностные оценки определения популяционной и региональной принадлежности смешанных выборок. Точность популяционной идентификации нерки исследованных локальностей находится в пределах 67.9–82.1%, причем прослеживается обратная зависимость между величиной данных оценок и уровнем генетического разнообразия (табл. 6.1, рис. 3.10). Наибольшая погрешность ($\approx 32\%$) вероятна при идентификации особей р. Камчатка, имеющих относительно высокий показатель разнообразия, тогда как с точностью 82.1% можно определить наиболее однородную популяцию р. Апука.

При оценке состава симулированных выборок на уровне популяционных групп выявлено, что точность идентификации в данном случае повышается до

Таблица 6.2. Оценка регионального состава (в %) симулированных смешанных выборок нерки Восточной Камчатки по восьми микросателлитным локусам (в скобках указано стандартное отклонение)

I вариант анализа						
№	Популяционная группа	1	2			
1	Северо-восток п-ова Камчатка	91.8 _(2.6)	6.9			
2	Бассейн р. Камчатка	6.5	89.7 _(2.8)			
	Неизвестные	1.7	3.4			
	Σ	100	100			
II вариант анализа						
№	Популяционная группа	1	2	3	4	5
1	Оз. Азабачье	87.2 _(4.6)	2.6	1.5	2.7	3.6
2	Бассейн р. Камчатка	5.3	88.4 _(3.3)	4.5	2.9	4.1
3	Карагинский р-н, юг Олюторского р-на	2.1	3.6	87.0 _(4.0)	5.8	7.1
4	север Олюторского р-на	2.7	1.9	4.7	86.9 _(3.9)	0.9
5	Командорские о-ва	0.5	0.6	1.4	0.2	80.9 _(5.8)
	Неизвестные	2.2	2.9	0.9	1.5	3.4
	Σ	100	100	100	100	100

91.8% для северо-восточных популяций, и до 89.7% для нерки бассейна р. Камчатка (табл. 6.2, I вариант анализа). При отдельном анализе пяти групп популяций восточного побережья Камчатки (см. глава 3) точность их идентификации снижается по сравнению с объединенным вариантом расчетов (табл. 6.2, II вариант анализа), хотя и остается на достаточно высоком уровне. Таким образом, полученные оценки вероятности идентификации восточно-камчатской нерки в смешанных скоплениях достаточно высоки на уровне групп популяций.

Симуляционный анализ, проведенный с использованием опубликованных данных по частотам пяти микросателлитных локусов в 12-ти выборках нерки, собранных в 2000 г. с основных нерестилищ оз. Курильское (Варнавская, 2006), подтвердил возможность идентификации различных сезонно-экологических форм с достаточной степенью точности (табл. 6.3). Результаты анализа дифференциации нерки, представленные в главе 4, позволили выделить

следующие группы выборок: речные раннего хода, литоральные раннего хода и литоральные позднего хода. Точность идентификации данных групп превысила во всех случаях 72%, несмотря на то, что они входят в состав единой популяционной системы оз. Курильское (табл. 6.3, I вариант анализа). С еще большей вероятностью можно определять в смешанных выборках долю особей различных сезонных форм. Точность идентификации в данном варианте анализа превышает 83% для ранней нерки и 84% — для поздней (табл. 6.3, II вариант анализа).

Таблица 6.3. Оценка состава (в %) симулированных смешанных выборок различных сезонно-экологических форм нерки оз. Курильское по пяти микросателлитным локусам (в скобках указано стандартное отклонение)

I вариант анализа				
№	Сезонно-экологические формы	1	2	3
1	Речные раннего хода	72.9 _(9.2)	17.2	10.3
2	Литоральные раннего хода	15.2	72.4 _(9.7)	16.3
3	Литоральные позднего хода	11.4	9.9	73.1 _(9.2)
	Неизвестные	0.5	0.5	0.3
	Σ	100	100	100
II вариант анализа				
№	Сезонные формы	1	2	
1	Раннего хода	83.4 _(7.1)	15.0	
2	Позднего хода	16.1	84.6 _(8.0)	
3	Неизвестные	0.5	0.4	
	Σ	100	100	

6.2. Апробация базы реперных данных

Апробацию базы реперных данных, созданной на основе частот аллельных вариантов микросателлитных локусов, выявленных в исследованных локальностях, проводили на примере четырех выборок производителей различных периодов нерестового хода из р. Озерная и четырех выборок молодежи из траловых уловов НИС «Профессор Кагановский». Результаты

идентификации состава смешанных выборок представлены в таблицах 6.4 и 6.5, а так же на рисунках 6.1 и 6.2.

Выборка производителей нерки из р. Озерная от 13.07 генетически наиболее близка к особям из группы реперных выборок, которые были охарактеризованы как «ранняя» форма; выборка р. Озерная от 16.08 почти на 100% состоит из особей «поздней» формы; выборки от 22.07 и 02.08 имеют смешанный состав (табл. 6.4, рис. 6.1). В целом, можно отметить, что при оценке состава выборок из уловов в устье р. Озерная, начиная со второй половины июля, прослеживается четкая тенденция замещения особей «ранней» формы представителями «поздней».

Таблица 6.4. Соотношение (в %) производителей «ранней» и «поздней» форм нерки в смешанных выборках из уловов закидных неводов в нижнем течении р. Озерная (в скобках указано стандартное отклонение)

Выборка	Доля «ранней» формы	Доля «поздней» формы
р. Озерная, 13.07.2011	84.86 _(15.5)	15.14 _(15.1)
р. Озерная, 22.07.2011	59.15 _(21.9)	40.85 _(21.9)
р. Озерная, 02.08.2011	40.44 _(24.1)	59.56 _(24.1)
р. Озерная, 16.08.2011	00.37 _(0.1)	99.63 _(0.1)

Оценка регионального состав четырех выборок неполовозрелой нерки из морских смешанных уловов траловых съемок молодежи позволила получить следующие результаты (табл. 6.5, рис. 6.2):

— выборка от 15.10.2010 г. преимущественно включает особей из бассейна р. Камчатка, в том числе из оз. Азабачье, — около 45%, и особей севера Олюторского р-на — 22%. Данная выборка характеризуется наибольшим количеством особей с неопределенной региональной принадлежностью — 21%, и наименьшим количеством проанализированных экземпляров — 28.

— в выборке от 16.10.2010 г. также доминируют особи из бассейна р. Камчатка, в том числе из оз. Азабачье, — 65%, на втором по величине месте находится

доля особей из популяционной группы «Карагинский р-н, юг Олюторского р-на».

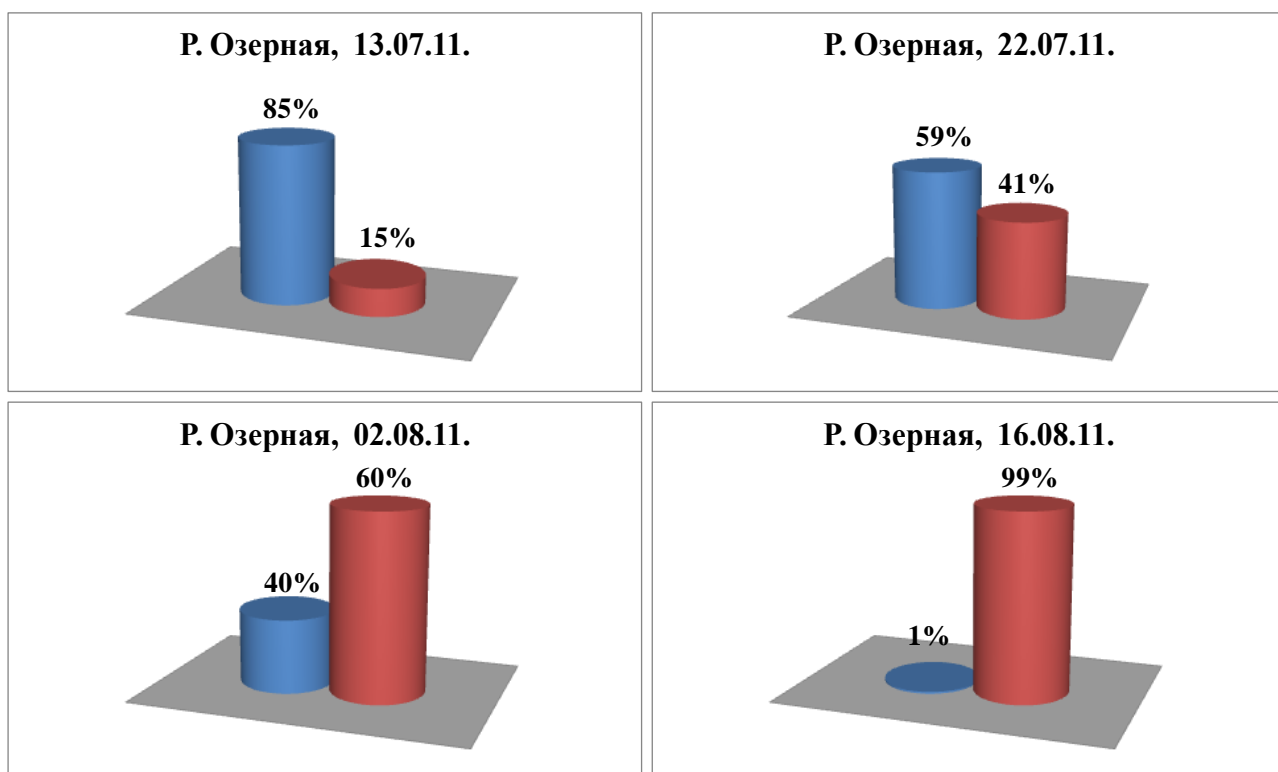


Рисунок 6.1. Состав (в %) выборок нерки различных периодов нерестового хода в р. Озерная. Синим цветом обозначена «ранняя» нерка, красным — «поздняя».

Таблица 6.5. Оценка регионального состава (в %) смешанных выборок молоди нерки из траловых уловов НИС «Профессор Кагановский» (в скобках указано стандартное отклонение)

№	Регион	Выборки				все экз.
		15.10.10	16.10.10	20.10.10	22.10.10	
1	бассейн р. Камчатка	30.63 _(12.2)	52.95 _(11.7)	21.68 _(8.7)	28.72 _(7.8)	32.86 _(4.8)
2	оз. Азабачье	13.39 _(7.9)	12.88 _(9.2)	9.25 _(5.2)	10.10 _(8.4)	13.74 _(4.1)
3	Карагинский р-н, юг Олюторского р-на	12.31 _(6.5)	21.69 _(12.1)	42.03 _(9.8)	31.07 _(10.0)	25.74 _(5.4)
4	север Олюторского р-на	22.24 _(12.4)	3.66 _(9.6)	13.09 _(5.5)	15.53 _(6.5)	13.28 _(4.2)
	Неизвестные	21.43	8.82	13.95	14.58	14.38
	Σ	100	100	100	100	100

Данная выборка характеризуется наименьшим числом особей с неопределенной региональной принадлежностью (менее 9%) и наименьшим числом особей, принадлежащих к группе популяций северной части Олюторского р-на — 4%.

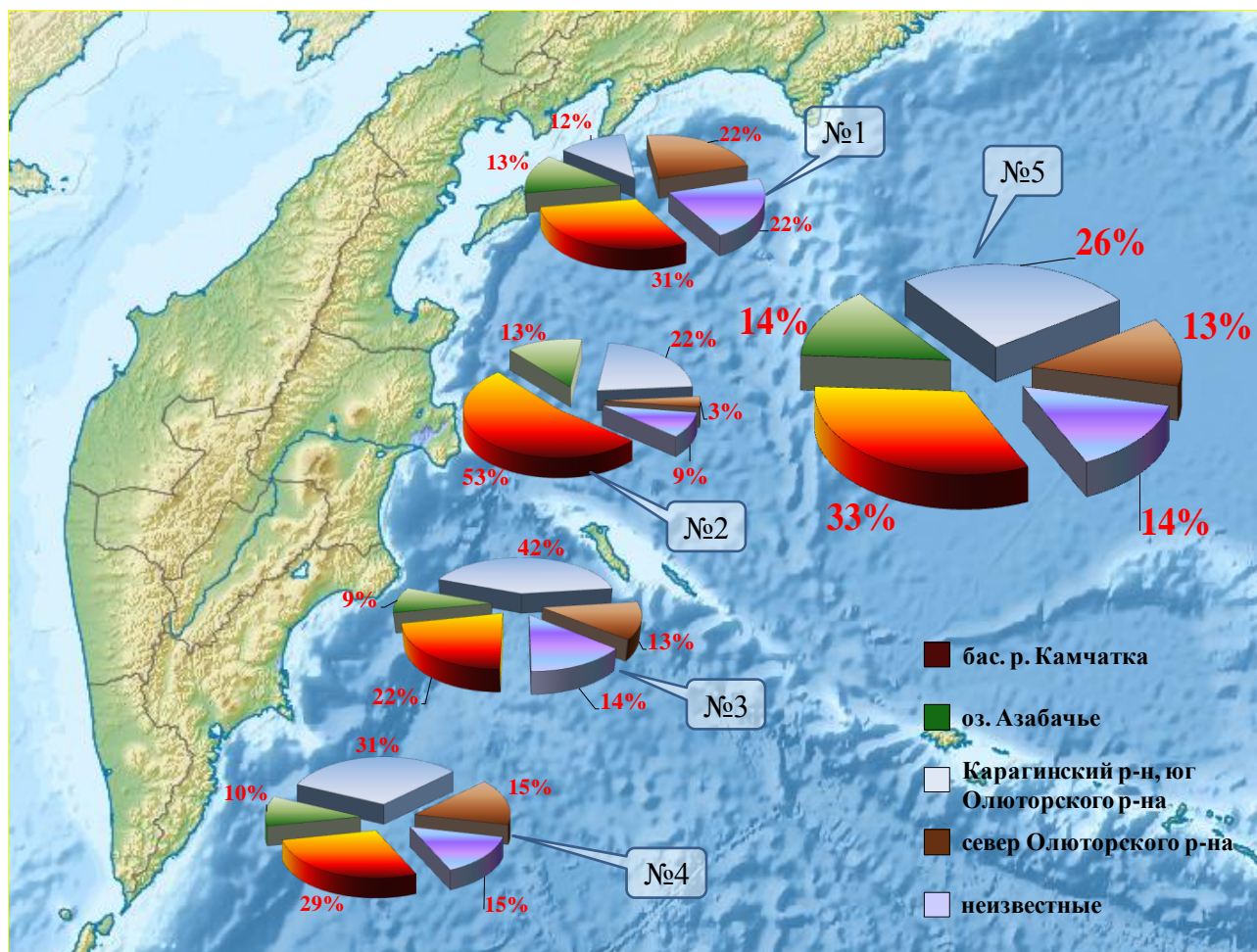


Рисунок 6.2. Региональный состав (в %) смешанных выборок нерки из траловых уловов НИС «Профессор Кагановский». № 1 — выборка от 15.10.10 г., № 2 — 16.10.10 г., № 3 — 20.10.10, № 4 — 22.10.10. № 5 — все проанализированные особи.

— выборка от 20.10.2010 г. представлена преимущественно особями, относящимися к популяционной группе «Карагинский р-н, юг Олюторского р-на» — 42%, в наименьшей степени представлены особи из бассейна оз. Азабачье — 9%.

— выборка от 22.10.2010 включает наибольшие доли особей из бассейна р. Камчатка, в том числе из оз. Азабачье, и из популяционной группы

«Карагинский р-н, юг Олюторского р-на», составившие, соответственно, 38 и 31%.

Хотя количество экземпляров в идентифицируемых выборках, к сожалению, недостаточно, чтобы делать точные выводы, тем не менее, в целом можно отметить, что в октябре 2010 г. в исследуемом районе неполовозрелая нерка была представлена в следующем соотношении: особи из бассейна р. Камчатка (включая оз. Азабачье) составили около половины от общего числа, особи популяционной группы «Карагинский р-н, юг Олюторского р-на» — около четверти, а особи самых северных из исследованных локальностей (Олюторский залив) — немногим более 10%. Относительно большим оказалось число особей с неопределенной региональной принадлежностью — 14%, что указывает на необходимость продолжения исследований в направлении расширения реперной базы данных и набора информативных популяционных маркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании были апробированы тридцать шесть микросателлитных локусов, из них для анализа нерки Камчатки отобрано девятнадцать, использование которых в исследовании популяций данного региона представляется перспективным.

Тринадцать выборок восточного побережья анализировали по восьми наиболее дифференцирующим локусам (*Ots107*, *Oki1a*, *Oki1b*, *One104*, *One109*, *OtsG68*, *OtsG85*, *Oki6*). В результате анализа установлено, что генетическое разнообразие нерки из северной части исследуемого региона — Карагинского и Олюторского заливов, оказалось ниже, чем в бассейне р. Камчатка. Исследованные популяции характеризуются меньшим числом аллельных вариантов и более низкими оценками гетерозиготности. Показано соответствие степени генетического сходства всех исследованных популяций их географической близости, выявлено наличие достоверной связи между географическими расстояниями и величиной генетических различий. С увеличением географических расстояний между нерестовыми водоемами возрастают генетические различия между локальными популяциями — показатели генетических дистанций N_{ey} и коэффициенты F_{st} . Графическое представление полученных результатов наглядно показывает, что присоединение к «ближайшему соседу» происходит строго последовательно вдоль восточного побережья п-ова Камчатка от наиболее северных популяций — лагуны Северная и Анана, к относительно южным, расположенным в бассейне р. Камчатка. Командорская популяция генетически наиболее близка к рекам Карагинского залива — Хайлюля и Ивашка. На основании выявленной популяционно-генетической дифференциации нерки восточного побережья Камчатки выделены пять региональных групп, уровень различия между которыми превышает уровень межпопуляционной изменчивости в их пределах. Оценка вероятности идентификации выделенных групп достаточно высока и составляет 82–89%, что значительно превышает точность идентификации

отдельных популяций. Возможность идентификации выделенных популяционных групп восточного побережья Камчатки в смешанных выборках молоди нерки по микросателлитным локусам продемонстрирована на примере анализа четырех выборок из траловых уловов в западной части Берингова моря. Следует отметить, что значительное количество неопределенных особей указывает на необходимость продолжения исследований с обязательным расширением реперной базы данных и набора информативных локусов.

На основании анализа частот микросателлитных локусов подтверждена генетическая гетерогенность нерестового хода нерки в р. Озерная. Особей, анадромная миграция которых проходит до середины июля, на основании полученных результатов, можно охарактеризовать как раннюю речную форму. Пропорциональное распределение промысловой нагрузки на стадо нерки бассейна оз. Курильское, с учетом выявленной популяционной структуры, позволит более рационально эксплуатировать данный природный запас и сохранить его естественное биоразнообразие.

Микросателлитная ДНК является эффективным молекулярным маркером для дифференциации и последующей идентификации нерестовых популяций нерки. Полученная оценка темпоральной стабильности микросателлитов в течение более чем десятилетнего периода позволяет использовать единожды созданные базы данных для определения популяционной принадлежности особей в смешанных скоплениях в период нагульных и нерестовых миграций.

ВЫВОДЫ

1. Определен набор из девятнадцати наиболее информативных для популяционно-генетических исследований нерки Камчатки микросателлитных локусов.

2. Выявлена значительная дифференциация нерки восточного побережья Камчатки по частотам аллелей микросателлитных локусов, генетическое сходство исследованных популяций соответствует их географической близости, имеет место достоверная связь между географическими расстояниями и величинами популяционно-генетических различий.

3. Оценка гетерогенности нерки оз. Курильское на основе аллельной изменчивости микросателлитных локусов подтвердила генетическое своеобразие различных сезонно-экологических форм; в течение нерестового хода нерки в р. Озерная, начиная со второй половины июля, прослеживается четкая тенденция замещения особей «ранней» формы представителями «поздней».

4. Микросателлитная ДНК является эффективным, темпорально стабильным маркером популяционной изменчивости, что позволяет длительное время использовать единожды созданные базы реперных данных при осуществлении идентификационных оценок.

5. Разрешающая способность базы реперных данных для идентификации популяционных групп восточного побережья Камчатки в смешанных выборках находится на уровне 82–89%, для определения сезонно-экологических форм нерки в бассейне р. Озерная — на уровне 72%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П.** Генетические процессы в популяциях. М.: Наука. 1983. 279 с.
- Алтухов Ю.П.** Популяционная генетика рыб. М.: Пищ. пром. 1974. 245 с.
- Алтухов Ю.П., Варнавская Н.В.** Адаптивная генетическая структура и ее связь с внутривидовой дифференциацией по полу, возрасту и скорости роста у тихоокеанского лосося — нерки // Генетика. 1983. Т. 19. № 5. С. 796–806.
- Алтухов Ю.П., Новосельская А.Ю., Салменкова Е.А., Рябова Г.Д., Гончарова А.А., Коновалов С.М., Ильин В.Е., Шевляков А.Г., Новосельский Ю.И.** Факторы дифференциации и интеграции генетической структуры системы субпопуляций нерки в озере Азабачьем (Камчатка) // Журн. общ. биологии. 1983. Т. 44. № 3. С. 316–331.
- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А.** Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. 2002. Т. 38. № 9. С. 1173–1195.
- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л., Политов Д.В., Евсюков А.Н., Жукова О.В., Захаров И.А., Моисеева И.Г., Столповский Ю.А., Пухальский В.А., Поморцев А.А., Упелниек В.П., Калабушкин Б.А.** Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М.: Наука. 2004. 620 с.
- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т.** Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука. 1997. 288 с.
- Аронштам Л.А., Боркин Л.Я., Пудовкин А.И.** Изоферменты в популяционной и эволюционной генетике / Генетика изоферментов. М.: Наука. 1977. С. 199–249.
- Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Малинина Т.В., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Животовский Л.А.** Микросателлитная изменчивость и дифференциация популяций кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum),

воспроизводимых сахалинскими рыбоводными заводами // Генетика. 2006. Т. 42. № 12. С. 1694–1702.

Бирман И.Б. Лососи в морском периоде жизни / В кн: «Биология Тихого океана. Рыбы открытых вод». М.: Наука. 1967. С. 67–87.

Бирман И.Б. Морской период жизни и вопросы динамики стада тихоокеанских лососей. М.: Агропромиздат. 1985. 208 с.

Брыков Вл.А., Полякова Н.Е., Подлесных А.В. Дивергенция митохондриальной ДНК в популяциях нерки (*Oncorhynchus nerka* Walbaum) озера Азабачьего (Камчатка) // Генетика. 2003. Т. 39. № 12. С. 1687–1692.

Брыков Вл.А., Полякова Н.Е., Подлесных А.В., Голубь Е.В., Голубь А.П., Жданова О.Л. Влияние биотопов размножения на генетическую дифференциацию популяций нерки (*Oncorhynchus nerka*) // Генетика. 2005. Т. 41. № 5. С. 635–645.

Бугаев В.Ф. К вопросу о дифференциации субизолятов красной в бассейне Курильского озера // В кн. Исследования по биологии рыб и промысловой океанографии. Владивосток. 1976. Вып. 7. С. 88–101.

Бугаев В.Ф. Азиатская нерка (пресноводный период жизни, структура локальных стад, динамика численности). М.: Колос. 1995. 464 с.

Бугаев В.Ф. Нерка реки Камчатки (биология, численность, промысел). Петропавловск-Камчатский: Изд-во «Камчатпресс». 2010. 232 с.

Бугаев В.Ф. Азиатская нерка-2 (биологическая структура и динамика численности локальных стад в конце XX – начале XXI вв.). Петропавловск-Камчатский: Изд-во «Камчатпресс». 2011. 380 с.

Бугаев В.Ф., Карпенко В.И. Некоторые данные о скате и питании сеголетков нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) (Salmonidae) в устье р. Камчатки // Вопр. ихтиол. 1983. Т. 23. Вып. 6. С. 1031–1034.

Варнавская Н.В. Распределение частот генов лактатдегидрогеназы и фосфоглюкомутаза в популяциях нерки Камчатки с речными,

ключевыми и озерными нерестилищами / Тез. докл. X Всесоюз. симп. «Биологич. проблемы Севера». Магадан: ИБПС. 1983. С. 150–151.

Варнавская Н.В. Адаптивная генетическая структура и ее связь с внутривидовой дифференциацией по полу, возрасту и скорости роста у тихоокеанского лосося — нерки / Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова АН СССР. 1984а. 24 с.

Варнавская Н.В. Распределение частот генов лактатдегидрогеназы и фосфоглюкомутаза в популяциях камчатской нерки, предпочитающих различные типы нерестилищ // Генетика. 1984б. Т. 20. № 1. С. 100–107.

Варнавская Н.В. Уровень гетерозиготности по локусу фосфоглюкомутаза и его связь со скоростью роста у молоди нерки оз. Курильского на разных этапах жизненного цикла / Тез. докл. III Всесоюз. совещ. по генетике, селекции и гибридизации рыб. Тарту. 1986. М.: ЦНИИТЭИРХ. С. 27–29.

Варнавская Н.В. Пространственная и темпоральная генетическая структура в популяционной системе нерки оз. Курильского (Камчатка) / Тез. III Всесоюз. совещ. по лососевидным рыбам. Тольятти: ИЭВБ. 1988а. С. 49–51.

Варнавская Н.В. Генетические закономерности возрастной дифференциации у нерки оз. Курильского / Тез. Докл. III Всесоюз. совещ. по лососевидным рыбам. Тольятти: ИЭВБ. 1988б. С. 48–49.

Варнавская Н.В. Принципы генетической идентификации популяций тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* в связи с задачами рационального промысла / Автореф. дис. ... доктора биол. наук. М.: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. 2001. 48 с.

Варнавская Н.В. Геногеография по аллозимным локусам у тихоокеанских лососей / В кн: «Популяционная биология, генетика и систематика гидробионтов». Сб. науч. трудов КамчатНИРО. Т. 1. Петропавловск-Камчатский: Изд-во КамчатНИРО. 2005. С. 28–62.

- Варнавская Н.В.** Генетическая дифференциация популяций тихоокеанских лососей. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО. 2006. 488 с.
- Варнавская Н.В., Варнавский В.С.** Распределение частот генов лактатдегидрогеназы, фосфоглюкомутазы и пероксидазы в связи с пространственной гетерогенностью популяций нерки оз. Начикинского, Двуххюрточного и Ближнего (Камчатка) / Тез. Докл. X Всесоюзного Симп. «Биологич. проблемы Севера». Магадан: ИБПС. 1983. С. 148–149.
- Варнавская Н.В., Дубынин В.А.** Уровень гетерозиготности по локусу *Pgm* и его связь со скоростью роста у молоди нерки (*Oncorhynchus nerka* Walbaum) оз. Курильского на разных этапах жизненного цикла / Тез. Докл. III Всесоюз. Совещ. по генетике, селекции и гибридизации рыб. Тарту. 1986. М.: ЦНИИТЭИРХ. С. 27–29.
- Варнавская Н.В., Дубынин В. А.** Уровень гетерозиготности по локусу *Pgm* и его связь со скоростью роста у молоди нерки (*Oncorhynchus nerka* Walbaum) оз. Курильского на разных этапах жизненного цикла / В кн.: Генетические исследования морских гидробионтов. М: ВНИРО. 1987. С. 36–43.
- Варнавская Н.В., Варнавский В.С., Вецлер И.И., Непомнящий К.Ю.** Особенности пространственной генетической дифференциации популяций нерки (*Oncorhynchus nerka* Walbaum) Начикинского, Двуххюрточного, Дальнего и Ближнего озер (Камчатка) // Генетика. 1988. Т. 24. № 4. С. 723–731.
- Варнавская Н.В., Куренков С.И., Варнавский В.С.** Роль жилых форм лососевых рыб в сохранении резервного генетического фонда популяций на примере стада нерки, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), оз. Дальнее (Камчатка) / В кн.: «Популяционная биология, генетика и систематика гидробионтов». Сб. научных трудов КамчатНИРО. Т. 1. Петропавловск-Камчатский: Изд-во КамчатНИРО. 2005. С. 242–256.
- Варнавская Н.В., Варнавский В.С., Мидяная В.В., Ростомова С.А., Збоева Е.Н.** Анализ генетической изменчивости в популяциях нерки

Oncorhynchus nerka (Walbaum) Азии и Северной Америки методами многомерной статистики // Генетика. 1996. №. 7. С. 962–977.

Варнавский В.С., Варнавская Н.В. Оценка миграции между внутривидовыми группировками ранней расы нерки оз. Начикинского / Тез. докл. X Всесоюзного симп. «Биологич. проблемы Севера». Магадан: ИБПС. 1983а. С. 149–150.

Варнавский В.С., Варнавская Н.В. К вопросу о роли карликовой формы в воспроизводстве популяции нерки оз. Дальнего / Тез. докл. X Всесоюзного симп. «Биологич. проблемы Севера». Магадан: ИБПС. 1983б. С. 147–148.

Варнавский В.С., Варнавская Н.В. Оценка миграции между внутривидовыми группировками ранненерестующей расы нерки оз. Начикинского (Камчатка) // Вопр. ихтиол. 1985. Т. 25. Вып. 1. С. 157–159.

Вейр Б. Анализ генетических данных. М.: Мир. 1995. 400 с.

Глубоковский М.К. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука. 1995. 343 с.

Горшкова Г.В., Горшков С.А. Карликовая нерка (*Oncorhynchus nerka* Walbaum) в Азабачьем озере на Камчатке // Вопр. ихтиол. 1977. Т. 17. № 2. С. 220–225.

Гречко В.В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // Генетика. 2002. Т. 38. № 8. С. 1013–1033.

Гриценко О.Ф., Кловач Н.В., Зеленина Д.А., Мюге Н.С. Популяционный состав неполовозрелой нерки в западной части Берингова моря в осенний период // Изв. ТИНРО. 2007. Т. 151. С. 206–213.

Егорова Т.В. Нерестовый ход и сроки нереста *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) в бассейне р. Озерной // Вопр. ихтиол. 1977. Т. 17. Вып. 4. С. 634–641.

Егорова Т.В. Об отсутствии сезонных группировок красной бассейна реки Озерной // Изв. ТИНРО. 1970. Т. 78. С. 43–47.

Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука. 1991. 267 с.

- Животовский Л.А.** О методологии исследования популяционной организации вида по генетическим маркерам (на примере горбуши *Oncorhynchus gorbuscha*) // *Вопр. ихтиол.* 2013. Т. 53. № 3. С. 371–376.
- Зеленина Д.А., Мартинсон Я.Т., Огден Р., Волков А.А., Зеленина И.А., Карвальо Г.Р.** Современные подходы к изучению популяционного разнообразия морских рыб: новые возможности для контроля рыболовства и управления рыбными запасами // *Генетика.* 2011. Т. 47. № 12. С. 1629–1641
- Зеленина Д.А., Хрусталева А.М., Волков А.А.** Сравнительное исследование популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka*) Западной Камчатки с помощью *gard-rsr* и анализа полиморфизма микросателлитных локусов // *Генетика.* 2006. Т. 42. № 5. С. 693–704.
- Иванков В.Н.** Проходная и жилая формы нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) о. Итуруп (Курильские острова) // *Биология проходных рыб Дальнего Востока.* Владивосток: ДВГУ. 1984. С. 65–73.
- Иевлева М.Я.** Гистологическое строение гонад лососей в период морских миграций / В кн.: *Лососевое хозяйство Дальнего Востока.* М.: Наука. 1964. С. 127–141.
- Карпенко В.И.** Ранний морской период жизни тихоокеанских лососей. М.: ВНИРО. 1998. 165 с.
- Кирпичников В.С.** Генетика и селекция рыб. Л.: Наука. 1987. 520 с.
- Кирпичников В.С., Иванова И.М.** Изменчивость частот аллелей локусов лактатдегидрогеназы и фосфоглюкомутазы в локальных популяциях, различных возрастных группах и последовательных поколениях нерки (*Oncorhynchus nerka* Walb.) // *Генетика.* 1977. Т. 13. № 7. С. 1183–1193.
- Кирпичников В.С., Муске Г.А.** Популяционная генетика камчатской нерки (*Oncorhynchus nerka* (Walbaum)) / В кн.: «Генетика и размножение морских животных». Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1981. С. 59–71.

- Кляшторин Л.Б.** Тихоокеанские лососи: климат и динамика запасов // Рыб. хоз-во. 2000. № 4. С. 32–34.
- Коницев А.С., Цветков И.Л., Попов А.П., Шамшина Т.Н., Комаров А.Б.** Практикум по молекулярной биологии. М.: КолосС. 2012. 151 с.
- Коновалов С.М.** Дифференциация локальных стад нерки. Л.: Наука. 1971. 220 с.
- Коновалов С.М.** Популяционная биология тихоокеанских лососей. М.: Наука. 1980. 238 с.
- Кордичева С.Ю.** Нуль-аллели в микросателлитных локусах кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum). Автореф. дис. ... канд. биол. наук // М.: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. 2011. 24 с.
- Кордичева С.Ю., Рубцова Г.А., Шитова М.В., Шайхаев Г.О., Афанасьев К.И., Животовский Л.А.** Выявление нуль-аллелей в микросателлитном локусе кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) // Генетика. 2010. Т. 46. № 8. С. 1143–1147.
- Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И., Аронштамм А.А., Боркин Л.Я., Малецкий С.И., Полякова Е.В., Манченко Г.П.** Генетика изоферментов. М.: Наука. 1977. 237 с.
- Крогиус Ф.В.** Зависимость хода красной (нерки) по реке и ската ее молоди от суточного хода температуры воды, ее рН и растворенных в воде газов // Изв. ТИНРО. 1954. Т. 54. С. 197–230.
- Крогиус Ф.В.** О различных типах чешуи красной *Oncorhynchus nerka* (Walb.) в бассейне р. Камчатка и времени образования годового кольца // Изв. ТИНРО. 1970. Т. 74. С. 67–81.
- Крогиус Ф.В.** Роль карликовых форм в воспроизводстве проходной красной (*Oncorhynchus nerka* Walbaum) // Вопр. ихтиол. 1981. Т. 21. № 6. С. 976–984.
- Крогиус Ф.В.** Сезонные расы красной *Oncorhynchus nerka* (Walb.) и ее нерестилища в водоемах Камчатки / Биологические основы развития лососевого хозяйства в водоемах СССР. М.: Наука. 1983. С. 18–31.

- Крогиус Ф.В., Крохин Е.М.** Результаты исследования нерки (красной), состояние ее запасов и колебания численности в водах Камчатки // *Вопр. ихтиол.* 1956. Т. 7. Вып. 5. С. 3–20.
- Крохин Е.М.** Нерестилища красной *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) // *Вопр. ихтиол.* 1960. Т. 16. № 1. С. 90–110.
- Крохин Е.М., Крогиус Ф.В.** Очерк оз. Курильское и биологии красной (*Oncorhynchus nerka* Walb.) в его бассейне // *Труды Тихоокеанского комитета.* М.: Академия наук СССР. 1937. 187 с.
- Куренков С.И.** Две репродуктивно изолированные группы жилой нерки *Oncorhynchus nerka kennerlyi* (Suckley) оз. Кроноцкого // *Вопр. ихтиол.* 1977. Т. 17. Вып. 4. С. 597–606.
- Куренков С.И.** Линейный рост и возраст кокани Кроноцкого озера // *Изв. ТИНРО.* 1974. Т. 90. С. 111–118.
- Куренков С.И.** Некоторые морфологические особенности кокани Кроноцкого озера // *Изв. ТИНРО.* 1972. Т. 82. С. 125–134.
- Лакин Г.Ф.** Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 352 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.** Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 479 с.
- Мацак Е.А.** Генетическая неоднородность нерки (*Oncorhynchus nerka*) оз. Курильского во время нерестового хода / Тез. X Всесоюз. симп. Ч. 2. «Биологические проблемы Севера». Магадан. 1983а. С. 194–195.
- Мацак Е.А.** Генетическая структура популяций нерки озера Курильского (Камчатка) / Тез. Координац. совещ. по лососевидным рыбам. Морфология, структура популяций и проблемы рационального использования лососевидных рыб. Л.: Наука. 1983б. С. 129.
- Мацак Е.А.** Генетический анализ популяции нерки (*Oncorhynchus nerka*) (Walb.) озера Курильского (Камчатка) // *Генетика в аквакультуре.* Л.: Наука. 1989. С. 50–57.
- Мелекесцев И.В., Брайцева О.А., Эрлих Э.Н., Шанцер А.Е., Челебаева А.И., Лупикина Е.Г., Егорова И.А., Кожемяка Н.Н., Лучицкий И.В.**

Камчатка, Курильские и Командорские острова / В кн.: «История развития рельефа Сибири и Дальнего Востока». М.: Наука. 1974. 438 с.

Муске Г.А. Исследование генетической структуры популяции нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) // В кн.: «Биологические основы рыбоводства: генетика и селекция». Л.: Наука. 1983. С. 186–193.

Никитина Т.В., Назаренко С.А. Микросателлитные последовательности ДНК человека: мутационный процесс и эволюция // Генетика. 2004. Т. 40. № 10. С. 1301–1318.

Новосельская А.Ю., Новосельский Ю.И., Алтухов Ю.П. Физико-химические характеристики нерестилищ и наследственная гетерогенность стада нерки, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), оз. Азабачьего // Генетика. 1982. Т. 43. № 6. С. 1004–1011.

Остроумов А.Г. Результаты аэровизуального учета и аэрофотосъемки красной и ее нерестилищ в бассейне оз. Курильское // Изв. ТИНРО. 1970. Т. 78. С. 17–32.

Остроумов А.Г. Аэрометоды учета тихоокеанских лососей, классификация и нерестовое значение водоемов Камчатского полуострова и Корякского нагорья (Камчатская область) / Отчет о НИР Камчатского отделения ТИНРО. Петропавловск-Камчатский. 1975. 350 с.

Остроумов А.Г. Жилая нерка *Oncorhynchus nerka kennerlyi* (Suckley) (Walbaum) в бас. реки Воровской (Западная Камчатка) // Вопр. ихтиол. 1977. Т. 17. Вып. 5. С. 941–943.

Остроумов А.Г. Нерестовые озера Камчатки // Вопр. географии Камчатки. Петропавловск-Камчатский: Камч. отдел Географ, о-ва СССР. 1985. Т. 9. С. 47–56.

Остроумов А.Г. Результаты аэровизуального учета и аэрофотосъемки красной и ее нерестилищ в бассейне оз. Курильское // Изв. ТИНРО. 1970. Т. 78. С. 17–32.

- Пустовойт С.П.** Генетическая гетерогенность нерестового стада нерки, *Oncorhynchus nerka* (Walb.), р. Камчатка // Генетика. 1993. Т. 29. № 5. С. 808–819.
- Пустовойт С.П.** Внутрипопуляционная генетическая изменчивость и межпопуляционная дифференциация азиатской нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) // Генетика. 1994. Т. 30. С. 101–106.
- Пустовойт С.П.** Генетическая изменчивость малочисленной популяции нерки, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), р. Ола (северное побережье Охотского моря) // Генетика. 2001. Т. 37. № 12. С. 1657–1662.
- Пустовойт С.П., Макоедов А.Н.** Генетическая и фенетическая изменчивость нерки, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), р. Камчатка // Генетика. 1992. Т. 28. № 6. С. 141–149.
- Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д.** ПЦР «в реальном времени». М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2009. 223 с.
- Рычков С.Ю.** Полиморфизм митохондриальной ДНК в населении Прибайкалья эпохи неолита. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Москва. 2004. 24 с.
- Селифонова М.Ф.** Распределение красной по нерестилищам бассейна реки Озерной / Исследования по биологии рыб и промысловой океанографии. Владивосток: ТИНРО. 1978. С. 129–133.
- Сингер М., Берг П.** Гены и геномы: пер. с англ. М.: Мир. Т. 1. 1998а. 373 с.
- Сингер М., Берг П.** Гены и геномы: пер. с англ. М.: Мир. Т. 2. 1998б. 391 с.
- Синяков С.А.** Рыбная промышленность и промысел лососей в сравнении с другими отраслями экономики Дальнего Востока. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс. 2006. 64 с.
- Смирнов А.И.** Биология, размножение и развитие тихоокеанских лососей. М.: МГУ. 1975. 336 с.

- Сулимова Г.Е.** ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи соврем. биологии. 2004. Т. 124. № 3. С. 260–271.
- Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Усатов А.Д.** Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) // Экологическая генетика. 2010. Т. 8. № 1. С. 12–24.
- Хедрик Ф.** Генетика популяций. М.: Техносфера. 2003. 592 с.
- Хрусталева А.М.** Комплексный метод дифференциации нерки (*Oncorhynchus nerka*) азиатских стад. М.: Изд-во ВНИРО. 2007. 165 с.
- Хрусталева А.М.** Вариабельность размерно-возрастных показателей и генетическая изменчивость нерки *Oncorhynchus nerka* западного побережья Камчатки: сравнительный анализ методов дифференциации локальных популяций // Вопр. ихтиол. 2010. Т. 50. № 3. С. 305–317.
- Хрусталева А.М., Гриценко Н.В., Кловач Н.В.** Полиморфизм по однонуклеотидным заменам (SNP) в популяциях нерки *Oncorhynchus nerka* п-ова Камчатка // Генетика. 2013. Т. 49. № 11. С. 1322–1336.
- Хрусталева А.М., Зеленина Д.А.** Сезонная и межгодовая изменчивость микросателлитной ДНК нерки (*Oncorhynchus nerka*) двух озерно-речных систем Камчатки // Генетика. 2008. Т. 44. № 7. С. 948–955.
- Хрусталева А.М., Стоклицкая Д.С.** Исследование полиморфизма микросателлитных локусов ДНК в смежных поколениях и подходах нерки (*Oncorhynchus nerka* Walbaum) р. Большая (западная Камчатка) // Экология в меняющемся мире: Материалы конф. молодых ученых. ИЭРиЖ УрО РАН. Екатеринбург: Изд-во «Академкнига». 2006. С. 254–265.
- Черешнев И.А., Волобуев В.В., Шестаков А.В., Фролов С.В.** Лососевидные рыбы Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука. 2002. 496 с.

- Шитова М.В.** Дифференциация заводских популяций кеты Сахалинской области по микросателлитным маркерам. Автореф. дис. ... канд. биол. Наук. М.: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. 2008. 24 с.
- Шпигальская Н.Ю.** Генетическая дифференциация азиатских популяций тихоокеанского лосося – чавычи, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Владивосток. 2010. 24 с.
- Шпигальская Н.Ю., Муравская У.О., Сараванский О.Н., Шевляков Е.А.** Предварительные результаты региональной идентификации молодежи горбуши по материалам осенней траловой съемки 2010 г. в Охотском море // Бюл. № 6 реализации «Концепции дальневосточной бассейновой программы изучения тихоокеанских лососей». Владивосток: ТИНРО-Центр. 2011. С. 284–287.
- Шпигальская Н.Ю., Пильганчук О.А., Савенков В.В., Кустова А.С., Муравская У.О., Сараванский О.Н.** Результаты исследований внутривидовой структуры промысловых видов рыб методами популяционной генетики // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и сев.-зап. части Тихого океана. Сб. науч. тр. КамчатНИИ рыб.хоз-ва и океанографии. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО. Вып. 25. 2012. С. 69–97.
- Шпигальская Н.Ю., Шапоров Р.А., Збоева Е.Н., Варнавская Н.В.** Генетическая дифференциация по аллозимным локусам локальных популяций нерки, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), в бассейне р. Камчатка (п-ов Камчатка) / В кн.: «Популяционная биология, генетика и систематика гидробионтов». Сб. науч. трудов КамчатНИРО. Т. 1. Петропавловск-Камчатский: Изд-во КамчатНИРО. 2005. С. 97–113.
- Шунтов В.П., Темных О.С.** Тихоокеанские лососи в морских и океанических экосистемах. Т. 1. Владивосток: ТИНРО-Центр. 2008. 481 с.

- Эллиот В., Эллиот Д.** Биохимия и молекулярная биология / Пер. с англ.: О.В. Добрыниной и др. Под ред. Арчакова А.И. и др. М.: МАИС «Наука/Интерпериодика». 2002. 446 с.
- Янулов К.П.** О группировках окуня-клювача (*Sebastes mentella* Travin) в Лабрадорско-Ньюфаундлендском районе // Советские рыбохозяйственные исследования в северо-западной части Атлантического океана. М.: ВНИРО–ПИНРО. 1962. С. 285–296.
- Allendorf F.W., Seeb L.W.** Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers // *Evolution*. 2000. V. 54. P. 640–651.
- Avise J.C.** *Molecular Markers. Natural History and Evolution*. N.Y.; London: Chapman and Hall. 1994. 511 p.
- Banks M.A., Blouin M.S., Baldwin B.A., Rashbrook V.K., Fitzgerald H.A., Blankenship S.M., Hedgecock D.** Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) // *J. Hered.* V. 90. 1999. P. 281–288.
- Beacham T.D., Margolis L., Nelson R.J.** A comparison of methods of stock identification for sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Barkley Sound. British Columbia // *N. Pac. Andr. Fish Comm. Bull.* 1998. V. 1. P. 227–239.
- Beacham T.D., McIntosh B., MacConnachie C., Miller K.M., Withler R.E., Varnavskaya N.V.** Pacific Rim population structure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) as determined from microsatellite analysis // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 2006a. V. 135. P. 174–187.
- Beacham T.D., Varnavskaya N.V., McIntosh B., MacConnachie C.** Population structure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) from Russia determined with microsatellite DNA variation // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 2006b. P. 97–109.
- Beacham T.D., Wood C.C.** Application of microsatellite DNA variation to estimation of stock composition and escapement of Nass River sockeye salmon // *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1999. V. 56. №. 2. P. 297–310.

- Beacham T.D., Wood C.C., Wither R.E., Miller K.M.** Application of microsatellite DNA variation to estimation of stock composition and escapement of Skeena River sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) // N. Pac. Anad. Fish. Comm. Bull. 2000. V. 2. P. 263–276.
- Billington N., Hebert P.D.H.** Mitochondrial DNA diversity of fishes and its implications for introductions // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1991. V. 48. P. 80–94.
- Brookes A.J.** The essence of SNPs // Gene. 1999. V. 234. № 2. P. 177–186.
- Brown W.M., George M., Wilson A.C.** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1979. V. 76. P. 1967–1971.
- Buchholtz W.G., Miller S.J., Spearman W.J.** Isolation and characterization of chum salmon microsatellite loci and use across species // Animal Genetics. 2001. V. 32. № 3. P. 162–165.
- Burgner R.L.** Life History of Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) / Groot C., Margolis L. [ed] UBC Press. University of British Columbia. Vancouver: UBC Press. 1991. P. 1–118.
- Cargill M., Altshuler D., Ireland J., Sklar P., Ardlie K., Patil N., Shaw N., Lane C.R., Lim E.P., Kalyanaraman N., Nemesh J., Ziaugra L., Friedland L., Rolfe A., Warrington J., Lipshutz R., Daley G.Q., Lander E.S.** Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes // Nature Genetics. 1999. V. 22. 231–238.
- Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.E.** Phylogenetic analysis: models and estimation procedures // Evolution. 1967. V. 21. P. 550–570.
- Chalmers K.J., Waugh R., Sprent J.I., Simons A.J., Powell W.** Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers // Heredity. 1992. № 69. P. 465–472.
- Churikov D., Matsuoka M., Luan X., Gray A.K., Brykov V.A., Gharrett A. J.** Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) // Mol. Ecol. 2001. V. 19. № 9. P. 2329–2339.

- De Woody J.A., Avise J.C.** Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals // *J. Fish Biol.* 2000. V. 56. P. 461–473.
- Dobzhansky Th.** *Genetics and the Origin of Species*. 3rd edn. Columbia University Press. 1951. 364 p.
- Elfstrom C.M., Smith, C.T. and Seeb, J.E.** Thirty-two single nucleotide polymorphism markers for high-throughput genotyping of sockeye salmon // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6. P. 1255–1259.
- Ellegren H.** Microsatellites: simple sequences with complex evolution // *Nature Genetics*. 2004. V. 5. P. 5435–5445.
- Ellegren H.** Mutation rates at porcine microsatellite loci // *Mammalian Genome*. 1995. V. 6. P. 376–377.
- Estoup A., Presa P., Krieg F., Vaiman D., Guyomard R.** (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout) // *J. Heredity*. 1993. V. 71. P. 488–496.
- Felsenstein J.** PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Seattle. WA Department of Genomic Sciences. University of Washington. 2004.
- Ferris S.D., Berg W.J.** The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and management // *Population genetics and fishery management* / ed. N. Ryman. F. Utter. Seattle. L.: Univ. Wash. Press. 1987. P. 277–301.
- Ferris S.D., Sage R.D., Prager E.M., Ritte U., Wilson AC.** Mitochondrial DNA evolution in mice // *Genetics*. 1983. V. 105. P. 681–721.
- Foerster R.E.** The sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* // *Bull. Fish. Res. Board Can.* 1968. V. 162. 422 p.
- Foote C.J., Withler R.E., Wood C.C.** Biochemical genetic comparison of sockeye salmon and kokanee, the anadromous and nonanadromous forms of *Oncorhynchus nerka* // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1989. V. 46. P. 149–158.
- Garmin MapSource. Version 6.5.**
(http://www.garmin.com/software/MapSource_65beta.exe)

- Gibson, G.** Microarrays in ecology and evolution: a preview // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. № 1. P. 17–24.
- Grant W.S., Milner B.G., Krasnowski P., Utter F.M.** Use of biochemical genetic variants for identifications of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks in Cook Inlet, Alaska // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1980. V. 37. P. 1236–1247.
- Guthrie III C.M., Helle J.H., Aebersold P., Winans G.A., Gharrett A.J.** Preliminary report on the genetic diversity of sockeye salmon populations from southeast Alaska and northern British Columbia / National Marine Fisheries Service AFSC Proc. Rep. 94–03. 1994. 109 p.
- Habicht C., Olsen J.B., Fair L., Seeb J.E.** Smaller effective population sizes evidenced by loss of microsatellite alleles in tributary-spawning populations of sockeye salmon from the Kvichak River, Alaska drainage // *Envir. Biol. of Fish.* 2004. V. 69. P. 51–62.
- Habicht, C., L. W. Seeb, K. W. Myers, E. V. Farley, and J. E. Seeb.** Summer–fall distribution of stocks of immature sockeye salmon in the Bering Sea as revealed by single-nucleotide polymorphisms (SNPs) // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 2010. V. 139. P. 1171–1191.
- Hartman W.L., Raleigh R.F.** Tributary homing of sockeye salmon at Brooks and Karluk Lakes, Alaska // *J. Fish. Res. Bd. of Canada.* 1964. V. 21. P. 485–504.
- Hoar W.S.** The evolutions of migratory behaviour among juvenile salmon of genus *Oncorhynchus* // *J. Fish. Res. Bd. of Canada.* 1958. V. 15(2). P. 391–428.
- Hodgins H., Ames W.E., Utter F.M.** Variation of lactate isozymes in sera of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* // *J. Fish. Res. Bd. of Canada.* 1969. V. 26. P. 15–19.
- Jackson T.R., Ferguson M.M., Danzmann R.G., Fishback, A.G., Ihssen P.E., O'Connell M., Crease, T.J.** Identification of two QTL-influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families // *J. Heredity.* 1998. V. 80. P. 143–151.
- Lewis P.O., Zaykin D.Yu.** Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. 2001. (<http://lewis.eeb.uconn.lewishome/software.html>).

- Lewontin R.C.** The apportionment of human diversity // *Evol. Biol.* 1972. V. 6. P. 381–398.
- Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E.** Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 2453–2465.
- Ludwig A., May B., Debus L., Jenneckens I.** Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser, Huso and Scaphirhynchus*) // *Genetics.* 2000. V. 156. P. 1933–1947.
- Masuda M., Nelson S., Pella J.** The computer programs for computing conditional maximum likelihood estimates of stock composition from discrete characters // U.S. Department of Commerce. NOAA/NMFS Auke Bay Laboratories. Juneau. Alaska. 1991.
- McCart P.** Behavior and ecology of sockeye salmon fry in the Babiner River // *J. Fish. Res. Bd. of Canada.* 1967. V. 24. № 2. P. 375–428.
- Morin P.A., Luikart G., Wayne R.K.** SNPs in ecology. evolution and conversation // *Trends in ecology and evolution.* 2004. V. 19(4). P. 208–216.
- Morris D.B., Richard K.R., Wright J.M.** Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1996. V. 53. P. 120–126.
- Mullis K., Erlich H., Faloona F., Horn G., Saiki R., Scharf S.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro — the polymerase chain reaction / *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986. V. 51. P. 263–273.
- Nei M.** Genetic distance between populations // *American Naturalist.* 1972. V. 106(949). P. 283–292.
- Nei M.** *Molecular evolutionary genetics.* N.Y.: Columbia Univ. press. 1987. 512 p.
- Nei M., Tajima F.** DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases // *Genetics.* 1981. V. 105. P. 207–217.
- Nelson J.S.** *Fishes of the world.* New York: John Wiley and Sons. 1984. 523 p.

- Nelson R.J., Beacham T.D.** Isolation cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon // *Animal Genetics*. 1999. V. 30. P. 228–229.
- Nielsen R.**, Estimation of population parameters and recombination rates using single nucleotide polymorphisms // *Genetics*. 2000. V. 154. P. 931–942.
- O'Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K., Wright J.M.** Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1996. V. 53. P. 2292–2298.
- Olsen J.B., Seeb L.W., Bentzen P., Seeb J.E.** Genetic interpretation of broad-scale microsatellite polymorphism in odd-year pink salmon // *Amer. Fish. Soc.* 1998a. V. 127. P. 535–550.
- Olsen J.B., Bentzen P., Seeb J.E.** Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon // *Mol. Ecol.* 1998b. V. 7. P. 1083–1090.
- Olsen J.B., Wenburg J.K., Bentzen P.** Semi-automated multilocus genotyping of Pacific salmon (*Oncorhynchus spp.*) using microsatellites // *Mol. Marine Biology & Biotechnology*. 1996. V. 5. № 4. P. 259–272.
- Olsen J.B., Wilson S.L., Kretschmer E.J., Jones K.C., Seeb J.E.** Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. P. 2185–2187.
- Paetkau D., Slade R., Burden M., Estoup A.** Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power // *Mol. Ecol.* 2004. V. 13. P. 55–65.
- Pauling L., Itano H.H., Singer S.J., Wells, I.G.** Sickle cell anemia: a molecular disease // *Science*. 1949. V. 4. P. 543–548.
- Peakall R., Smouse P.E.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6. P. 288–295.
- Rexroad III C.E., Coleman R.L., Gustafson A.L., Hershberger W.K., Killefer J.** Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries // *Mar. Biotechnol.* 2002. V. 4(1). P. 12–16.

- Rexroad III C.E., Coleman R.L., Martin A.M., Hershberger W. K., Killefer J.** Thirty-five polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Animal Genetic*. 2001. V. 32. P. 317–319.
- Ricker W.E.** Additional observation concerning residual sockeye and kokanee // *J. Fish. Res. Bd. of Can.* 1959. № 16. P. 897–902.
- Ricker W.E.** Sockeye salmon in British Columbia // In: *Salmon of North Pacific Ocean. Part III. A. review of the life history of North American salmon. Int. North Pac. Fish. Comm.* 1966. № 18. P. 59–70.
- Rohlf F.J.** NTSYSpc Numerical taxonomy and multivariate analysis system ver. 2.0 User Guide. Applied Biostatistics Inc. Setauket. New York. 1998. 37 p.
- Rutherford D.T., Wood C.C., Hyatt K.D., Margolis L., McDonald T.E., Riddell B.E., Withler R.E.** Biological characteristics of coastal populations of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in British Columbia / *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1992. № 1849. 47 p.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.** Premier-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase // *Science*. 1988. V. 239. P. 487–491.
- Saitou N., Nei M.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. and Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989. 1626 p.
- Sánchez J.A., Clabby C., Ramos D., Blanco G., Vazquez E., Powell, R.** Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon) // *J. Heredity*. 1996. V. 77. P. 423–432.
- Schannon C.E., Weaver W.** *The mathematical theory of communication*. Urbana: Univ. Illinois press. 1949. 117 p.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L.** Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. Univ. Geneva. Switzerland. 2000.

- Scribner K.T., Gust J.R., Fields R.L.** Isolation and characterization of novel microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1996. V. 53. P. 685–693.
- Seeb L.W., Crane P.A.** High genetic heterogeneity in chum salmon in Western Alaska, the contact zone between Northern and Southern lineages // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1999. V. 128. P. 58–87.
- Seeb J.E., Habicht C., Olsen J.B., Bentzen P., Shaklee J.B., Seeb L.W.** Allozyme, mtDNA, and microsatellite variants describe structure of populations of pink and sockeye salmon in Alaska // *NPAFC Bull.* 1998. № 1. P. 300–318.
- Seeb J.E., Wilmot R.L., Urawa S., Abe S., Seeb L.W., Smith C.T.** Single nucleotide polymorphisms (SNPs) provide standard DNA data for Bering-Aleutian salmon international survey (BASIS) studies // *NPAFC Tech. Rept.* 2005b. № 6. P. 101–103.
- Seeb L.W., Templin W.D., Smith C.T., Elfstrom C., Urawa S., Wilmot R.L. and, Seeb J.E.** SNPs provide an easily-standardized baseline for NPAFC studies of chum salmon // *NPAFC.* 2005a. Doc. 907. 12 p.
- Small M.P., Beacham T.D., Withler R.E., Nelson R.J.** Discrimination coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations within the Fraser River, British Columbia // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. P. 141–155.
- Smith C.T., Baker J., Park L., Seeb L.W., Elfstrom C., Abe S., Seeb J.E.** Characterization of 13 single nucleotide polymorphism markers for chum salmon // *Mol. Ecol. Notes.* 2005a. № 5. P. 259–262.
- Smith, C.T., Elfstrom, C.M., Seeb, L.W. and Seeb, J.E.** Use of Sequence Data From Rainbow Trout and Atlantic Salmon for SNP Detection in Pacific Salmon // *Mol. Ecol.* 2005b. V. 14. P. 4193–4203.
- Smith C.T., Koop B.F., Nelson R.J.** Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. P. 1613–1621.

- Smith C.T., Seeb L.W.** Number of alleles as a predictor of the relative assignment accuracy of STR and SNP baselines for chum salmon // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 2008. № 137. P. 751–762.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R.** Numerical Taxonomy; the Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: W. H. Freeman. 1973. 573 p.
- Sokal R.R., Rohlf F.G.** Biometry. 2nd ed. W.H. Freeman & Co., San Francisco. CA. 1981. 859 p.
- Spies I.B., Brazier D.J., O'Reilly P.T., Seamons T.R., Bentzen P.** Development and characterization of novel tetra-, tri- and dinucleotide microsatellite markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Mol. Ecol. Notes.* 2005. V. 5. P. 278–281.
- Tautz D.** Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. P. 6463–6471.
- Taylor E.B., Foote C.J., Wood C.C.** Molecular genetic evidence for parallel life history evolution within a Pacific salmon (sockeye salmon and kokanee), *Oncorhynchus nerka* // *Evolution.* 1996. V. 50. P. 401–416.
- Templin W.D., Smith C.T., Seeb J.E., Seeb L.W.** SNPs provide high-throughput resolution for migratory studies of chinook salmon // *NPAFC.* 2005. Doc. 908. 10 p.
- Tessier N., Bernatchez L.** Stability of population structure and genetic diversity across generations assessed by microsatellites among sympatric populations of landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) // *Mol. Ecol.* 1999. V. 8. P. 169–188.
- Thomas W.K., Beckenbach A.T.** Variation in salmonid mitochondrial DNA: evolutionary constraints and mechanisms of substitution // *J. Mol. Evol.* 1989. V. 29. P. 233–245.
- TreeView** (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rteeview.html>).
- Utter F.M., Aegersold P., Helle J., Winans G.** Genetic characterization of populations in the southeastern range of sockeye salmon / In: «Proceeding of

the Olympic Wild Fish Conference». Walton J.M., Houston D.B. [eds] Port Angeles, Wa: Peninsula College. 1984. P. 17–32.

Utter F.M., Hodgins H.O. Phosphoglucosmutase polymorphism in sockeye salmon // *Comp. Biochem. Physiol.* 1970. V. 36. P. 195–199.

Utter F.M., Hodgins H.O., Allendorf F.W., Johnson A.G., Mighell J.L. Biochemical variants in Pacific salmon and rainbow trout: Their inheritance and application in population studies / In: «Genetics and Mutagenesis of fish». Berlin: Springer-Verlag. 1973. P. 329–339.

Varnavskaya N.V., Everett R.J. Genetic variation in Sockeye Salmon *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) populations of the Alaska and Kamchatka regions / *Abs. Proc. Int. Symp. «Genetics of Arctic Fish and Shellfish»*. 1993. Juneau, Alaska. P. 13.

Varnavskaya N.V., Nikolaeva A.A. Interpopulation structure of Kuril Lake Sockeye salmon / *Abs. Proc. Symp. «Pacific Salmon»*. Nanaimo, BC, Canada. Nanaimo: PBS. 1990.

Varnavskaya N.V., Wood C.C., Everett R.J. Genetic variation in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) populations of Asia and North America // *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1994a. V. 51 (Suppl.). P. 132–146.

Varnavskaya N.V., Wood C.C., Everett R.J. The genetic diversity within several lake sockeye populations located in Kamchatka, Alaska and British Columbia / *Abs. Proc. Int. Symp. Genetics of Arctic Fish & Shellfish*. 1993. Juneau, Alaska. P. 14.

Varnavskaya N.V., Wood C.C., Everett R.J., Wilmot R.L., Varnavsky V.S., Midanaya V.V., Quinn T.P. Genetic differentiation of subpopulations of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) within lakes of Alaska, British Columbia and Kamchatka // *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1994b. V. 51 (Suppl.). P. 147–157.

Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. A review of SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics // *Genet. Sel. Evol.* 2002. V. 34. P. 275–305.

- Weber J.L., Wong C.** Mutation of human short tandem repeats // Human Molecular Genetics. 1993. V.2. P. 1123–1128.
- Williamson K.S., Cordes J.F., May B.** Characterization of microsatellite loci in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids // Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. P. 17–19.
- Wilmot R.L., Burger C.V., Steinbach P.** Genetics of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Katmai National Park and Preserve. Alaska / U. S. Fish and Wildlife Serv. Prog. Rep.. Anchorage. 1986. 28 p.
- Withler R.E.** LDH-4 Allozyme variability in North American sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) populations // Can. J. Zool. 1985. V. 63. P. 2924–2932.
- Wood C.C., Riddell B.E., Rutherford D.T., Withler R.E.** Biochemical genetic survey of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Canada // J. Fish. Aquat. Sci. 1994. V. 51. suppl. 1. P. 114–131.
- Wright J.M.** DNA fingerprinting in fishes / In: «Biochemistry and Molecular Biology of Fishes». Hochachka P., Mommsen T. [eds]. Amsterdam: Elsevier. 1993. V. 2. P. 57–91.
- Zelenina D.A., Khrustaleva A.M., Volkov A.A., Habicht C., Smith C., Seeb J.** A case study of two genetic markers for inter-laboratory collaboration: SNPs provide transportability without standardization. // NPAFC Doc. 2005. № 913. 14 p.