

На правах рукописи

УДК 597 553 2 575

ХРУСТАЛЕВА
Анастасия Михайловна

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НЕРКИ
(*ONCORHYNCHUS NERKA*) АЗИАТСКИХ СТАД

Специальность 03 00 10 – ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва - 2007

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)

Научный руководитель доктор биологических наук
Кловач Наталия Владимировна,
Всероссийский научно-исследовательский
институт рыбного хозяйства и океанографии
(ВНИРО), г Москва

Официальные оппоненты доктор биологических наук
Кляшторни Леонид Борисович,
Всероссийский научно-исследовательский
институт рыбного хозяйства и океанографии
(ВНИРО), г Москва

кандидат биологических наук
Шубина Елена Александровна,
Научно-исследовательский институт физико-
химической биологии им. А Н Белозерского
МГУ, г Москва

Ведущая организация Дмитровский филиал Астраханского
государственного технического университета
(ДФ ФГОУ ВПО «АГТУ»)

Защита состоится 26 октября 2007 г в 11 часов на заседании
диссертационного совета Д 307 004 01 при Всероссийском научно-
исследовательском институте рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)
по адресу 107140, Москва, ул Верхняя Красносельская, д 17

Факс 8-499-264-91-87, электронный адрес sedova@vniro.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИРО

Автореферат разослан «21» сентября 2007 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

М А Седова

Актуальность темы. Нерка *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) – анадромный моноциклический вид с длительным пресноводным периодом жизни, представленный в пределах ареала множеством популяций различного иерархического уровня (Берг, 1948, Foerster, 1968, Коновалов, 1980, Крогиус, 1983, Burgner, 1991, Бугаев, 1995) В связи с высокой экологической пластичностью, морфологической и генетической изменчивостью, сложной внутривидовой и внутривидовой организацией, характерной для данного вида, задача дифференциации стад нерки имеет большое научное и практическое значение. Этому вопросу посвящено множество работ, использующих различные методологические подходы, само многообразие которых свидетельствует о сложности данной проблемы.

В целом, методы, используемые в решении подобного рода задач, могут быть разделены на две группы: классические ихтиологические (мечение, морфологические маркеры, паразиты-индикаторы) и генетические. К настоящему моменту накоплены обширные сведения о распространении американских и азиатских стад нерки, основанные на результатах многолетнего мечения (Myers et al., 1996), паразитологических (Коновалов, 1971, Margolis, 1963, Бирман, 2004, Beacham et al., 1998) и морфологических (Бугаев, 2003, Бугаев, 2003а, 2003б, 2003в) данных.

Однако далеко не всегда с помощью биологических маркеров удается определить принадлежность нерки к американским или азиатским стадам, не говоря уже о принадлежности к популяциям более низкого ранга (Бугаев, 2003а). В ряде случаев малоэффективными оказываются и методы биохимической генетики, что связано с низкой аллозимной изменчивостью, свойственной данному виду (Varnavskaya, 1994а, Варнавальская, 2006). Поэтому в последние годы в России, США и Канаде наряду с изучением белкового полиморфизма в популяциях нерки активно проводятся молекулярно-генетические исследования (Vickham et al., 1995, Taylor et al., 1996, Брыков и др., 2003, Beacham et al., 1995, 2005а, 2006а, Corley-Smith et al., 2005). Сегодня уже существует обширный генетический банк данных по нерке Азии и Северной Америки. Однако до настоящего времени молекулярно-генетическими исследованиями не были охвачены стада нерки материкового побережья Охотского моря и Курильских островов. Вместе с тем изучение генетической изменчивости нерки на всем

ареале является важным условием для понимания закономерностей эволюции и формирования представлений о популяционной структуре вида в целом

Поскольку каждый из используемых в настоящее время методов оперирует данными, отражающими различные аспекты одного и того же феномена – существования внутри вида в той или иной степени обособленных, сложным образом взаимодействующих локальных группировок – целостное представление о популяционной организации может быть составлено только на основе обобщения информации, поставляемой различными методами (Begg, Waldman, 1999) В этой связи комплексный подход к проблеме дифференциации стад нерки, основанный на использовании биологических и молекулярно-генетических маркеров представляется наиболее перспективным

Наконец, для корректной интерпретации результатов молекулярно-генетических исследований необходимо выполнение как минимум двух условий 1) тщательный подбор ДНК-маркеров и 2) изучение межгодовой и сезонной изменчивости аллельных частот полиморфных локусов ДНК с целью ее исключения на этапе суждения о популяционной принадлежности особей Такой комплекс исследований азиатской нерки ранее не проводился

В свете изложенного целью исследования было выявление генетической дифференциации популяций нерки азиатского побережья Тихого океана и разработка метода определения популяционной принадлежности особей

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Определить эффективность использования различных типов маркеров для дифференциации популяций и определения популяционной принадлежности на примере нерки западной Камчатки и отобрать наиболее репрезентативные молекулярные маркеры ядерной ДНК для популяционно-генетических исследований азиатской нерки
- 2) Оценить соотношение межгодовой (на уровне смежных поколений и подходов), сезонной (на уровне сезонных рас) и межпопуляционной компонент генетической изменчивости нерки азиатских стад
- 3) Изучить размерно-возрастную структуру и генетическую изменчивость в популяциях азиатской нерки крупнейших озерно-речных систем западной и восточной Камчатки, Чукотки, северо-западного побережья Охотского моря и северных Курильских островов

- 4 Разработать комплексный подход к дифференциации стад азиатской нерки с использованием биологических и молекулярно-генетических маркеров
- 5 Оценить эффективность отобранных маркеров для индивидуальной идентификации и определения популяционной принадлежности нерки из смешанных морских уловов

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное исследование полиморфизма ядерной ДНК нерки трех крупнейших популяций западной Камчатки с использованием трех типов молекулярно-генетических маркеров RAPD-маркеров, микросателлитных локусов ДНК и SNP-маркеров. Для популяционно-генетических исследований азиатской нерки были отобраны 6 высокополиморфных микросателлитных локусов, не использовавшихся ранее в качестве генетических маркеров нерки российских стад. Впервые проведено исследование межгодовой изменчивости аллельных частот микросателлитных локусов ДНК в смежных поколениях и подходах азиатской нерки (р Большая, западная Камчатка)

Впервые методами молекулярно-генетического анализа исследованы локальные популяции нерки северо-западного побережья Охотского моря (р Охота) и северных Курильских островов (о Шумшу, озерно-речная система Беттобу). Сформулирована гипотеза о заселении Северных Курильских островов неркой из южных рефугиумов (районы к югу от п-ва Камчатка) после отступления позднеплейстоценового оледенения, что обуславливает ее генетические отличия от нерки более северных регионов. Разработан комплексный подход к дифференциации нерки азиатских стад с использованием биологических и молекулярно-генетических маркеров

Практическая значимость работы. Создан низкотемпературный криобанк образцов ткани нерки крупнейших азиатских популяций, пополнена база данных Российской национальной коллекции эталонных генетических материалов (РНКЭГМ ВНИРО). На II часть РНКЭГМ (Лососевые виды рыб) получено свидетельство об официальной регистрации базы данных в Федеральной службе России по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам за № 2006620352 от 3 11 2006

Создана реперная база генетических данных, включающая аллельные частоты по 6 микросателлитным локусам, практически для всей азиатской части

ареала исследуемого вида и разработана методика определения популяционной принадлежности особей нерки

Результаты представленной работы могут использоваться для идентификации происхождения нерки, пойманной у восточного побережья Камчатки, при проведении мониторинговых работ в период преднерестовых миграций с целью оценки доли рыб западной Камчатки, р Камчатка и берингоморского побережья Камчатки Это позволяет за 2-4 недели до подходов в районы прибрежного промысла оперативно корректировать прогнозы сроков и численности подходов нерки к районам воспроизводства

Положения, выносимые на защиту.

- 1 Для дифференциации стад и определения популяционной принадлежности нерки азиатского побережья Тихого океана наиболее эффективными являются микросателлитные ДНК-маркеры
- 2 Межпопуляционная генетическая изменчивость нерки Камчатки соответственно в 7-15 раз превышает межгодовую, и в 4 раза - сезонную изменчивость
- 3 Последлединовое расселение нерки из перигляциальных рефугиумов послужило основой ее пространственной генетической дифференциации
- 4 Комплексный подход к дифференциации стад азиатской нерки с использованием молекулярно-генетических и биологических маркеров представляется наиболее перспективным в изучении внутривидовой структуры нерки Азии

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Международной конференции "Инновации в науке и образовании – 2004" (Калининград, 2004 г), 13 сессии NPAFC (Чеджо, Республика Корея, 2005 г), конференции молодых ученых "Экология в меняющемся мире" ИЭРиЖ УрО РАН (Екатеринбург, 2006 г), Международной конференции "Применение генотипирования SNP в рабпромысловых исследованиях" (Гринвуд, США, 2006 г), 15-ом ежегодном совещании PICES (Йокогама, Япония, 2006 г), Международной конференции "Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей" (Петропавловск-Камчатский, 2006 г), Международном конгрессе студентов, аспирантов и молодых ученых "Перспектива-2007" (Нальчик, 2007 г), Международной конференции молодых ученых PICES

"Новые рубежи в морской науке" (Балтимор, США, 2007 г), конференции "Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов" (Петрозаводск, 2007 г), а также на коллоквиумах и Ученых советах ВНИРО

Публикации. По результатам исследований опубликовано 12 работ, в том числе 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка литературы из 370 наименований, содержит 39 рисунков и 37 таблиц. Общий объем работы - 233 страницы

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность коллегам из ВНИРО, КамчатНИРО, Чукотского и Хабаровского отделений ТИНРО, принявшим участие в организации полевых работ и сборе материала, заведующей лабораторией экологии рыб, д б н Е Н Кузнецовой за содействие в организации сбора и обработки материала, сотрудникам сектора молекулярной генетики ВНИРО А А Волкову, к б н Д А Зелениной, В А Барминцеву, А Е Барминцевой, Д С Стоклицкой, к б н Н С Мюге за помощь в обработке материала, предоставление и освоение методик

Особую признательность автор выражает своему научному руководителю д б н Н В Кловач за организацию работы на всех ее этапах, ценные рекомендации и замечания по тексту рукописи

ГЛАВА 1 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ СТАД НЕРКИ

В главе рассматриваются особенности распространения и биологии нерки, приводятся различные взгляды на популяционную организацию данного вида, обсуждаются основные методы дифференциации стад тихоокеанских лососей. Подробно рассмотрены современные методики молекулярно-генетического анализа, их достоинства и недостатки, на основании чего предложены методы, используемые в данной работе

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Основные сведения о собранном и обработанном материале

Материалом послужили данные биоанализа, образцы чешуи и пробы ткани нерки, собранные в 2003-2005 гг в устьях рек западной и восточной Камчатки,

материкового побережья Охотского моря, водоемах Чукотки и северных Курильских островов (Табл 1)

Таблица 1 Объем собранного и обработанного материала

Популяция	Обозначение	Дата сбора	Количество собранных и обработанных проб			
			Биоанализ	Определение возраста	Выделение ДНК	Электрофорез
Чукотка, Мейныпильгынская озерно-речная система, оз Ваамочка	Ch	28 июля 2004 г	50	50	50	50
Восточная Камчатка, р Пахача	KPh	17-27 июня 2005 г	67	67	60	55
Восточная Камчатка, р Камчатка (устье)	KK	29 июня - 9 июля 2004 г	200	200	101	60
Восточная Камчатка, бассейн р Камчатка, оз Азабачье	KKa	3-13 июля 2004 г	150	-	82	60
Западная Камчатка, р Озерная	KO	4-7 августа 2003 г	200	200	100	100
Западная Камчатка, р Большая	KB-03	23-30 июля 2003 г	200	200	100	100
	KB-04	11-20 августа 2004 г	100	-	81	80
Западная Камчатка, р Палана	KP	10-21 июля 2003 г	200	200	100	100
Материковое побережье Охотского моря, р Охота	Okh	22 июля 2004 г	100	100	80	70
Северные Курильские о-ва, о Шумшу, озерно-речной комплекс Беттобу	Kur	30 июля - 5 августа 2004 г	60	60	60	50

Анализ полиморфизма микросателлитной ДНК нерки проведен для 720 производителей из разных районов азиатской части ареала вида. Исследование популяционной структуры нерки Западной Камчатки проведено с использованием трех типов молекулярных маркеров. Исследован полиморфизм шести микросателлитных локусов (*One-108*, *One-109*, *One-111*, *One-114*, *OtsG253b*, и *OMM-1082*), пяти SNP локусов (*One-mhc109*, *One-mhc190*, *One-*

mhc251, *One-Pr12* и *One-CytB26*), а также проведен анализ варибельности случайно амплифицированной полиморфной ДНК методом RAPD-PCR со стандартным 10-нуклеотидным праймером *OPA-02*

2.2. Методики молекулярно-генетического анализа

Тотальную ДНК выделяли из фрагментов печени или спинного плавника по стандартным методикам (Маниатис и др., 1984, Sambrook et al., 1989) Концентрацию и степень очистки выделенной ДНК определяли на планшетном спектрофотометре "SPECTRAmax PLUS³⁸⁴" Выделенную ДНК разводили до концентрации 20-50 нг/мкл для последующей амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) Амплификацию фрагментов ДНК, содержащих тетра-нуклеотидные микросателлитные последовательности, проводили с помощью двух мультипраймерных ПЦР, для каждой из которых были выбраны три пары праймеров с близкими значениями температуры плавления Из каждой пары один олигонуклеотид (прямой) был модифицирован флуоресцентной меткой с максимумом эмиссии, отличающимся от двух других

Электрофорез осуществляли по стандартным методикам (Маниатис и др., 1984) Анализ продуктов амплификации микросателлитных локусов проводили с помощью прибора для капиллярного электрофореза Первичные данные SNP- и RAPD-анализа любезно предоставлены к.б.н. Зелениной Д.А. Обработку электрофореграмм и определение размера аллелей микросателлитных и RAPD-локусов выполняли с помощью программ GenoSpectrum и Phoretix 1D

2.3. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных биоанализа проведена с использованием пакета прикладных программ SPSS 10.0 Классификацию выборок осуществляли с помощью дискриминантного анализа Снижение размерности данных проводили методом главных компонент Визуализацию матрицы попарных межвыборочных геометрических дистанций "в городских кварталах" осуществляли с помощью многомерного шкалирования Сравнение выборок проводили с использованием t-критерия Стьюдента

Анализ данных ДНК-фингерпринтинга При анализе RAPD-профилей учитывали амплифицированные фрагменты размером от 100 до 800 пн Частоты рецессивных аллелей RAPD-локусов q'_i , их дисперсии $Var(q'_i)$, несмещенные

оценки гетерозиготности H' и средние значения \bar{H}' , по всем локусам рассчитывали по формулам, предложенным Животовским (Zhivotovsky, 1999) На основании стандартных генетических расстояний Неи методом невзвешенных парно-групповых средних (UPGMA) с помощью программы TFPGA строили дендрограмму генетического сходства популяций нерки Достоверность различий между популяциями по частотам RAPD-фрагментов оценивали с использованием вероятностного теста в программе TFPGA Тест на принадлежность к популяции (assignment-test) проводили с помощью специально разработанного нами программного обеспечения (Хрусталева и др., 2004) по формуле для доминантных генетических маркеров (Campbell et al., 2003) Многомерный анализ данных осуществляли с помощью демо-версии программного пакета BioNumerics

Основные генетические показатели популяций по результатам анализа полиморфизма микросателлитных локусов и SNP-анализа были получены с помощью программ TFPGA, GENEPOP 3.4, Microsatellite analyzer (MSA) 3.12, Population, TreeV 1.6.6 и Arlequin 2.0 Частоты аллелей в исследованных выборках, тесты на соответствие равновесию Харди-Вайнберга и проверку неравновесия по сцеплению рассчитывали с применением метода цепей Маркова в программе GENEPOP 3.4 Гетерозиготность в выборках и определение соответствия наблюдаемого и ожидаемого числа аллелей на локус согласно двум моделям мутационного процесса микросателлитных локусов проводили с помощью программы MSA 3.12 Расчет генетических дистанций Неи, $\delta\mu^2$, хордового расстояния и построение дендрограмм методом UPGMA- с помощью программ Population, TreeV 1.6.6 и TFPGA Достоверность филогенетических построений оценивалась с помощью бутстрэп-анализа (1000 итераций) Оценки межпопуляционной дифференциации аллельных частот - F_{st} (θ_{st}) и аналогичные оценки, основанные на корреляции с длинами аллелей - R_{st} (ρ_{st}) рассчитывали с помощью программы GENEPOP 3.4 Для проверки гипотезы изоляции расстоянием попарные межвыборочные генетические расстояния F_{st} (R_{st}) были изображены графически как функция географических дистанций, значимость регрессии между F_{st} (R_{st}) и физическими дистанциями проверена с помощью Мантель-теста в программе Isolda (GENEPOP 3.4) Многомерный статистический анализ генетических данных выполняли в программе SPSS 10.0

ГЛАВА 3 ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ НЕРКИ ЗАПАДНОЙ КАМЧАТКИ

3.1. Биологические показатели нерки рек западного побережья Камчатки

Анализ возрастной структуры нерки рек западной Камчатки показал, что большинство особей из рек Большая, Озерная и Палана проводит в море 3 года. Продолжительность пресноводного периода у нерки из разных водоемов воспроизводства различается. Наибольшая она у нерки р Озерная и р Палана, нагуливающейся в среднем два года до ската в море в озерах Курильском и Паланском, наименьшая – у нерки р Большая, в массе скатывающейся в море в возрасте 1+. Согласно данным, имеющимся в литературе (Бугаев, 1995, Бугаев и др., 2001а, 2001б, 2002а, 2002б, Бугаев, Дубынин, 2002), и нашим наблюдениям, проведенным в 2003 г., нерка рек западного побережья Камчатки различается по ряду биологических показателей, в том числе, по длине и массе тела. Самой крупной является нерка р Большая, самой мелкой – озерновская нерка.

Сравнение выборок нерки по шести критериям (длина и масса тела, масса порки, полный возраст, речной и морской возраст) выявило статистически значимые различия ($p < 0,05$) между выборками по размерам, массе и общей продолжительности жизни особей всех трех популяций, а также по продолжительности речного и морского периодов жизни между выборкой р Большая с одной стороны и выборками рек Озерная и Палана с другой. Это позволяет использовать основные биологические характеристики в качестве маркеров при определении популяционной принадлежности особей. Однако, биологические показатели, такие как масса, длина, возраст производителей и количество лет проведенных неркой в море, коррелируют между собой.

Для сокращения числа переменных и выявления скрытых (не поддающихся непосредственному измерению) компонент изменчивости (факторов), объясняющих взаимобусловленность биологических характеристик мы воспользовались процедурой снижения размерности. Из набора четырех основных характеристик (длина, масса тела, речной и морской возраст), были выделены два фактора объясняющих в сумме 76% общей изменчивости биологических признаков. Затем по результатам дискриминантного анализа

была построена модель, включающая оба фактора в качестве переменных, позволяющая дифференцировать выборки производителей нерки западного побережья Камчатки (рис. 1). С помощью полученной модели была выполнена классификация особей каждой из исследуемых выборок. Доля корректных определений в среднем составила 60% (табл. 2).

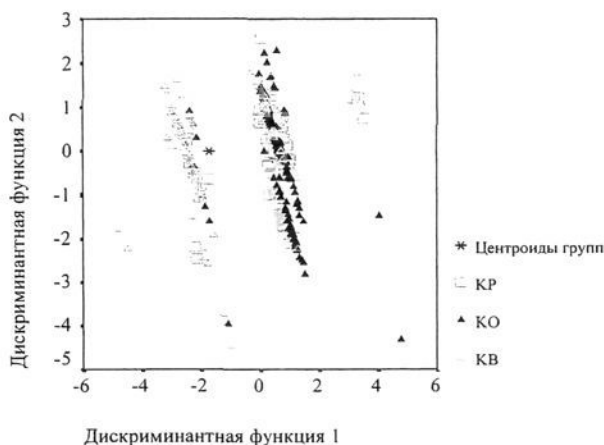


Рис. 1. Расположение выборок рек Большая (KB), Озерная (КО), Палана (КР) в пространстве двух канонических дискриминантных функций.

Низкая эффективность определения популяционной принадлежности особей по основным биологическим характеристикам обуславливает необходимость применения для дифференциации локальных стад нерки западной Камчатки других типов маркеров.

3.2. Молекулярные ДНК-маркеры в изучении популяционной структуры и определении популяционной принадлежности нерки западной Камчатки

В популяциях нерки Западной Камчатки все исследуемые микросателлитные и SNP локусы были полиморфны, при этом в большинстве выборок обнаружено статистически значимое соответствие наблюдаемых и ожидаемых при равновесии Харди-Вайнберга частот генотипов. Общее число ДНК-фрагментов в RAPD-спектрах составило 71, доля полиморфных RAPD-локусов в выборках варьировала от 64 до 71%.

Исследованные нами закономерности изменчивости трех типов молекулярных маркеров ДНК в популяциях нерки рек Большая, Озерная, Палана подтверждают, что наиболее высокий уровень полиморфизма характерен для кодоминантных микросателлитных локусов, гетерозиготность которых ($H_e = 0.888$) почти в пять раз превышает гетерозиготность RAPD-маркеров ($H_e = 0.189$) и в два раза - SNP-маркеров ($H_e = 0.409$). При этом сходство оценок генетической изменчивости в популяциях нерки западной Камчатки обнаруживается по всем трем типам маркеров. Наиболее высокая гетерозиготность была отмечена в выборке р. Озерная, что, очевидно, обусловлено огромной численностью курильской нерки, составляющей более 70% численности данного вида в Азии. Высокодостоверные различия между западнокамчатскими популяциями нерки были выявлены по частотам аллелей всех исследуемых молекулярных маркеров.

В результате кластеризации методом многомерного шкалирования на основе матрицы коэффициентов кросс-корреляции Дайса индивидуальных RAPD-спектров нерки западного побережья Камчатки особи объединились в три группы, каждая из которых соответствует отдельной локальной популяции (рис. 2).

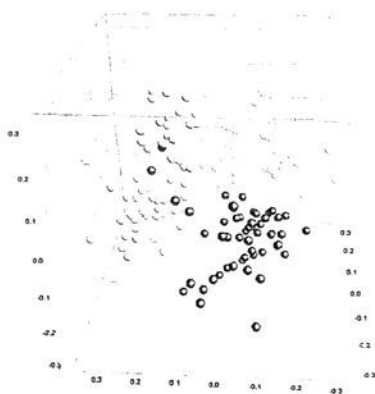


Рис. 2. Генетическая дифференциация нерки западного побережья Камчатки, полученная методом многомерного шкалирования данных RAPD-анализа; ● - р. Большая; ○ - р. Озерная; □ - р. Палана.

UPGMA-дендрограммы генетического сходства популяций нерки, построенные по дистанциям Ней, рассчитанным по частотам аллелей RAPD-

локусов, микросателлитных и SNP-локусов, характеризовались высокой степенью надежности, о чем свидетельствуют значения индексов бутстрепа, однако имели различную топологию (Рис 3) На наш взгляд, это объясняется тем, что при использовании разных методов анализа ДНК скринингу подвергаются различные области генома, и, таким образом, результаты, полученные с их помощью, при всей своей достоверности могут не вполне соответствовать друг другу. Представляется очевидным, что RAPD и SNP-маркеры, локализованные в кодирующих областях генома, могут быть подвержены различным формам отбора (Allendorf, Seeb, 2000). Кроме того, анализируемые ДНК-маркеры характеризуются разным темпом эволюционирования. Наиболее высокая частота мутаций свойственна микросателлитам (10^{-2} - 10^{-4} на локус за поколение), частота же однонуклеотидных замен по некоторым оценкам составляет примерно 10^{-9} на нуклеотид в год. При этом следует отметить высокий уровень скорелированности результатов микросателлитного и SNP-анализа.

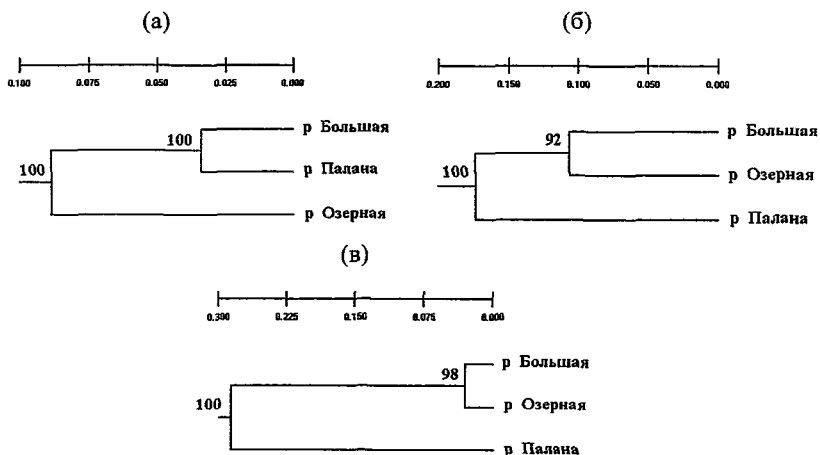


Рис 3 UPGMA-дендрограммы генетического сходства популяций нерки Западной Камчатки, построенные по результатам (а) - RAPD-PCR, (б) - анализа полиморфизма микросателлитных локусов, (в) - SNP-анализа (в узлах указаны индексы бутстрепа)

Молекулярные маркеры ДНК характеризуются разной эффективностью в тестах на определение популяционной принадлежности особей (табл 2) При определении индивидуальной принадлежности вероятность отнесения особи к нативной популяции зависит от числа и степени полиморфизма анализируемых молекулярных маркеров (Morin et al , 2004) Так стада нерки западной Камчатки можно идентифицировать с точностью 97% при использовании RAPD-маркеров, 78% - микросателлитов и лишь 61% при использовании SNP Высокая разрешающая способность RAPD-маркеров при определении популяционной принадлежности нерки подтверждается литературными данными (Corley-Smith et al , 2005)

Таблица 2 Результаты дискриминантного анализа и теста на принадлежность к популяции, проведенных по биологическим и генетическим характеристикам нерки рек западного побережья Камчатки

Популяция	Доля корректных определений, %			
	Биологические показатели	ДНК-фигерпринтинг (RAPD-PCR)	Анализ полиморфизма микросателлитных локусов	SNP-анализ
р Большая	74	94	78	54
р Озерная	41	96	75	49
р Палана	72	100	82	80
В среднем	60 3	96 7	78 3	61 0

Выбор того или иного маркера в первую очередь определяется целью исследования, а также возможностью сопоставления полученных результатов с данными других лабораторий и материальными и временными затратами на разработку и использование данного типа маркеров Так, RAPD-PCR, несмотря на высокую разрешающую способность, характеризуется низкой воспроизводимостью и чувствительностью к качеству матричной ДНК Анализ единичного нуклеотидного полиморфизма, напротив, имеет ряд преимуществ, тк помимо его надежности и однозначной трактовки полученных данных, результаты его полностью воспроизводимы при проведении параллельных исследований в различных лабораториях вне зависимости от способа анализа, используемых реактивов и оборудования В то же время, метод детекции SNP

посредством аллель-специфической ПЦР представляется менее экономичным по сравнению с анализом полиморфизма микросателлитной ДНК

Таким образом, для достижения поставленной перед нами цели наиболее предпочтительными молекулярными маркерами по ряду признаков разрешающей способности, экономичности, воспроизводимости, следует признать микросателлитные маркеры ДНК. В то же время, при соблюдении определенных требований к протоколу анализа не менее эффективным оказывается RAPD-PCR.

ГЛАВА 4 СЕЗОННАЯ И МЕЖГОДОВАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ НЕРКИ КАМЧАТКИ

4.1. Полиморфизм микросателлитных локусов ДНК в смежных поколениях и подходах нерки р. Большая.

Нерестовая часть популяции нерки р. Большая представлена поколениями трехлеток (1,5%), четырехлеток (13,3%), пятилеток (70,6%), шестилеток (14,1%) и семилеток (0,5%) (Бугаев и др., 2002а). Поэтому с уверенностью можно предположить существование потока генов между смежными поколениями. Однако превалирование в нерестовых подходах одной возрастной группы в отдельные годы может давать заметные колебания частот аллелей в поколениях нерки вследствие дрейфа генов.

Мы провели анализ полиморфизма длин микросателлитных последовательностей ДНК нерки р. Большая в подходах 2003 и 2004 гг., а также в двух смежных поколениях производителей в 2003 г.

Выборки производителей большерецкой нерки из подходов смежных лет оказались близки по оценкам генетического разнообразия ($\bar{H}_e = 0,890$ и $0,893$). Те же тенденции отмечены в поколениях пятилеток (4+) и шестилеток (5+) нерки в 2003 г. ($\bar{H}_e = 0,889$ и $0,890$). Тесты на генную дифференциацию выявили значимые различия в распределении частот аллелей между выборками смежных лет только по одному локусу *One-114*. Различия между подходами смежных лет отсутствовали по частотам генотипов всех исследуемых локусов (табл. 3). Значимых различий между смежными поколениями нерки в частотах аллелей ($p = 0,258$) и генотипов ($p = 0,442$) также не выявлено.

Таким образом, аллельные и генотипические частоты исследуемых локусов в популяции р. Большая устойчивы в межгодовом аспекте, следовательно,

величиной межгодовой изменчивости микросателлитных локусов можно пренебречь, что дает нам основание в популяционных исследованиях азиатской нерки объединять данные, собранные в смежные годы, или использовать сборы за один сезон

Таблица 3 Коэффициенты F_{st} (над чертой) и R_{st} (под чертой), рассчитанные для каждой пары популяций (в верхней правой части таблицы) и уровни значимости различий между группами (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$) по частотам аллелей (над чертой) и генотипов (под чертой) по результатам вероятностного теста (в левой нижней части таблицы)

	р Большая, 2003 г	р Большая, 2004 г	р Озерная, 2003 г
р Большая, 2003 г	-	<u>0 0009</u> (-0 0053)	<u>0 0061</u> (-0 0013)
р Большая, 2004 г	<u>0 112</u> (0 041*)	-	<u>0 0050</u> (-0 0054)
р Озерная, 2003 г	<u>0 000***</u> (0 000***)	<u>0 000***</u> (0 000***)	-

4.2. Сезонная изменчивость микросателлитной ДНК нерки в бассейне р. Камчатка.

Для нерки характерно наличие внутривидовых симпатрических форм, называемых сезонными расами, между которыми в той или иной степени прослеживается временная и биотопическая изоляция в репродуктивный период. Мы изучили биологические и генетические особенности нерки ранней и поздней сезонной расы бассейна р Камчатка

Для ранней нерки, пойманной на нерестилище в оз Азабачье, получены относительно более высокие оценки уровня полиморфизма ($\bar{H}_e = 0,894$, среднее число аллелей на локус $n_a = 16,2$), по сравнению с неркой позднего хода из устья реки ($\bar{H}_e = 0,878$, $n_a = 15,2$). Это обстоятельство не в последнюю очередь объясняется значительно более высокой численностью ранней нерки по сравнению с неркой позднего хода. Достоверных различий по частотам аллелей и генотипов между сезонными расами нерки по сумме всех исследуемых локусов не обнаружено ($p = 0,075$ и $0,085$, соответственно). Уровень попарной межвыборочной дифференциации, оцененный величиной F_{st} , для сезонных рас нерки р Камчатка оказался в 4 раза ниже межпопуляционного значения F_{st} , отмеченного для рек Большая и Озерная ($F_{st} = 0,0015$ и $0,0061$, соответственно).

Полученные нами результаты свидетельствуют об отсутствии строгой изоляции между расами нерки р Камчатка вследствие потока генов между ними. Сроки нерестового хода сезонных рас нерки могут варьировать от года к году, а сдвиги сроков нереста могут наблюдаться в зависимости от численности обеих рас. Опубликованные ранее данные по морфологии, экологии, генетической, половой и возрастной структурам субизолятов свидетельствуют о значительной близости сезонных рас в пределах изолята (Коновалов, 1980). В оз Азабачье обнаружены субизоляты, которые являются как бы переходными формами между весенней и летней расами по многим характеристикам (Коновалов, 1980).

ГЛАВА 5 ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СТАД АЗИАТСКОЙ НЕРКИ

5.1. Размерно-возрастная структура нерки некоторых азиатских стад

Стада нерки разных озерно-речных систем Азии различаются возрастной структурой. Прежде всего, выделяются локальные стада, где явно преобладают рыбы с одним пресноводным годом жизни. Сюда относятся популяции р Большая, р Охота и озерно-речного комплекса Беттобу. Ко второй группе можно отнести локальные стада, где преобладают рыбы, нагуливающиеся в озерах 1-2 года. Это главным образом популяции Чукотки и восточной Камчатки, где условия нагула молоди и формирования численности стад определяются наличием глубоких озер в бассейнах рек. И, наконец, третья группа составляют локальные стада, где большинство особей нагуливаются в озерах 2 года. Сюда относятся две крупнейшие популяции нерки западной Камчатки - оз Курильского (р Озерная) и оз Паланского (р Палана).

Кроме того, нерка разных стад различается размерно-весовыми характеристиками. Согласно нашим наблюдениям, наибольшие длина и масса характерны для нерки р Большая, наименьшие - для нерки р Камчатка, р Охота и Северных Курильских островов.

На основании средних значений длины и массы тела особей в выборках 2003-2005 гг и среднемноголетних частот возрастных классов нерки из разных районов воспроизводства было получено графическое изображение взаимного расположения популяций нерки в пространстве двух координат методом многомерного шкалирования (рис 4).

Из диаграммы, отображающей итоговую конфигурацию сравниваемых выборок, видно, что точки, соответствующие стадам нерки восточной Камчатки

и Чукотки, формируют общий кластер, в то время как точки, соответствующие выборкам из рек западной Камчатки сильно разнесены по обеим осям. Кроме того, выделенные нами в соответствии с доминирующими возрастными классами группы стад нерки азиатского побережья располагаются последовательно вдоль первой оси координат.

В результате снижения размерности данных из 17 исходных признаков было выделено 5 факторов обуславливающих 95% общей дисперсии. Расположение выборок в пространстве двух первых главных компонент также отражает характер их дифференциации (рис 5).

На наш взгляд, дифференциация стад азиатской нерки по биологическим признакам в первую очередь обусловлена действием онтогенетического фактора эпигенетической изменчивости, связанного с различной продолжительностью периодов морского и пресноводного нагула нерки из разных районов воспроизводства.

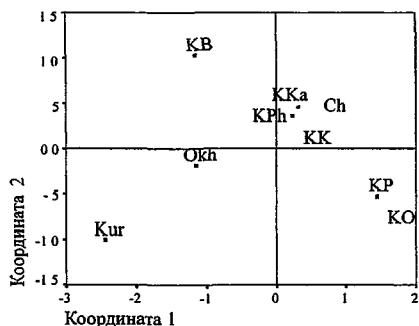


Рис 4 Расположение точек, соответствующих локальным популяциям нерки азиатского побережья в пространстве двух координат в соответствии с геометрическими расстояниями в городских кварталах, многомерное шкалирование

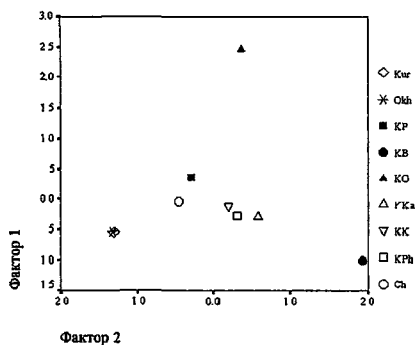


Рис 5 Расположение точек, соответствующих локальным популяциям нерки азиатского побережья в пространстве двух первых главных компонент

Сн - Чукотка, Мейньпильгынская озерно-речная система, оз Ваамочка, КРн - р Пахача, КК - р Камчатка - устье (поздний ход), ККа - бассейн р Камчатка, оз Азабачье (ранний ход), КО - р Озерная, КВ - р Большая, КР - р Палана, Охн - Материковое побережье Охотского моря, р Охота, Кур - Северные Курильские о-ва, о Шумшу, озерно-речной комплекс Бетгобу

5.2. Межпопуляционная генетическая дифференциация азиатской нерки

Оценка генетической гетерогенности азиатской нерки с помощью вероятностного теста, с высокой степенью достоверности ($p < 0.001$) выявила межпопуляционные различия по всем шести микросателлитным локусам. Попарное сравнение выборок по частотам аллелей и генотипов выявило значимые различия между популяциями нерки из разных локальностей ($p < 0.001$). Наибольшие генетические различия были отмечены для северокурильской популяции и популяций северо-востока Камчатки и Чукотки, что объясняется их географической удаленностью. В меньшей степени дифференцированы соседние популяции юго-запада Камчатки (р Озерная и р Большая) и восточного побережья Камчатки (р Камчатка и р Пахача).

Как известно, крупномасштабная генетическая дифференциация у всех видов р *Oncorhynchus* в значительной степени обусловлена историей происхождения и расселения современных популяций лососей, непосредственным образом связанной с ледниковым периодом (Глубоковский, 1995, Алтухов и др., 1997, 2004). В частности, в периоды плейстоценовых оледенений значительные участки ареала нерки были покрыты ледником. Лишь немногочисленные популяции выжили в свободных ото льда рефугиумах. Северный рефугиум, или Беренгия, располагался на Аляске. В Азии позднплейстоценовые оледенения охватывали Камчатку и побережье Охотского моря, воздействию ледников практически не были подвержены реки Сахалина, Приморья и Итурупа. Вследствие изоляции у обитателей различных рефугиумов в ходе адаптивной и нейтральной эволюции формировались свои генетические особенности (Алтухов и др., 1997, 2004). Во время послеледниковой (голоценовой) трансгрессии моря, 10-18 тыс лет назад, сохранившиеся популяции расселились на освобождавшиеся после отступления ледника территории.

По селективно нейтральным локусам среди географически и исторически связанных популяций должны обнаруживаться эффекты изоляции расстоянием, т.е. увеличение степени генетических различий с увеличением географического расстояния между ними (Алтухов и др., 2004). Мы сопоставили матрицы попарных межпопуляционных значений F_{st} и R_{st} с матрицей географических дистанций, составленной по теоретически возможной схеме послеледниковой

расселения нерки из Берингийского рефугиума вдоль чукотского побережья и восточного побережья Камчатки через проливы Курильских островов на западное побережье полуострова, до материкового побережья Охотского моря. Для оценки статистической значимости корреляции генетических и географических дистанций была проведена проверка гипотезы об изоляции расстоянием с помощью Мантель-теста, по результатам которого установлено, что степень межпопуляционного генетического разнообразия у нерки не сопряжена с географической удаленностью популяций.

Чтобы проверить альтернативную гипотезу о параллельном заселении западного и восточного побережий Камчатки мы разделили всю совокупность выборок на две региональные группы: в первую вошли популяции нерки Чукотки, восточной Камчатки и северных Курил, во вторую – популяции нерки западной Камчатки и североохотоморского побережья. В каждой из двух групп проверяли гипотезу об изоляции расстоянием с помощью Мантель-теста. По результатам регрессионного анализа, проведенного отдельно для обеих групп популяций, выявлена значимая корреляция между генетическими и географическими расстояниями, в первом случае их соотношение удовлетворительно аппроксимировалось линейной, во втором – логарифмической зависимостью. Причем по результатам Мантель-теста для популяций побережья Берингова моря и Тихого океана подтверждается изоляция расстоянием ($p < 0.05$). Таким образом, наши результаты свидетельствуют в пользу предположения о параллельном заселении неркой западного и восточного побережий полуострова Камчатка, что согласуется с общепринятыми представлениями об истории формирования современного ареала нерки (Пустовойт, 1993, 1995, 2001).

Генетические связи между популяциями рек Чукотки, Камчатки, северных Курильских островов и материкового побережья Охотского моря представлены на UPGMA-дендрограммах, построенных по дистанциям $\delta\mu^2$ и хордовым расстояниям Кавалли-Сфорса (рис 6).

Анализ полученных дендрограмм свидетельствует о высокой степени дивергенции между популяцией нерки северных Курильских островов с одной стороны и популяциями регионов азиатского побережья, расположенных севернее, с другой. На наш взгляд, генетическая обособленность

северокурильской нерки обусловлена ее более древним происхождением, т к районы к югу от полуострова Камчатка не были подвержены позднеплейстоценовому оледенению, следовательно, могло иметь место заселение северных Курильских островов неркой из южных рефугиумов после отступления ледника В пользу такого сценария свидетельствует тот факт, что Второй Курильский пролив между о Шумшу и о Парамушир образовался гораздо позднее - примерно 8 5 тыс лет назад (Сидоров, 2005)

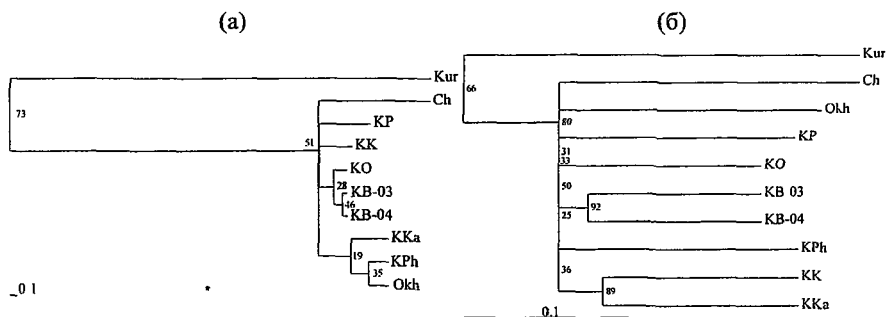


Рис 6 UPGMA-дендрограммы генетического сходства популяций нерки из различных районов воспроизводства, построенная по генетическим дистанциям $\delta\mu^2$ (а) и Кавалли-Сфорса (б)

Обозначения как на рис 4 и 5 (KB-03 - р Большая, 2003 г, KB-04 - р Большая, 2004 г)

Полученные дендрограммы также позволяют предположить, что популяции нерки Чукотки, материкового побережья Охотского моря и Камчатки составляют общую группу В этой группе наименьшие генетические отличия выявлены между выборками смежных лет нерки р Большая и популяциями западной и восточной Камчатки На дендрограмме, построенной по хордовым генетическим расстояниям Кавалли-Сфорса, выборки западной и восточной Камчатки объединяются в отдельные кластеры, в то время как охотская нерка равноудалена как от западно-камчатского, так и от восточно-камчатского сектора дендрограммы Различия между сезонными расами нерки р Камчатка оказались соизмеримыми с межгодовыми различиями большерецкой нерки С другой стороны, на дендрограмме, построенной по дистанциям $\delta\mu^2$, лимнофильная нерка р Камчатка объединяется в общий кластер с западно-камчатскими популяциями, в то время как реофильная азабачинская нерка кластеризуется с реофильной неркой из р Пахача Нерка материкового

побережья Охотского моря оказалась в одной группе с восточно-камчатскими выборками

На основе матрицы генетических расстояний $\delta\mu^2$ проведена кластеризация популяций методом многомерного шкалирования (рис 7) Диаграмма многомерного шкалирования исследуемых выборок нерки также отражает характер их дифференциации Так, наиболее территориально удаленные популяции Чукотки и северных Курил оказались максимально разнесены вдоль первой оси координат Проекция кластеров выборок западной и восточной Камчатки на первую ось координат существенно перекрываются, что согласуется с предположением о параллельной колонизации неркой восточного и западного побережий полуострова Выборка нерки р Охота расположена ближе к восточно-камчатскому кластеру

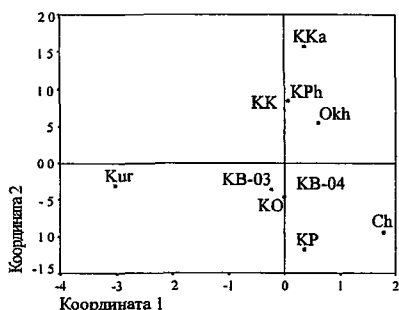


Рис 7 Диаграмма многомерного шкалирования исследуемых выборок нерки

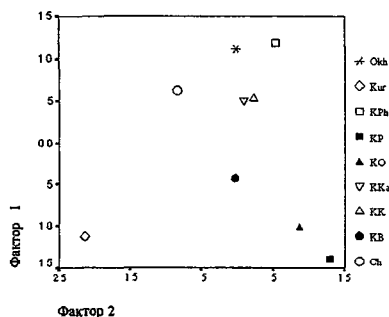


Рис 8 Расположение локальных популяций нерки азиатского побережья в пространстве двух первых главных компонент

Обозначения как на рис 4 и 5 (KB-03 - р Большая, 2003 г, KB-04 - р Большая, 2004 г)

Для снижения размерности генетических данных проведен анализ главных компонент, результаты которого представлены на рисунке 8 По итогам факторного анализа из 145 переменных выделено 8 факторов обуславливающих в сумме около 100% общей дисперсии В пространстве двух первых главных компонент выборки также объединились по региональному принципу

Мы использовали биологические характеристики нерки разных районов воспроизводства для коррекции результатов генетического анализа, для чего объединили первые три главные компоненты, объясняющие 50% общей

дисперсии генетических признаков, и первые два фактора, обуславливающие 64% изменчивости биологических характеристик нерки из разных популяционных систем Азии. На основании объединенных данных были рассчитаны попарные геометрические дистанции "в городских кварталах". Матрица дистанций была представлена в виде трехмерного графического изображения взаимного расположения выборок в трех координатных плоскостях (рис 9). Следует отметить, что исходный принцип кластеризации выборок сохранился, однако, популяция р Большая дистанцировалась от двух других западно-камчатских популяций. Таким образом, биологические данные существенно дополняют результаты генетического анализа, что позволяет дифференцировать стада нерки с большей точностью.

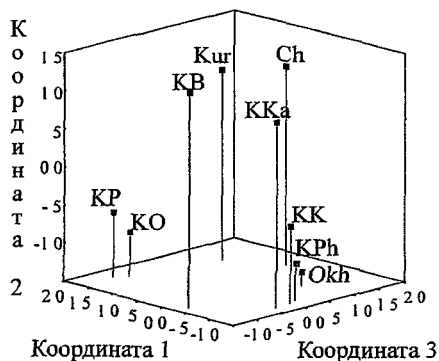


Рис 9 Трехмерная диаграмма многомерного шкалирования исследуемых выборок нерки по биологическим и генетическим данным

Обозначения как на рис 4 и 5

Для определения эффективности индивидуальной идентификации методом анализа полиморфизма микросателлитной ДНК был проведен тест на принадлежность к популяции (Paetkau et al, 1995, Hansen et al, 2001). По результатам симуляционного анализа (тестирование выборок, на 100% состоящих из особей одной популяции) определена разрешающая способность реперной базы генетических данных, включающей аллельные частоты по 6 микросателлитным локусам. В среднем доля особей, принадлежность которых была определена верно, составила 73,1%. Максимальная точность определения популяционной принадлежности зафиксирована для популяции северных

Курильских островов (94%), минимальная - для нерки рек юго-западного побережья Камчатки (60% для р Озерная и 61% для р Большая) Точность метода может быть улучшена посредством вовлечения большего количества высокополиморфных локусов в анализ, что мы планируем сделать на последующих этапах исследования

ВЫВОДЫ

- 1 Последледниковое расселение азиатской нерки послужило основой ее пространственной генетической дифференциации Вероятной причиной генетической дивергенции северокурильской нерки и нерки других исследованных нами популяций явилось заселение водоемов северных Курильских островов неркой из южных рефугиумов, расположенных к югу от п-ва Камчатка Водоемы Чукотки, Камчатки и материкового побережья Охотского моря колонизировались неркой из северного рефугиума - Берингии
- 2 Дифференциация стад азиатской нерки по биологическим характеристикам в первую очередь определяется эпигенетической изменчивостью пластических признаков
- 3 Межпопуляционные различия нерки рек Большая и Озерная, определяемые по частотам аллелей микросателлитных локусов, соответственно в 7 и 15 раз превышают межгодовые различия и различия между поколениями нерки р Большая Строгой изоляции между сезонными расами нерки р Камчатка не выявлено, а уровень попарной межвыборочной дифференциации для сезонных рас нерки бассейна р Камчатка оказался в 4 раза ниже наименьшего межпопуляционного значения. Различий по частотам генотипов между выборками смежных лет, поколениями и сезонными расами азиатской нерки также не выявлено

Полученные результаты дают нам основание объединять выборки, собранные в разные годы и в различные сроки в пределах нерестового хода, а также использовать в популяционно-генетических исследованиях азиатской нерки пробы, собранные одновременно


- 4 Для дифференциации популяций азиатской нерки наиболее перспективными представляются микросателлитные ДНК-маркеры При проведении параллельных исследований в различных лабораториях наиболее предпочтительными являются SNP-маркеры благодаря их высокой

- воспроизводимости Для определения популяционной принадлежности особей наиболее эффективными являются RAPD-маркеры при соблюдении определенных требований к протоколу анализа
- 5 Высокая разрешающая способность микросателлитных маркеров ДНК, относительная экономичность этого метода и воспроизводимость в различных лабораториях позволяет рекомендовать его для изучения популяционной структуры нерки
 - 6 Использование микросателлитных маркеров ДНК позволяет с высокой точностью определять принадлежность нерки, облавливаемой в период преднерестовых миграций у тихоокеанского побережья Камчатки к популяциям различных районов воспроизводства
 - 7 Предложенный комплексный подход в популяционных исследованиях азиатской нерки позволяет корректировать результаты молекулярно-генетического анализа с учетом биологических характеристик популяций

Список работ опубликованных по теме диссертации.

- 1 Хрусталева А М, Зеленина Д А, Волков А А 2004 Молекулярно-генетический анализ популяционной структуры нерки западной Камчатки // Инновации в науке и образовании - 2004 Тезисы докладов Международной научной конференции посвященной 10-летию КГТУ Калининград КГТУ Октябрь 2004 С 20
- 2 Хрусталева А М, Федотов Ю В, Волков А А, Зеленина Д А 2004 Программное обеспечение для анализа данных ДНК-фингерпринтинга в популяционно-генетических исследованиях рыб // Инновации в науке и образовании - 2004 Тезисы докладов Международной научной конференции посвященной 10-летию КГТУ Калининград КГТУ Октябрь 2004 С 19
- 3 Zelenina D, Khrustaleva A, Volkov A, Habicht C, Smith C, Seeb J 2005 A Case Study of Two Genetic Markers for Inter-Laboratory Collaboration SNPs Provide Transportability without Standardization NPAFC Doc 913 14 p
- 4 Зеленина Д А, Хрусталева А М, Волков А А 2006 Сравнительное исследование популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka*) Западной Камчатки с помощью RAPD-PCR и анализа полиморфизма микросателлитных локусов // Генетика Т 42 № 5 С 693-704
- 5 Хрусталева А М, Стоклицкая Д С 2006 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 24-28 апреля 2006 г ИЭРиЖ УрО РАН - Екатеринбург Изд-во "Академкнига" С 254-265

- 6 Zelenina D, Khrustaleva A, Muge V, Stoklitskaya D, Muge N 2006 Population Genetics of Russian Sockeye Salmon Assessed by Single Nucleotide Polymorphism // SNP WORKSHOP II Applications of SNP Genotyping in Fisheries Management Girdwood, Alaska September 21 –22 P 39
- 7 Барминцев В А., Барминцева А Е, Волков А А, Зеленина Д А, Мюге Н С, Хрусталева А М 2006 Российская национальная коллекция эталонных генетических материалов (РНКЭГМ) Часть II "Лососевые рыбы (Salmonidae)" Свидетельство об официальной регистрации базы данных
- 8 Khrustaleva A M, Volkov A A, Zelenina D A 2006 Study of the population structure of Asian sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) using microsatellite polymorphism analysis // PICES 15th Annual Meeting Yokohama, Japan, Oct 13-22, 2006 P 142
- 9 Хрусталева А М, Стоклицкая Д С, Зеленина Д А 2006 Изменчивость аллельных частот микросателлитных локусов ДНК в смежных поколениях и подходах нерки *Oncorhynchus nerka* р Большая (Западная Камчатка) // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей Материалы VII международной научной конференции, посвященной 25-летию организации Камч отд Института биологии моря Петропавловск-Камчатский Издательство "Камчатпресс" 2006. С 165-168
- 10 Хрусталева А М, Волков А А 2007 Исследование популяционной структуры азиатской нерки (*Oncorhynchus nerka*) с помощью анализа полиморфизма микросателлитной ДНК // Перспектива-2007 Материалы Международного конгресса студентов, аспирантов и молодых ученых Т IV Нальчик Каб -Балк Ун-т КБГУ 2007 С 71-73
- 11 Khrustaleva A M 2007 Application of microsatellite analysis to the study of the population structure and population assignment of Asian sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) // Early Career Scientists Conference New Frontiers in Marine Science June 26-29, 2007, Baltimore, MD, U S A P 19-20
- 12 Хрусталева А М, Волков А А, Мюге В Н, Зеленина Д А 2007 Молекулярно-генетические маркеры в изучении популяционной структуры и определении популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka*) западной Камчатки // "Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов" Материалы 2-ой научной конференции с участием стран СНГ Петропавловск КарНЦ РАН 11-14 сентября 2007 С 164


 18 09 07