

УДК 597.553.2.575.17

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ РАЗМЕРНО-ВОЗРАСТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ НЕРКИ *ONCORHYNCHUS NERKA* ЗАПАДНОГО ПОБЕРЕЖЬЯ КАМЧАТКИ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ЛОКАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

© 2010 г. А. М. Хрусталева

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии — ВНИРО, Москва
E-mail: mailfed@mail.ru

Поступила в редакцию 03.03.2009 г.

Проведено исследование варибельности размерно-возрастных показателей и полиморфизма 6 микросателлитных локусов, 5 локусов SNP и случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) нерки *Oncorhynchus nerka* трёх крупнейших популяций западного побережья п-ова Камчатка. Проанализирована эффективность использования различных типов маркёров для дифференциации популяций и определения популяционной принадлежности нерки озёрно-речных систем западной Камчатки. Значимые межпопуляционные различия выявлены как по частотам аллелей генетических маркёров, так и по ряду биологических показателей. Доказано, что генетические маркёры характеризуются лучшей дифференцирующей способностью по сравнению с биологическими характеристиками. Наиболее удовлетворительные результаты при определении популяционной принадлежности нерки получены с использованием объединённой базы данных аллельных частот микросателлитных и SNP локусов.

Ключевые слова: нерка, размерно-возрастные показатели, генетические маркёры, SNP, микросателлиты, RAPD-PCR.

Существующие на сегодняшний день методы дифференциации стад тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* условно можно разделить на две группы: классические ихтиологические и генетические. Первые в качестве критериев популяционной принадлежности чаще всего рассматривают морфологические признаки, такие как особенности строения регистрирующих структур, краниологические, морфометрические и размерно-возрастные характеристики, модификационная изменчивость которых во многих случаях ставит под сомнение правомерность выделения морфологически различающихся совокупностей рыб в качестве репродуктивно изолированных группировок (Алтухов, 1974). Однако интерес к анализу морфологических признаков, с целью изучения популяционной структуры тихоокеанских лососей, в значительной степени сохраняется и до настоящего времени, что связано, в первую очередь, с экономичностью метода и возможностью в кратчайший срок получить сравнительно большой объём информации с помощью серии несложных измерений (Бобырев, 2002).

Среди генетических методов дифференциации в последние два десятилетия на первый план вышли молекулярно-генетические. Выбор молекулярных маркёров в популяционной генетике в первую очередь определяется целью исследова-

ния, а также возможностью сопоставления полученных результатов с данными других лабораторий и материальными и временными затратами на разработку и использование данного типа полиморфизма ДНК (Хлесткина, Салина, 2006). Более того, одним из ключевых этапов создания методики индивидуальной идентификации лососей в смешанных морских уловах является выбор информативных критериев, позволяющих с высокой степенью достоверности дискриминировать локальные популяции. В популяционно- и эколого-генетических исследованиях рыб наиболее широкое применение нашли такие молекулярные подходы, как ДНК-фингерпринтинг, анализ варибельности микросателлитных локусов и анализ единичного нуклеотидного полиморфизма (SNP — Single Nucleotide Polymorphism). Каждый тип маркёров имеет как преимущества, так и недостатки. Так, например, геномный фингерпринтинг применяется чаще всего при исследовании видов, геном которых практически не изучен, так как не требует априорной информации о последовательности ДНК (Хлесткина, Салина, 2006). С другой стороны, один из вариантов ДНК-фингерпринтинга — анализ случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD-PCR — Random Amplified Polymorphic DNA) — характеризуется низкой воспроизводимостью. Од-

нако и он может быть использован для экспресс оценок генетической изменчивости и определения индивидуальной принадлежности в рамках одной лаборатории. В свою очередь, анализ полиморфизма микросателлитных локусов сопряжён с рядом технических трудностей, связанных, например, с определением аллельных вариантов. Проблемы выбора адекватной математической модели и интерпретации результатов микросателлитного анализа в основном обусловлены сложным мутационным поведением локусов, гомоплазией и нуль-аллелями различного происхождения. С другой стороны, микросателлиты, локализованные в основном в некодирующих областях генома, принято считать нейтральными маркёрами, тогда как в случае с SNP их нейтральность нужно проверять для каждого отдельного локуса, учитывая то, что многие SNP были разработаны при работе со структурными генами или при анализе EST-последовательностей. И, наконец, для микросателлитов характерна большая частота мутаций, оцениваемая как 10^{-2} – 10^{-4} , по сравнению с 10^{-8} – 10^{-9} для SNP, поэтому последние чаще используются для изучения популяций с более длительным временем дивергенции.

Цель данной работы – оценка эффективности использования различных типов морфологических и генетических маркёров, различающихся уровнем изменчивости и скоростью мутирования, для дифференциации популяций и определения популяционной принадлежности нерки *O. nerka* рек западной Камчатки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал собирали в июле–августе 2003 г. в нижнем течении рек Большая, Озерная и Палана западного побережья Камчатки; карта районов сбора материала представлена в работе Зелениной с соавторами (2006). Контрольный лов производителей нерки в р. Палана осуществляли жаберными сетями размером 2×10 м с ячейёй 40 и 65 мм, установленными на течении, на расстоянии 3 км от устья реки. Отлов проводили в период рунного хода (7–15 июля) и второй половины массового хода нерки (16–25 июля). Производителей нерки р. Большая отлавливали речным закидным неводом размером 180×8 м с ячейёй 50 мм на расстоянии 5–6 км от устья в течение первой половины массового хода летней нерки в реку (23–30 июля). Лов производителей нерки в р. Озерная осуществляли речным закидным неводом размером 220×12 м с ячейёй 30 мм на расстоянии 2 км от устья во второй половине массового хода (4–7 августа). Биоанализ производителей включал определение пола особей, стадии зрелости гонад, массы рыбы, массы порки, массы гонад, абсолютной длины рыбы (*TL*), длины по Смитту (*AC*), стандартной длины (*SL*). Образцы

ткани печени и гонад для анализа ДНК фиксировали 96%-ным этанолом.

Обработку данных биоанализа, подготовку чешуйных препаратов и определение возраста рыб проводили в лаборатории экологии рыб ВНИРО. Возраст производителей определяли, руководствуясь методическими пособиями Правдина (1966), Чугуновой (1959) и данными Бугаева (1995) для сравнения и уточнения оценки возраста разными операторами. Возраст рыб обозначали двумя цифрами, первая из которых – число лет, проведённых в пресноводных водоёмах, вторая – число лет, проведённых в море. Статистическая обработка данных биоанализа проведена с помощью программ SPSS 10.0 и MS Excel. Для сравнения выборок применяли *t*-критерий Стьюдента. Для классификации выборок использовали дискриминантный анализ и критерий отношения правдоподобия (байесовский классификатор) (Айвазян и др., 1989). Для оценки успеха дискриминации выборки произвольным образом делили на 2 части: большую ($n = 150$) использовали в качестве обучающей выборки, меньшую ($n = 50$) – в качестве контрольной.

Молекулярно-генетический анализ образцов ткани нерки проводили в секторе молекулярной генетики гидробионтов ВНИРО описанным ранее способом (Хрусталева, Зеленина, 2008). Сравнительное исследование популяционной структуры нерки западной Камчатки (реки Озерная, Большая и Палана) проведено с использованием трёх типов молекулярных маркёров. Изучен полиморфизм 6 микросателлитных локусов (*One-108*, *One-109*, *One-111*, *One-114*, *OtsG253b* и *OMM-1082*), для анализа привлечены также опубликованные ранее данные по 5 SNP локусам (*Mhc_109*, *Mhc_190*, *Mhc_251*, *One-Prl_2* и *CytB_26*) и варибельности случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD-PCR), исследованной с помощью полимеразной цепной реакции со стандартным 10-нуклеотидным праймером *OPA-02* (общее число ДНК-фрагментов в RAPD-спектрах нерки – 71, в индивидуальных электрофореграммах – от 14 до 41) (табл. 1).

Основные генетические показатели популяций по результатам SNP анализа были получены с использованием аллельных частот, приведённых в работе Гриценко с соавторами (2007). Частоты аллелей микросателлитных локусов 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 (Raymond, Rousset, 1995). 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 (Dieringer, Schlotterer, 2002).

Таблица 1. Материал, использованный в работе

Анализ	Размер выборки, экз.			Источник информации
	р. Большая	р. Озерная	р. Палана	
Биоанализ, определение возраста	200	200	200	Хрусталева, 2007
Анализ полиморфизма микросателлитной ДНК	100	100	100	Хрусталева, 2007; неопубликованные данные
SNP	50	50	50	Гриценко и др., 2007
RAPD-PCR	50	50	50	Зеленина и др., 2006

Таблица 2. Возрастная структура (%) нерки *Oncorhynchus nerka* из обследованных рек западной Камчатки

Выборка	Возрастной класс, лет								
	0.3	1.2	1.3	1.4	2.2	2.3	2.4	3.2	3.3
Р. Большая	$\frac{3.3}{1.6}$	$\frac{1.7}{6.5}$	$\frac{68.3}{54.8}$	$\frac{8.3}{1.6}$	$\frac{1.7}{1.6}$	$\frac{13.3}{33.9}$	$\frac{3.3}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$
	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{1.4}$	$\frac{5.6}{4.3}$	$\frac{1.6}{-}$	$\frac{21.6}{20}$	$\frac{64.8}{71.4}$	$\frac{6.4}{1.4}$	$\frac{-}{1.4}$	$\frac{-}{-}$
Р. Озерная	$\frac{-}{-}$	$\frac{1.8}{1.1}$	$\frac{3.6}{4.4}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{7.3}{7.7}$	$\frac{83.7}{82.2}$	$\frac{-}{1.1}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{3.6}{3.3}$
	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$

Примечание. Над чертой – самки, под чертой – самцы.

Расчёт генетических дистанций Неи (Nei, 1972) и построение дендрограмм методом UPGMA – с помощью программ Populations 1.2.30 и TreeView 1.6.6 (Page, 1996). Оценки межпопуляционной дифференциации аллельных частот – $F_{st}(\theta_{st})$ – и аналогичные оценки, основанные на корреляции с длинами аллелей микросателлитных локусов – $R_{st}(\rho_{st})$ – рассчитывали с помощью программы GENEPOP 3.4 (Raymond, Rousset, 1995). Тест на принадлежность к популяции (Paetkau et al., 1995; Hansen et al., 2001) проводили в программе Arlequin 2.0 (Schneider et al., 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические показатели нерки рек западного побережья Камчатки

Возраст производителей нерки рек западной Камчатки в 2003 г. варьировал от 3 до 7 лет. Исследование возрастной структуры западнокамчатских популяций показало, что большинство особей из рек Большая, Озерная и Палана проводят в море 3 года. В то же время, продолжительность пресноводного периода у нерки из разных водоёмов воспроизводства различается: наибольшая она у нерки рек Озерная и Палана, нагуливающейся до ската в море в озёрах Курильское и Па-

ланское, наименьшая – у нерки р. Большая. Анализ возрастного состава производителей нерки западного побережья Камчатки в 2003 г. свидетельствует также о том, что в среднем продолжительность жизни самок больше, чем самцов. В то же время самцы относительно большее время проводят в реке и меньше – в море (табл. 2).

Анализ возрастной структуры производителей нерки р. Большая в 2003 г. показал, что доминирующей по численности (62%) возрастной группой были рыбы возрастом 1.3. Особи, прожившие в пресной воде 2 года, составляли менее 27% (табл. 2). Относительно многочисленным среди самцов был возрастной класс 2.3. В то же время среди самок встречались рыбы возрастом 2.4, которых не было среди самцов. 2.5% производителей скатились сеголетками и имели возраст 0.3.

Бугаев (1995) в р. Большая выделяет нерку раннего (май–июнь) и позднего (июль–август) хода. Сезонные расы в бассейне р. Большая различаются по возрастному составу (так, доля рыб возраста 2.3 выше у ранней нерки), соотношению численности самцов и самок в уловах (доля самок выше у нерки позднего хода), а также средними размерами производителей (поздняя нерка крупнее) (Бугаев и др., 2002б). Поскольку мы ловили нерку в конце июля, можно предположить, что нерка из

наших проб относится к поздней сезонной расе. Согласно опубликованным данным (Бугаев, 1995; Бугаев и др., 2002б), половозрелые особи нерки р. Большая в основном имеют возраст 1.3, реже встречаются рыбы возраста 2.3. Доминирование в подходах нерки особей в возрасте 1.3 обусловлено отсутствием в бассейне р. Большая крупных озёр с богатой кормовой базой. Оз. Начикинское, расположенное в верховьях р. Плотникова, не используется молодь нерки из притоков р. Большая для нагула, что, вероятно, связано как со значительной протяжённостью р. Плотникова, так и с большими скоростями течения в ней (Бугаев и др., 2002б). В оз. Толмачёва из-за водопадов на р. Толмачёва, вытекающей из озера, проходная нерка отсутствует (Бугаев и др., 2002б). Вследствие этого молодь речных локальных группировок нерки р. Большая скатывается преимущественно в возрасте одного года, а нередко – сеголетками.

Нерка р. Озерная (озерновская, или курильская нерка) характеризуется длительным периодом жизни в пресных водах – от 1 до 3 лет. Основная часть молоди нагуливается в оз. Курильское 2 года (табл. 2). Так, в 2003 г. 91% самцов и 93% самок нерки р. Озерная имели речной возраст 2+. Эти производители в основном были представлены возрастными группами 2.2, 2.3, 2.4. Доля рыб, проживших в озере до ската 1 год, составляла в уловах 2003 г. 7%. Воспроизводство нерки р. Озерная практически полностью осуществляется в бассейне оз. Курильское, которое является нерестово-нагульным водоёмом крупнейшего на азиатском материке стада нерки (Остроумов, 1970; Бугаев, 1976; Бугаев, Дубынин, 2002). В отличие от стада р. Большая, в нерестовом ходе нерки р. Озерная по срокам нереста не прослеживается наличие двух сезонных рас (Егорова, 1970; Крогиус, 1983). Наши результаты изучения возрастной структуры производителей нерки р. Озерная соответствуют данным литературы, согласно которым из оз. Курильское молодь нерки скатывается в основном в возрасте 2 лет; небольшую долю (в среднем 9.1%) составляют 3-годовики, в отдельные годы часть молоди скатывается в возрасте годовиков (Селифонов, 1970; Городовская, 2002). Высокая доля покотников-годовиков (более 20%) в оз. Курильское отмечалась лишь в 1984 и 1985 г., когда продуктивность озера была наибольшей вследствие извержения в 1984 г. вулкана Алаид и искусственной фертилизации озера в 1985 г. (Городовская, 2002). В 2003 г. в уловах встречались особи в возрасте 3.1 и 3.2, составлявшие 2% общей численности выборки. По данным Городовской (2002), доля в подходах рыб, скатившихся в 3-годовалом возрасте, в период с 1979 по 1997 г. варьировала в пределах 1.59–14.45%. Основная же масса производителей имеет возраст 2.3 и 2.2 (Бугаев, 1995).

Анализ возрастной структуры стада нерки р. Палана (паланская нерка) в 2003 г. показал, что подавляющая доля покотников (91%) скатывается из оз. Паланское в возрасте 2 лет (табл. 2). Большинство рыб нагуливаются в море в течение 3 лет, поэтому 83% производителей нерки р. Палана имеют возраст 2.3. В уловах встречались и рыбы возрастом 3.3, не встречавшиеся в уловах в других обследованных нами реках западного побережья Камчатки.

В бассейне р. Палана воспроизводится стадо нерки, занимающее 4-е место по численности данного вида в Азии (Бугаев и др., 2002а). Воспроизводство и нагул молоди нерки этого стада до ската в море сосредоточены практически полностью в оз. Паланское. Сезонные расы у нерки р. Палана не обнаружены. По результатам наблюдений, проведённых Бугаевым с соавторами (2002а) в 1990–2001 гг., около 90% половозрелой нерки р. Палана имели речной возраст 2+ и 3+. По мнению авторов, столь высокая в подходах доля рыб, скатившихся из озера в возрасте двух лет и старше, обусловлена, в первую очередь, хорошей кормовой базой оз. Паланское. Кроме того, Палана – самая северная из обследованных нами рек. Весна здесь наступает поздно, а вегетационный сезон не продолжителен. Возможно, это также является одной из причин большей продолжительности пресноводного нагула молоди по сравнению с неркой, воспроизводящейся в водоёмах, расположенных южнее.

Руководствуясь правилом Байеса и полагая априорные вероятности гипотез о принадлежности к каждой из трёх популяций равными, выборки западнокамчатской нерки классифицировали с использованием данных о частотах возрастных классов в каждой из популяций. Доля верных определений в среднем составила 59.7%, а в выборке р. Озерная не превысила 30%. Таким образом, попытка дискриминации выборок с использованием в качестве критерия классификации возрастной структуры исследуемых популяций не дала удовлетворительных результатов.

Согласно данным, имеющимся в литературе (Бугаев, 1995; Бугаев, Дубынин, 2002; Бугаев и др., 2002а, 2002б), и нашим наблюдениям, проведённым в 2003 г., нерка рек западного побережья Камчатки различается по ряду биологических показателей: длине, массе, возрастной структуре. Самой крупной является нерка р. Большая ($AC = 63.61 \pm 0.37$ см, масса – 3227.2 ± 54.8 г), несколько мельче паланская нерка (62.14 ± 0.26 см и 2848.1 ± 35.3 г), наиболее мелкая – озерновская (60.52 ± 0.31 см и 2750.4 ± 42.5 г). Эти различия могут быть обусловлены рядом причин: географической широтой расположения реки, длиной реки, числом лет, проведённых рыбами в море, локализацией района нагула в море, численностью лососей разных видов, нагуливающих совместно на

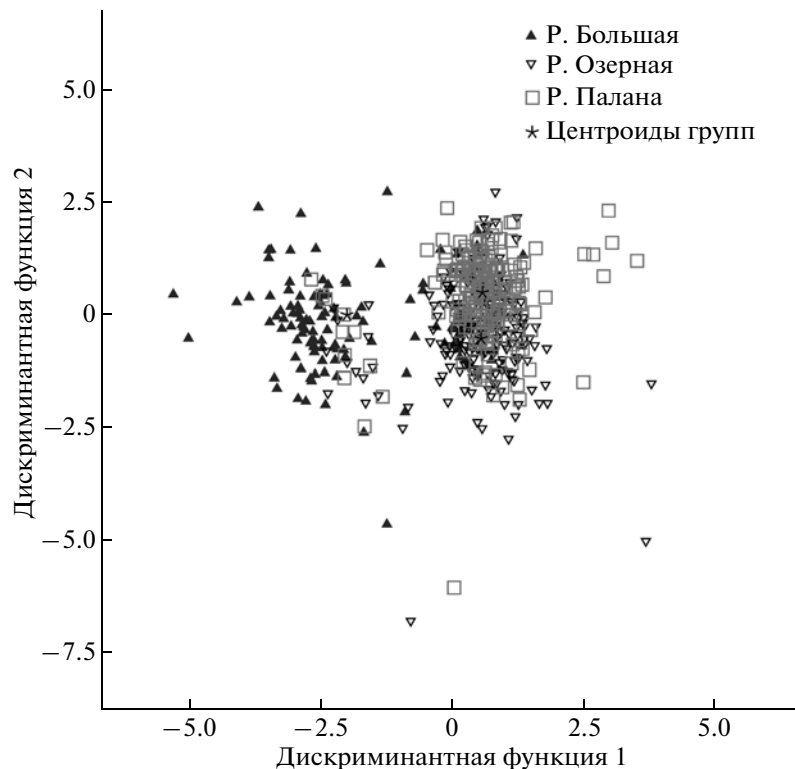


Рис. 1. Расположение выборок нерки *Oncorhynchus nerka* рек Большая, Озерная, Палана в пространстве двух канонических дискриминантных функций. Центроиды групп – значения дискриминантной функции, получаемые при подстановке в дискриминантное уравнение средних значений идентификационных признаков в каждой выборке.

одной акватории. Кроме того, различия могут быть связаны также с разным временем поимки в пределах периода нерестового хода, соотношением численности самцов и самок в выборках и др. Например, для нерки р. Озерная в течение нерестового хода наблюдается увеличение размеров и массы тела особей (Бугаев, 1995). Обращает на себя внимание также тот факт, что различия в размерах у самок выражены гораздо меньше, чем у самцов. Например, самцы из р. Палана крупнее самцов озерновской нерки, тогда как самки, напротив, имеют меньшую массу по сравнению с самками р. Озерная (Хрусталева, 2007).

Сравнение выборок по 6 критериям (длина тела (АС), масса тела, масса порки, продолжительность пресноводного (речной возраст) и морского нагула (морской возраст) и полный возраст) выявило статистически значимые различия ($p < 0.05$) между выборками по АС и общей продолжительности жизни особей всех трёх популяций, а также по массе (тела и порки) и средней продолжительности речного и морского периодов жизни между выборкой р. Большая, с одной стороны, и выборками рек Озерная и Палана – с другой. Вышеперечисленные особенности нерки рек западного побережья Камчатки свидетельствуют о возможности использования таких морфобиологических характеристик, как

средние длина, масса, полный возраст, речной и морской возраст производителей, в качестве биологических маркёров при определении популяционной принадлежности особей.

Классификация выборок рек Большая, Озерная и Палана по выбранным критериям была проведена с использованием дискриминантного анализа (метод принудительного включения всех переменных). Наибольший вклад в дискриминацию выборок обеспечивали длина тела, масса порки и речной возраст производителей (максимальные значения нормированных коэффициентов дискриминантных функций). В пространстве двух канонических дискриминантных функций кластеры трёх популяций нерки в значительной степени перекрываются, при этом лишь первая функция удовлетворительно дискриминирует нерку р. Большая и рек Озерная и Палана (рис. 1). Это в первую очередь связано с тем, что в каждой из трёх выборок имеются одинаковые возрастные классы, а размерные и возрастные характеристики рыб коррелируют между собой. Так, в большинстве популяций нерки существуют морфотипы, различающиеся в зависимости от длительности периода морского нагула, размерами тела, морфофизиологическими особенностями, экологией, а также этологией нереста (Коновалов, 1980; Глубоковский, 1995). Морфологические различия

Таблица 3. Результаты классификации выборок нерки *Oncorhynchus nerka* по морфобиологическим маркерам

Анализ	Объём выборок, экз.		Группа	Предсказанная принадлежность к группе, %			Доля верных определений, %
	обучающая	контрольная		р. Большая	р. Озерная	р. Палана	
Классификация обучающих выборок	150	—	р. Большая	75.6	15.9	8.5	70.9
	150	—	р. Озерная	5.4	66.7	27.9	
	150	—	р. Палана	4.7	22.8	72.5	
Кросс-проверка	149	1	р. Большая	73.2	15.9	11.0	69.3
	149	1	р. Озерная	6.1	64.6	29.3	
	149	1	р. Палана	4.7	23.5	71.8	
Классификация контрольных выборок	150	50	р. Большая	67.5	20.0	12.5	56.0
	150	50	р. Озерная	8.0	48.0	44.0	
	150	50	р. Палана	7.8	37.3	54.9	

между ними весьма существенны и зачастую по масштабу превышают величину различий между отдельными локальными популяциями нерки. Формирование дискретно различающихся морфотипов в первую очередь обусловлено одновременным половым созреванием особей нерки после одного, двух или трёх лет морского нагула в связи с действием различных биотических и абиотических факторов на разных этапах жизненного цикла особи (Burgner, 1987; Глубоковский, 1995).

По результатам дискриминантного анализа были получены соответствующие функции классификации, позволяющие дифференцировать выборки производителей нерки западного побережья Камчатки. С их помощью была выполнена классификация особей каждой из исследуемых выборок (классификация обучающих выборок), кросс-проверка выборок (каждое наблюдение классифицируется функциями, полученными по всем наблюдениям, кроме него самого) и классификация контрольных выборок ($n = 50$), содержащих экземпляры, не использованные для оценки дискриминантных функций (табл. 3). Относительно малая эффективность разделения популяций говорит о том, что выбранных восьми основных биологических характеристик не достаточно для дифференциации популяций нерки западной Камчатки.

Таким образом, стандартная процедура биоанализа не даёт нам необходимого числа независимых классификационных признаков, поскольку все использованные нами показатели характеризуются низкой межпопуляционной вариабельностью и в той или иной степени коррелируют с длиной тела по Смитту и массой тела. Однако не исключено, что привлечение дополнительных меристических и пластических признаков позво-

лит дифференцировать отдельные локальные стада нерки западной Камчатки с большей достоверностью.

Генетическая изменчивость в популяциях нерки западной Камчатки

Все исследованные микросателлитные локусы в выборках западнокамчатской нерки были высокополиморфны. Число аллелей в локусах варьировало от 10 до 30 (в среднем 17.5) (табл. 4). Наблюдаемое число аллелей в локусах *OtsG253b*, *One-108*, *One-109* и *One-114* во всех выборках соответствовало ожидаемому числу аллелей согласно модели пошаговых мутаций (Stepwise Mutation Model – SMM), тогда как для описания мутационного процесса в локусах *One-111* и *OMM-1082* больше подходит модель бесконечного числа аллелей (Infinite Alleles Model – IAM). Поскольку последняя применима и для SNP-локусов, в дальнейшем мы будем использовать в основном статистику, основанную на анализе вариантов аллельных частот (IAM-модель). Величина ожидаемой гетерозиготности изменялась в пределах 0.82–0.95. Наиболее полиморфной оказалась нерка р. Озерная, наименее полиморфной – нерка р. Палана ($H_e = 0.896$ и 0.877 , среднее число аллелей на локус 19.2 и 15.7, соответственно), для популяции р. Большая средняя ожидаемая гетерозиготность и среднее число аллелей на локус составили соответственно 0.890 и 17.7. В основном в выборках наблюдаемая гетерозиготность не превышала ожидаемую, а по 5 исследованным локусам в популяциях наблюдалось равновесие Харди–Вайнберга. Сравнение фактических и ожидаемых генотипических распределений выявило статистически значимый дефицит гетерозигот по локусу *One-114* в выборках рек Озерная и Палана.

Таблица 4. Характеристики исследованных 6 микросателлитных и 4 SNP локусов нерки *Oncorhynchus nerka* из обследованных рек западной Камчатки

Выборка	Локус	Размер аллелей, п. н.	n_{rep}	Число аллелей	Ожидаемое число аллелей		H_o	H_e	p	F_{is}
					SMM	IAM				
Р. Большая	<i>OMM-1082</i>	198–298	62.2	20	12.1	27	0.863	0.901	0.571	0.04
	<i>One-108</i>	180–236	52.1	15	10.4	24.1	0.871	0.881	0.129	0.01
	<i>One-109</i>	124–180	37.4	12	10.3	23.8	0.857	0.880	0.657	0.02
	<i>One-111</i>	186–318	59.1	22	11.3	25.9	0.928	0.893	0.239	–0.04
	<i>One-114</i>	192–292	61.4	26	18.6	39.4	0.919	0.940	0.083	0.02
	<i>OtsG253b</i>	126–166	36.4	11	8.5	19.4	0.780	0.846	0.658	0.08
	<i>Mhc_251</i>	–	–	2	–	–	0.531	0.444	0.205	–0.20
	<i>Mhc_190</i>	–	–	2	–	–	0.224	0.502	0.0003	0.55
	<i>Mhc_109</i>	–	–	2	–	–	0.420	0.379	0.701	–0.12
	<i>Prl_2</i>	–	–	2	–	–	0.460	0.432	0.750	–0.07
Р. Озерная	<i>OMM-1082</i>	202–294	62.3	20	12	26.2	0.836	0.901	0.105	0.07
	<i>One-108</i>	180–236	52.6	15	13.1	29.9	0.852	0.910	0.209	0.06
	<i>One-109</i>	124–176	37.6	14	11.1	25.3	0.855	0.890	0.135	0.04
	<i>One-111</i>	194–318	60.2	27	12	26	0.875	0.900	0.602	0.02
	<i>One-114</i>	200–316	61.6	28	22.9	46.1	0.852	0.952	0.0000	0.10
	<i>OtsG253b</i>	118–162	35.7	11	7.7	16.9	0.747	0.824	0.186	0.09
	<i>Mhc_251</i>	–	–	2	–	–	0.563	0.495	0.389	–0.14
	<i>Mhc_190</i>	–	–	2	–	–	0.383	0.439	0.496	0.12
	<i>Mhc_109</i>	–	–	2	–	–	0.521	0.488	0.767	–0.07
	<i>Prl_2</i>	–	–	2	–	–	0.396	0.426	0.731	0.07
Р. Палана	<i>OMM-1082</i>	202–302	63.1	15	8.5	19.7	0.805	0.846	0.814	0.05
	<i>One-108</i>	192–232	53.5	11	8.6	20.1	0.870	0.848	0.414	–0.03
	<i>One-109</i>	124–180	37.2	15	10.8	25.5	0.815	0.887	0.290	0.08
	<i>One-111</i>	198–298	60.8	18	12.7	29.1	0.885	0.907	0.051	0.02
	<i>One-114</i>	196–296	62.3	25	22.9	46.9	0.880	0.952	0.0000	0.07
	<i>OtsG253b</i>	122–162	35.1	10	7.6	17.3	0.770	0.822	0.589	0.06
	<i>Mhc_251</i>	–	–	2	–	–	0.102	0.134	0.204	0.24
	<i>Mhc_190</i>	–	–	2	–	–	0.367	0.505	0.082	0.27
	<i>Mhc_109</i>	–	–	2	–	–	0.140	0.165	0.327	0.15
	<i>Prl_2</i>	–	–	2	–	–	0.391	0.497	0.223	0.21

Примечание. n_{rep} – число повторов тетра nukлеотидного мотива, H_o и H_e – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, p – результаты вероятностного теста на соответствие равновесию Харди–Вайнберга, F_{is} – соответствие наблюдаемых соотношений генотипов равновесию Харди–Вайнберга.

Наиболее вероятной причиной этого, на наш взгляд, являются нуль-аллели, происхождение которых связано с ошибками в репликации ДНК. По локусу *One-114* прослеживается преобладание длинных аллелей, что зачастую приводит к снижению количества их ПЦР-продукта вследствие увеличения вероятности ошибок в ходе амплификации ДНК с ростом числа повторов (O’Connell, Wright, 1997). С другой стороны, если дефицит гетерозигот в той или иной степени прослеживается

по всем локусам, то едва ли его можно объяснить только нуль-аллелями. Возможной причиной наблюдаемого явления может оказаться эффект Валунда, то есть снижение генного разнообразия в подразделённой популяции. Тесты на неравновесие по сцеплению микросателлитных локусов во всех выборках выявили отсутствие сцепления между ними.

По результатам анализа ранее опубликованных данных (Зеленина и др., 2006; Гриценко и др.,

Таблица 5. Оценки показателей попарной генетической дифференциации (F_{st} – над чертой, R_{st} – под чертой) по микросателлитным локусам (над диагональю) и F_{st} по локусам SNP (под диагональю) нерки *Oncorhynchus nerka* из рек западной Камчатки

Выборки	Выборки		
	р. Большая	р. Озерная	р. Палана
р. Большая	—	$\frac{0.006^*}{-0.001}$	$\frac{0.018^*}{0.016^*}$
р. Озерная	0.024*	—	$\frac{0.013^*}{0.001^*}$
р. Палана	0.292*	0.218*	—

Примечание. * – различия достоверны при $p < 0.001$.

2007) в трёх исследованных выборках нерки рек западной Камчатки все SNP-локусы были полиморфны, доля полиморфных RAPD-локусов варьировала от 65–66% (соответственно р. Большая и р. Озерная) до 71% (р. Палана). В большинстве выборок по 4 ядерным SNP-локусам (*CytB_26* локализован в митохондриальном геноме), обнаружено соответствие наблюдаемых и ожидаемых при равновесии Харди–Вайнберга частот генотипов, за исключением выборки р. Большая, где по локусу *Mhc_190* прослеживается дефицит гетерозигот (табл. 4). Анализ частот аллелей в 3 SNP-локусах – *Mhc_109*, *Mhc_190* и *Mhc_251*, расположенных в пределах одного экзона гена главного комплекса гистосовместимости (МНСII), выявил сцепленное наследование локусов *Mhc_109* и *Mhc_251* и отсутствие сцепления между ними и *Mhc_190*. Локализованные в одном гене и удалённые друг от друга не более чем на 150 н.п. локусы группы *Mhc* (109, 190 и 251) наиболее вероятно наследуются сцеплено, а тесты на неравновесие по сцеплению незначимы вследствие возможных ошибок генотипирования в *Mhc_190*, по которому также наблюдалось отклонение от равновесия Харди–Вайнберга в одной из выборок. Таким образом, целесообразно рассматривать все 3 локуса как одну группу сцепления. Известно, что вследствие высокой плотности SNP для них зачастую характерно формирование подобных групп сцепления, называемых также гаплотипами (Morin et al., 2004). Гаплотипы разрушаются с течением времени вследствие рекомбинации и генной конверсии. В свою очередь, этим событиям противодействуют естественный отбор и дрейф генов (Brookes, 1999). Локальные распределения групп сцепления характеризуют не только перечисленные выше процессы, но и отражают демографическую историю популяции: прохождение через “бутылочное горлышко”, наличие потока генов, инбридинга, ассортативного скрещивания и т.д. (Nielsen, 2000; Belfiore, 2006). Отметим, что, ана-

лизируя вариабельность RAPD-маркёров, мы вынуждены принять допущение о равновесии Харди–Вайнберга в исследуемых локусах, которое в реальности может и не соблюдаться (Beaumont, Hoare, 2003).

В целом, исследованная нами изменчивость 3 типов молекулярных маркёров ДНК в выборках нерки 3 озёрно-речных систем западного побережья Камчатки показала, что более высокий полиморфизм свойственен кодоминантным маркёрам. Генетическое разнообразие микросателлитных локусов ($\bar{H}_e = 0.888$) почти в 5 раз превышает разнообразие RAPD-маркёров ($\bar{H}_e = 0.189$) и лишь в 2 раза – SNP-маркёров ($\bar{H}_e = 0.409$). При этом наиболее высокий уровень полиморфизма характерен для популяции р. Озерная ($H_e = 0.462$ для SNP-локусов; $H_e = 0.205$ для RAPD-локусов); нерка р. Большая менее полиморфна (H_e соответственно – 0.439 и 0.181), а самый низкий уровень полиморфизма отмечен в выборке р. Палана (0.325 и 0.180), что, очевидно, обусловлено огромной численностью популяции оз. Курильское, составляющей более 70% численности всей азиатской нерки. Заметим, что общая тенденция изменчивости прослеживается по всем 3 типам маркёров ДНК.

Достоверные межпопуляционные различия ($p < 0.001$) по частотам аллелей 6 микросателлитных локусов были выявлены по результатам вероятностного теста на генную дифференциацию выборок нерки. Попарные сравнения выборок по частотам генотипов также обнаружили значимую генотипическую дифференциацию популяций нерки западного побережья Камчатки ($p < 0.001$), причём достоверные различия ($p < 0.001$) прослеживаются по всем исследованным микросателлитным локусам. Высоко достоверные различия ($p < 0.001$) между западнокамчатскими популяциями нерки обнаружены также по частотам аллелей SNP- и RAPD-локусов, тесты на генную дифференциацию популяций были значимы по 40 из 65 полиморфных RAPD-локусов и по 4 из 5 SNP-локусов (различия не выявлены лишь по частотам гаплотипов *CytB_26*).

Уровень попарной межвыборочной дифференциации в величинах F_{st} по 6 микросателлитным локусам изменялся от 0.006 до 0.018, в величинах R_{st} – от –0.001 (то есть аллельные варианты из разных выборок более близки между собой, чем в пределах одной выборки) до 0.016 (табл. 5). Общий уровень дифференциации (F_{st}) среди всех выборок по совокупности локусов составил 0.013 ($\sigma = 0.005$), по отдельным локусам – от 0.005 до 0.037, что согласуется с результатами, полученными ранее другими авторами (Beachem et al., 2006a). Эти оценки оказались более чем на порядок ниже средних индексов F_{st} по SNP- и RAPD-

локусам (соответственно 0.186 и 0.249). Отметим, однако, что значения F_{st} , рассчитанные по разным ДНК-маркёрам, не всегда сопоставимы (Хедрик, 2003).

UPGMA дендрограммы (рис. 2), построенные на основе оценок стандартных генетических дистанций Неи, рассчитанных по 6 микросателлитным, 5 SNP и 65 полиморфным RAPD-локусам, различались по топологии (RAPD- и кодоминантные маркёры) и по степени дивергенции популяций (SNP и микросателлиты). Это объясняется, на наш взгляд, тем, что при использовании разных методов анализа ДНК скринингу подвергаются различные области генома, и, следовательно, результаты, полученные с их помощью, могут не вполне соответствовать друг другу. Кроме того, полиморфизм RAPD-локусов, тип наследования и природа эволюционирования которых до конца не ясны, отнюдь не обязательно должен отражать географический характер пространственной генетической дифференциации вида. С другой стороны, это может быть связано с проблемами генотипирования и генетической интерпретации данных RAPD-анализа. Добавим, что одной из причин рассогласованности наших построений может выступать тот факт, что некоторые RAPD-локусы и несинонимичные SNP, локализованные в кодирующих областях генома, могут быть подвержены различным формам отбора (Allendorf, Seeb, 2000). Более того, анализируемые ДНК-маркёры характеризуются разными скоростями эволюции. Наиболее высокая частота мутаций свойственна микросателлитам, RAPD-локусы занимают промежуточное положение, в то время как SNP — наименее изменчивы. В силу этого обстоятельства микросателлиты лучше, нежели SNP и RAPD-PCR подходят для исследования генетических различий между популяциями с коротким временем дивергенции, что в ряде случаев нашло экспериментальное подтверждение (Loughheed et al., 2000; Narum et al., 2008).

Поскольку частота мутаций в микросателлитных локусах более чем в 10000 раз превышает частоту мутаций в позициях SNP, следовало бы ожидать, что значения генетических дистанций, рассчитанные по данным SNP-анализа, не превысят оценки дистанций для микросателлитных локусов. Кроме того, на величину последних может сильно влиять высокая гетерозиготность, что зачастую приводит к завышению истинных значений стандартных генетических дистанций Неи (Hedrick, 1999). Однако мы не обнаружили всех этих соотношений при сравнительном анализе генетической изменчивости в популяциях нерки с использованием данных типов маркёров. Вероятно, это объясняется тем, что при скрининге SNP на ограниченной выборке преимущественно отбираются локусы с высокой гетерозиготностью, и это впоследствии приводит к ещё более

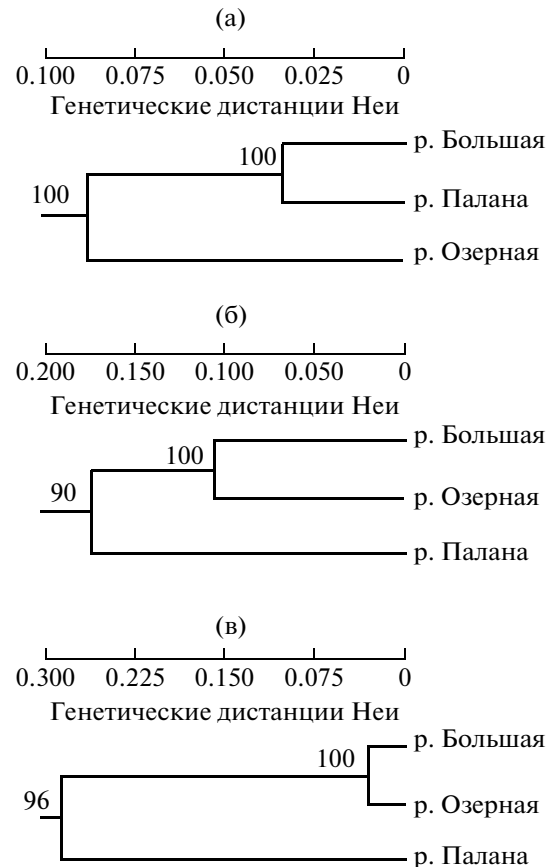


Рис. 2. UPGMA дендрограммы популяций нерки *Oncorhynchus nerka* рек Большая, Озерная и Палана, построенные по дистанциям Неи по результатам: а — RAPD-PCR, б — анализа полиморфизма микросателлитных локусов, в — SNP-анализа (в узлах указаны индексы бутстрепа, 1000 итераций).

существенному, чем в случае мультиаллельных маркёров, завышению значений генетических расстояний (это явление в англоязычной литературе чаще всего именуется систематической ошибкой детекции SNP — ascertainment bias). Чтобы снизить влияние подобных локусов, необходимо оперировать большим числом маркёров. Кроме того, установлено, что для более или менее достоверной оценки межпопуляционных различий требуется в 2–6 раз большее число диаллельных кодоминантных (SNP) и в 4–10 раз большее число диаллельных доминантных локусов (RAPD), чем высокоинформативных мультиаллельных микросателлитов (Morin et al., 2004). По результатам численного моделирования оказалось, что 10 диаллельных SNP по объёму информации эквивалентны одному микросателлитному локусу с 11 аллелями (Morin et al., 2004).

Для оценки эффективности индивидуальной идентификации западнокамчатской нерки в смешанных выборках с использованием различных молекулярных ДНК-маркёров проведены тесты

Таблица 6. Результаты дискриминантного анализа и теста на принадлежность к популяции (критерий отношения правдоподобия) по биологическим и генетическим маркерам нерки *Oncorhynchus nerka* рек западного побережья Камчатки

Выборка	Доля корректных определений, %						
	возраст	морфо-биологические показатели	ДНК-фигер-принтинг (RAPD-PCR)	SNP-анализ	анализ полиморфизма микросателлитных локусов	объединенные данные по возрастному составу и микросателлитам	объединенные данные по SNP и микросателлитам
Р. Большая	68	68	94	54	78	83	96
Р. Озерная	27	48	96	49	75	75	90
Р. Палана	84	55	100	80	82	83	98
В среднем	59.7	56.0	96.7	61.0	78.3	80.2	94.5

на принадлежность к популяции. По результатам симуляционного анализа (тестирование выборок, на 100% состоящих из особей одной популяции) определена разрешающая способность базы генетических данных, включающей аллельные частоты по 6 микросателлитным локусам, 5 SNP и 65 полиморфным RAPD-локусам. Тесты показали, что эффективность 5 диаллельных SNP-локусов мала и сопоставима лишь с эффективностью биологических критериев при определении популяционной принадлежности особей (табл. 6). Метод RAPD-PCR, напротив, отличается высокой точностью классификации, что согласуется с результатами исследования нерки Аляски и Британской Колумбии (Corley-Smith et al., 2005). Следует подчеркнуть, что выше приведены данные анализа RAPD-профилей, полученных с использованием единственного удачно подобранного праймера. При этом фракционирование продуктов RAPD-PCR в полиакриламидном геле и последующая компьютерная обработка электрофореграмм позволяет одновременно учитывать несколько десятков амплифицированных фрагментов. Использование нескольких праймеров даст возможность использовать для идентификации особей сотни маркеров, при достаточно низких временных и финансовых затратах. Ситуация, однако, осложняется низкой воспроизводимостью электрофореграмм, связанной с чувствительностью метода к качеству ДНК. В частности, нам не удалось с точностью воспроизвести RAPD-спектры для образцов с частично деградировавшей ДНК. Обратная зависимость числа фрагментов от качества ДНК была отмечена нами в экспериментах с контрольными образцами, что заставило нас отказаться от дальнейшего использования данного метода анализа.

Классификация особей по результатам анализа полиморфизма микросателлитных локусов (общее число аллелей – 145) показала, что производители западнокамчатской нерки были верно отнесены к нативным популяциям лишь в 78% те-

стов. Как известно, точность идентификации напрямую зависит от общего числа независимых признаков, вовлеченных в анализ, то есть от числа аллелей, используемых для формирования молекулярно-генетических баз данных. По оценкам Бичема с соавторами (Beacham et al., 2005), в среднем для достижения 80%-ной точности при определении популяционной принадлежности нерки с использованием микросателлитных маркеров необходимо располагать как минимум 80 аллелями, для увеличения точности до 90% требуется уже 400 аллелей. Кроме того, разрешающая способность микросателлитного анализа зависит от степени полиморфизма используемых локусов. Считается, что максимальная точность идентификации достигается при использовании умеренно или высокополиморфных локусов (Banks et al., 2003; Beacham et al., 2005). Однако мы имеем основания полагать, что первостепенное значение имеет не общее число аллелей, а число независимых умеренно полиморфных локусов, так как очевидно, что в этом случае оценки функции правдоподобия будут более робастными. Объединение биологических (частоты возрастных классов) и генетических (частоты аллелей микросателлитных локусов) критериев позволило снизить ошибку определения популяционной принадлежности в среднем на 1.9%, при этом точность классификации не уменьшилась ни в одной из выборок.

Сравнение эффективности SNP и микросателлитов с точки зрения их дифференцирующей способности в нашем эксперименте однозначно свидетельствует в пользу последних. Систематические ошибки детекции, сцепление и клональное наследование некоторых из выбранных нами SNP-локусов делают их малоподходящими для популяционно-генетических исследований. Однако использование их в комплексе с микросателлитами для определения популяционной принадлежности нерки позволило существенно увеличить точность классификации – практически

до 95%, в то время как уже 90%-ный уровень считается весьма удовлетворительным (Smith, Seeb, 2008). Таким образом, создание объединённой базы данных по 5 SNP и 6 микросателлитным локусам представляется наиболее целесообразным с точки зрения разработки методики индивидуальной идентификации нерки, так как генотипирование SNP методом аллель-специфической ПЦР гораздо экономичнее анализа полиморфизма микросателлитных локусов ДНК с использованием капиллярного электрофореза и ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами. К аналогичным выводам пришли Нарум с соавторами (Narum et al., 2008), изучая генетическую изменчивость чавычи *O. tshawytscha* тихоокеанского побережья США и Канады.

Следует подчеркнуть, что анализ единичного нуклеотидного полиморфизма имеет ряд очевидных преимуществ по сравнению с другими методами. Основным его достоинством является тот факт, что анализ диаллельных SNP, в отличие от микросателлитов, являющихся мультиаллельными, может быть практически полностью автоматизирован (Хлесткина, Салина, 2006). С помощью метода олигонуклеотидных чипов можно проанализировать одновременно несколько тысяч SNP, что особенно важно в популяционных исследованиях, требующих обработки больших объёмов материала. Таким образом, при использовании современных технологий SNP-анализ может во много раз превосходить другие способы анализа полиморфизма ДНК по производительности и точности генотипирования (Morin et al., 2004). Кроме того, ни для одного типа полиморфизма ДНК нет такого разнообразия и количества аналитических подходов к разработке и генотипированию, как для SNP (Хлесткина, Салина, 2006). Результаты SNP-анализа легко воспроизводимы и относительно легко интерпретируемы, что даёт возможность сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях, и создавать общие базы данных. В частности, на примере тихоокеанских лососей установлено, что данные SNP-анализа не требуют стандартизации и не зависят от технических средств и методов генотипирования, используемых в разных лабораториях (Seeb et al., 2005a, 2005b; Templin et al., 2005; Zelenina et al., 2005).

В заключение отметим, что выбор маркёров в первую очередь зависит от поставленных перед исследователем задач; так, чаще всего генетические маркёры проявляют себя по-разному, если с их помощью решаются задачи индивидуальной идентификации или анализируются взаимоотношения между популяциями. Сравнение эффективности различных маркёров для определения популяционной принадлежности и изучения популяционной структуры нерки проводилось и ранее, при этом большинство исследователей отда-

ют предпочтение микросателлитным маркёрам, высокая эффективность которых неоднократно демонстрировалась в работах отечественных и зарубежных авторов (Beacham et al., 1998, 2006; Seeb et al., 1998; Зеленина и др., 2006). В то же время, привлечение других типов маркёров ДНК и использование в качестве дифференцирующих критериев особенностей размерно-возрастной структуры популяции (частот возрастных классов) гарантирует привнесение важной дополнительной информации. Однако эффективность морфобиологических признаков, которые в основном отражают действие локального отбора, будет падать с увеличением числа популяций. Кроме того, очевидно, что при расширении района исследований вклад каждого типа маркёра и дискриминирующая способность разных наборов данных может существенно измениться по сравнению с оценками, полученными нами при анализе 3 природных популяций.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность сотрудникам ВНИРО – А.А. Волкову, Д.А. Зелениной, Д.С. Стоклицкой, Н.С. Мюге и В.Н. Мюге – за помощь в обработке материала и предоставление методик; Н.В. Кловач (ВНИРО) и А.Г. Осиннову (МГУ) – за ценные замечания и рекомендации по тексту рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айвазян С.А., Бухштабер В.М., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. 1989. Прикладная статистика. Классификация и снижение размерности. Справочное издание. М.: Финансы и статистика, 610 с.
- Алтухов Ю.П. 1974. Популяционная генетика рыб. М.: Пищ. пром-сть, 247 с.
- Бобырев А.Е. 2002. Сравнительная характеристика методов идентификации локальных популяций рыб // Атлас распространения в море различных стад тихоокеанских лососей в период весенне-летнего нагула и преднерестовых миграций. О.Ф. Гриценко (ред.). М.: Изд-во ВНИРО, 190 с.
- Бугаев В.Ф. 1976. К вопросу о дифференциации субизолятов красной в бассейне оз. Курильское // Тр. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Вып. 7. Исследования по биологии рыб и промысловой океанографии. С. 88–101.
- Бугаев В.Ф. 1995. Азиатская нерка (пресноводный период жизни, структура локальных стад, динамика численности). М.: Колос, 464 с.
- Бугаев В.Ф., Дубынин В.А. 2002. Факторы, влияющие на биологические показатели и динамику численности нерки *Oncorhynchus nerka* рек Озерной и Камчатка // Изв. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Т. 130. С. 679–757.
- Бугаев В.Ф., Миловская Л.В., Лепская Е.В. и др. 2002а. Исследования нерки *Oncorhynchus nerka* оз. Паланско-

- го в 1990–2001 гг. (северо-западная Камчатка) // Изв. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Т. 130. С. 777–791.
- Бугаев В.Ф., Остроумов А.Г., Непомнящий К.Ю., Маслов А.В. 2002б. Некоторые особенности биологии нерки *Oncorhynchus nerka* р. Большой (Западная Камчатка) и факторы, влияющие на ее биологические показатели // Изв. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Т. 130. С. 758–776.
- Глубоковский М.К. 1995. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука, 343 с.
- Городовская С.Б. 2002. Сравнительный анализ состояния яичников покатной молоди нерки *Oncorhynchus nerka* из реки Озерная в разные годы // Тр. Всерос. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Т. 141. С. 146–153.
- Гриценко О.Ф., Кловач Н.В., Зеленина Д.А. и др. 2007. Популяционный состав неполовозрелой нерки в западной части Берингова моря в осенний период // Изв. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Т. 151. С. 206–213.
- Егорова Т.В. 1970. Размножение и развитие красной в бассейне р. Озерная // Изв. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Т. 73. С. 39–53.
- 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.
- Коновалов С. М. 1980. Популяционная биология тихоокеанских лососей. М.: Наука, 237 с.
- Крогуис Ф.В. 1983. Сезонные расы красной *Oncorhynchus nerka* (Walb.) и ее нерестилища в водоемах Камчатки // Биологические основы развития лососевого хозяйства в водоемах СССР. М.: Наука, С. 18–31.
- Остроумов А.Г. 1970. Результаты аэровизуального учета и аэрофотосъемки красной и ее нерестилищ в бассейне оз. Курильское // Изв. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Т. 78. С. 17–32.
- Правдин И.Ф. 1966. Руководство по изучению рыб. М.: Пищ. пром-сть, 373 с.
- Селифонов М.М. 1970. Вопросы роста молоди красной оз. Курильское // Изв. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Т. 78. С. 33–41.
- Хедрик Ф. 2003. Генетика популяций. М.: Техносфера, 592 с.
- Хлесткина Е.К., Салина Е.А. 2006. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы // Генетика. Т. 42. № 6. С. 725–736.
- Хрусталева А.М. 2007. Комплексный метод дифференциации нерки (*Oncorhynchus nerka*) азиатских стад. М.: Изд-во ВНИРО, 165 с.
- Хрусталева А.М., Зеленина Д.А. 2008. Сезонная и межгодовая изменчивость микросателлитной ДНК нерки (*Oncorhynchus nerka*) двух озерно-речных систем Камчатки // Генетика. Т. 44. № 7. С. 948–955.
- Чугунова Н.И. 1959. Руководство по изучению возраста и роста рыб. М.: Изд-во АН СССР, 164 с.
- Allendorf F.W., Seeb L.W. 2000. Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers // Evolution. V. 54(2). P. 640–651.
- Banks M.A., Eichert W., Olsen J.B. 2003. Which genetic loci have greater population assignment power? // Bioinformatics. V. 19(11). P. 1436–1438.
- Beacham T.D., Margolis L., Nelson R.J. 1998. A comparison of methods of stock identification for sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Barkley Sound, British Columbia // NPAFC Bull. № 1. P. 227–239.
- Beacham T.D., Candy J.R., McIntosh B. et al. 2005. Estimation of stock composition and individual identification of sockeye salmon on a Pacific Rim basis using microsatellite and major histocompatibility complex variation // Trans. Amer. Fish. Soc. V. 134. P. 1124–1146.
- Beacham T.D., McIntosh B., MacConnachie C. et al. 2006. Pacific Rim population structure of sockeye salmon as determined from microsatellite analysis // Trans. Amer. Fish. Soc. V. 135. P. 174–187.
- Beaumont A.R., Hoare K. 2003. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. UK, Oxford: Blackwell Publ., 158 p.
- Belfiore N.M. 2006. Discovering and using linked and unlinked SNPs for population genetic inference // SNP Workshop II. Applications of SNP genotyping in fisheries management. Girdwood, Alaska. September 21–22. P. 13–14.
- Brookes A. 1999. The essence of SNP // Gene. V. 234. P. 177–186.
- Burgner R.L. 1987. Factors influencing age and growth of juvenile sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in lakes // Smith H.D., Margolis L., Wood C.C. (eds.). Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population biology and future management. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. V. 96. P. 129–142.
- Corley-Smith G.E., Wennerberg L., Schembri J.A. et al. 2005. Assignment of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) to spawning sites using DNA markers // Mar. Biotechnol. V. 7(5). P. 440–448.
- Dieringer D., Schlotterer C. 2002. Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets // Mol. Ecol. Notes. V. 3(1). P. 167–169.
- Hansen M.M., Kenchington E., Nielsen E.E. 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers // Fish and Fisheries. V. 2. P. 93–112.
- Hedrick P.W. 1999. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation // Evolution. V. 53(2). P. 313–318.
- Lougheed S.C., Gibbs H.L., Prior K.A., Weatherhead P.J. 2000. A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the massasauga rattlesnake // J. Heredity. V. 91. P. 458–463.
- Morin P.A., Luikart G., Wayne R.K. et al. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation // Trends in ecology and evolution. V. 19(4). P. 208–216.
- Narum S.R., Banks M., Beacham T.D. et al. 2008. Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms // Mol. Ecology. V. 17(15). P. 3464–3477.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. V. 106(949). P. 283–292.

- Nielsen R.* 2000. Estimation of population parameters and recombination rates from single nucleotide polymorphisms // *Genetics*. V. 154. P. 931–942.
- O'Connell M., Wright J.M.* 1997. Microsatellite DNA in fishes // *Rev. Fish Biol. and Fisheries*. V. 7. P. 331–363.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C.* 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears // *Mol. Ecol.* V. 4. P. 347–353.
- Page R.D.M.* 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers // *Computer Applications in the Biosciences*. V. 12. P. 357–358.
- Raymond M., Rousset F.* 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism // *J. Heredity*. V. 86. P. 248–249.
- Schneider S., Kueffer J.-M., Roessli D., Excoffier L.* 2000. Arlequin. Version 2.0. Genetics and Biometry Lab. Dept. Anthropology. Univ. Geneva. Switzerland. <http://lgb.unige.ch/arlequin/>
- Seeb J.E., Habicht C., Olsen J.B. et al.* 1998. Allozyme, mtDNA, and microsatellite variants describe structure of populations of pink and sockeye salmon in Alaska // *NPAFC Bull.* № 1. P. 300–318.
- Seeb L.W., Templin W.D., Smith C.T. et al.* 2005a. SNPs provide an easily-standardized baseline for NPAFC studies of chum salmon. NPAFC. Doc. 907, 12 p.
- Seeb J.E., Wilmot R.L., Urawa S. et al.* 2005b. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) provide standard DNA data for Bering-Aleutian salmon international survey (BASIS) studies // *NPAFC Tech. Rept.* № 6. P. 101–103.
- Smith C.T., Seeb L.W.* 2008. Number of alleles as a predictor of the relative assignment accuracy of STR and SNP baselines for chum salmon // *Trans. Amer. Fish. Soc.* V. 137. P. 751–762.
- Templin W.D., Smith C.T., Seeb J.E., Seeb L.W.* 2005. SNPs provide high-throughput resolution for migratory studies of chinook salmon. NPAFC. Doc. 908, 10 p.
- Zelenina D.A., Khrustaleva A.M., Volkov A.A. et al.* 2005. A case study of two genetic markers for inter-laboratory collaboration: SNPs provide transportability without standardization. NPAFC Doc. 913, 14 p.