

УДК 575.174.015.3:597.553.2

МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ЧАВЫЧИ, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), КАМЧАТКИ

© 2008 г. Н. Ю. Шпигальская¹, Вл. А. Брыков², А. Дж. Гарретт³, А. Д. Кухлевский², Р. А. Шапоров¹, Н. В. Варнавская¹

¹Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Петропавловск-Камчатский 683600; e-mail: shpigalskaya@kamniro.ru

²Институт биологии моря Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток 690041; e-mail: vladbrykov@hotmail.com

³Школа рыбохозяйственных и океанологических наук Университета штата Аляска в Фэрбэнксе, Джуно АК 99801, Аляска, США

Поступила в редакцию 27.04.2006 г.
Окончательный вариант получен 22.02.2007 г.

Представлены результаты исследования полиморфизма мтДНК у чавычи, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), Камчатка. ПДРФ-анализ с применением восьми эндонуклеаз рестрикции позволил выявить изменчивость нуклеотидных последовательностей в трех амплифицированных участках мтДНК по семи полиморфным рестриктным сайтам у 579 особей чавычи из 13 локальностей. В результате анализа распределения частот 11 комбинированных гаплотипов и числа нуклеотидных замен произведена оценка внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости. Подтверждена статистически значимая гетерогенность камчатских популяций. Высказано предположение, что максимальное время дивергенции для камчатских популяций чавычи, величина различий между которыми составляет около 0.02% нуклеотидных замен, соответствует оценке во временном интервале, не превышающем 10–20 тыс. лет. Вероятно, отступление позднеплейстоценового ледника обусловило начало процессов расселения, реколонизации и формирования современной картины подразделенности вида на структурные компоненты.

До недавнего времени для изучения биологического разнообразия популяций и выявления внутри- и межпопуляционной дифференциации наиболее широко использовали такие маркеры генетической изменчивости, как полиморфные белковые локусы [1–3], но в последние десятилетия все большее значение приобретают исследования на уровне ДНК [4–7]. Внедрение молекулярно-генетических методов в популяционную генетику позволяет дополнить и расширить уже сформированную картину генетической подразделенности и процессов эволюции видов. Анализ изменчивости первичной последовательности митохондриальной и ядерной ДНК, оценка их внутри- и межвидовой дивергенции дают дополнительное количество высокоинформативных маркеров, что особенно актуально при исследовании видов со сложной генетической структурой. Кроме того, исследования полиморфизма нуклеотидных последовательностей позволяют установить мутационные связи между аллельными вариантами генов и проследить их генеалогию до общего предка [7–9].

Исследования популяционной структуры тихоокеанских лососей *Oncorhynchus* spp. с использованием молекулярно-генетических методов в силу их больших и принципиально новых возмож-

ностей получили в настоящее время широкое распространение. Анализ изменчивости митохондриальной ДНК является эффективным инструментом оценки генетической дивергенции и выявления филогенетической истории популяций [10–15]. Следует отметить, что исследования на основе изменчивости митохондриального генома затронули не все виды тихоокеанских лососей на азиатской части их ареалов. До недавнего времени оценки внутри- и межпопуляционной генетической гетерогенности такого важного в промысловом отношении вида тихоокеанских лососей, как чавыча, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), опирались на данные по изменчивости аллозимных генов [3, 16]. Исследования полиморфизма мтДНК чавычи, которая в Азии обитает в нерестовый период только на Камчатском полуострове, могут дать дополнительную информацию о внутри- и межпопуляционной генетической структуре данного вида, позволят выявить филогенетические связи между внутривидовыми структурными единицами, а также увеличить число информативных генетических маркеров, пригодных для различных аспектов популяционных исследований.

Целью настоящей работы было выявление межпопуляционной изменчивости мтДНК чавы-

Таблица 1. Локализация сбора и объем выборок чавычи Камчатки

Дата сбора проб	Локальность	Объем выборки, экз.
22–26.06.2001	р. Пахача	10
16.06–06.07.2002	р. Тигиль	42
22–23.06.2002	р. Палана	50
02.06–12.06.2002	р. Пымта	50
21.06–01.07.2002	р. Утка	50
25.06–06.07.2002	Бассейн Олюторского залива: ставной невод № 482 (60°34' с.ш., 168°58' в.д.), ставной невод № 483 (60°34' с.ш., 168°54' в.д.)	50
Июль 2002	р. Большая	60
12.06–15.06.2003	р. Воровская	50
29.06–25.07.2003	р. Коль	50
23.05–30.06.2003	р. Кихчик	33
26.06–01.08.2003	р. Авача	44
Июль 2003	р. Жупанова	30
12.07.2003	р. Камчатка	60
Всего		579

Таблица 2. Последовательность праймеров и гены в соответствующих амплифицированных последовательностях мтДНК

Структурные гены	Последовательности	Длина фрагмента, пн
<i>A8/A6/COIII/ND3</i>	5'-CTAGTGACATGCCCAACTCAACC-3' 5'-TCATAAGGCGGTCATGGACTTAAACC-3'	2115
<i>ND3/ND4L/ND4</i>	5'-TTACGCGTATAAGTGACTTCCAA-3' 5'-TTTTGGTTCCTAAGACCAATGGAT-3'	2331
<i>COI/COII/A8</i>	5'-TAATCGTCACAGCCCATGCCTTCGT-3' 5'-GGTCAGTTTCAGGGTTCAGGTTTAGC-3'	2471

чи на азиатской части ареала и оценка уровня генетической дивергенции исследованных популяций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал от производителей чавычи был собран в период экспедиционных работ в 2001–2003 гг. из восьми локальных популяций Западной Камчатки и пяти, включая бассейн Олюторского залива, Восточной Камчатки (табл. 1). Пробы собирались на нерестилищах и путях нерестовых миграций, объемы выборок представлены в табл. 1, общее количество исследованных экземпляров составило 579.

Образцы ткани сердечной мышцы чавычи извлекали из свежельовленных рыб и фиксировали в этаноле.

Тотальную ДНК выделяли из ткани сердечной мышцы стандартным способом с использованием метода протеиназного гидролиза в присутствии додецилсульфата натрия с последующим высаливанием белков, удалением их вместе с клеточны-

ми обломками центрифугированием и осаждением ДНК из супернатанта изопропанолом [17].

Изменчивость структуры мтДНК исследовали, используя рестрикционный анализ трех фрагментов. Фрагменты мтДНК чавычи амплифицировали посредством полимеразной цепной реакции [18] с использованием праймерных последовательностей, разработанных на других видах лососей – микиже, *Oncorhynchus mykiss*, и кижуче, *Oncorhynchus kisutch* [19, 20], и позволяющих амплифицировать фрагменты мтДНК, почти идентичные по длине у всех тихоокеанских лососей. Исследованные в данной работе фрагменты и праймерные последовательности, использованные нами при амплификации, приведены в табл. 2.

Длина амплифицированных фрагментов в сумме составляет почти 7000 пар нуклеотидов (пн), или около 40% всего митохондриального генома чавычи [21]. Изменчивость нуклеотидной последовательности анализировали, используя набор рестриктных ферментов: *Bst*NI, *Hin*FI, *Mbo*I, *Rsa*I, *Dde*I, *Taq*I, *Msp*I, *Sau*96I (табл. 3).

Таблица 3. Используемые рестрикционные ферменты и расщепляемые ими нуклеотидные последовательности мтДНК чавычи (W = A или T; N = A или C, или G, или T)

Фрагмент мтДНК	Длина фрагмента, пн	Рестриктаза	Сайт рестрикции	Число сайтов	Число полиморфных сайтов
A8/A6/COIII/ND3	2127	<i>Bst</i> NI	CC [^] WGG	2–3	1
		<i>Hin</i> FI	G [^] ANTC	4–6	0
		<i>Mbo</i> I	[^] GATC	1–2	1
		<i>Rsa</i> I	GT [^] AC	4–5	1
ND3/ND4L/ND4	2329	<i>Dde</i> I	C [^] TNAG	11–12	1
		<i>Taq</i> I	T [^] CGA	2–3	1
COI/COIII/A8	2473	<i>Msp</i> I	C [^] CGG	3–4	1
		<i>Sau</i> 96I	G [^] GNCC	4–6	1
		<i>Rsa</i> I	GT [^] AC	7–8	0
		<i>Hin</i> FI	G [^] ANTC	6–7	0
Всего	6929			56	7

Примечание. Размеры фрагментов мтДНК приводятся в соответствии с результатами секвенирования (GenBank accession Number AF392054) [20].

После реакции эндонуклеазного гидролиза пробы подвергали электрофорезу в 1.8–2%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере. Для определения молекулярной массы образующихся фрагментов использовали маркерный набор фрагментов ДНК, кратных 100 парам оснований (BRL Gibco, Grand NY), и ДНК фага λ , обработанную рестриктазой *Pst*I.

Фрагменты ДНК в геле окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Результаты анализа трех фрагментов мтДНК каждой особи по всем рестрикционным сайтам объединяли, получая таким образом комбинированные гаплотипы (в дальнейшем – гаплотипы G1–G11).

Оценку количества замен оснований на нуклеотидный сайт и их стандартные отклонения между гаплотипами рассчитывали, используя пакет программ REAP [22]. Нуклеотидную дивергенцию между всеми парами гаплотипов определяли с помощью программы D, а дивергенцию между всеми парами популяций – с помощью программы DA [22]. Величины нуклеотидного и гаплотипического разнообразия рассчитывали по Нею [9, 23] в пакетах программ REAP. Оценку величины дивергенции между выборками и их стандартные ошибки оценивали по Нею и Ли [24]. Полученная в REAP матрица количественных значений дивергенции между популяциями использовалась для кластерного анализа (программа UPGMA, пакет программ NTSYS) и построения фенотипов [25].

Для оценки значимости межпопуляционных различий частот гаплотипов использовали методы F-статистики в пакете программ Arlequin2000 [26].

Межпопуляционную гетерогенность оценивали с использованием псевдовероятностного теста [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объединенные данные, полученные в результате анализа трёх фрагментов мтДНК по всем сайтам рестрикции и использованным эндонуклеазам, позволили выявить 11 комбинированных гаплотипов (composite haplotypes) у 579 особей чавычи (табл. 4), абсолютная частота встречаемости которых приведена в табл. 5. Распределение относительных частот гаплотипов в исследованных популяциях Камчатки отражено на рис. 1.

Гаплотип G1, который можно охарактеризовать как доминирующий, представлен во всех азиатских популяциях. В 13 исследованных выборках его частота варьировала от 0.70 (р. Пахача) до 0.98 (р. Коль) (рис. 2), средняя частота составила 0.88. В шести камчатских популяциях отмечен гаплотип G4 (табл. 5). Шесть гаплотипов (G2, G3, G6, G7, G8, G9) с низкой частотой присутствовали в меньшем количестве локальных популяций (табл. 5, рис. 1). Гаплотипы G5, G10, G11 обнаружены только лишь в одной из 13 выборок. В течение всего периода исследований была выявлена только одна особь с гаплотипом G11. Вероятно, о последних трех гаплотипах можно говорить как об уникальных, хотя в данном случае нельзя не

Таблица 4. Выявленные комбинированные гаплотипы мтДНК чавычи

Комбинированный гаплотип	A8/A6/COIII/ND3				ND3/ND4L/ND4		COI/COII/A8			
	<i>Bst</i> NI	<i>Hinf</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 96I	<i>Msp</i> I
G1	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A
G2	A	B	B	A	A	A	A	A	B	A
G3	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A
G4	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A
G5	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A
G6	A	B	B	A	A	B	A	A	A	A
G7	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A
G8	B	B	B	A	A	A	A	A	B	A
G9	A	B	B	A	A	A	A	A	A	A
G10	B	B	B	A	A	B	A	A	A	A
G11	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A

Таблица 5. Встречаемость комбинированных гаплотипов мтДНК в выборках чавычи

Локальность	Гаплотипы											
	N	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
р. Палана	50	42	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
р. Тигиль	42	38	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0
р. Пымта	50	37	0	4	1	4	4	0	0	0	0	0
р. Утка	50	41	2	2	5	0	0	0	0	0	0	0
Олют. залив	50	42	0	0	2	0	0	3	0	3	0	0
р. Коль	50	49	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
р. Воровская	50	48	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
р. Кихчик	33	32	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
р. Авача	44	43	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
р. Жупанова	30	29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
р. Камчатка	60	52	5	0	0	0	0	0	0	0	3	0
р. Большая	60	49	2	4	2	0	2	1	0	0	0	0
р. Пахача	10	7	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
Всего	579	509	17	14	12	4	7	4	2	6	3	1

Примечание. N – объем выборки, экз.

учитывать относительно небольшие объемы исследованных выборок камчатской чавычи.

Значения гаплотипической и нуклеотидной изменчивости в популяциях приводятся в табл. 6. Наиболее высокие значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия характерны для чавычи самой северной восточнокамчатской популяции – р. Пахача, несколько ниже эти значения у особей рек Пымта, Большая и Утка. Как было отмечено ранее, в выборках из первых двух популяций присутствуют редкие гаплотипы. Для всех остальных локальностей свойственны значимо

более низкие величины гаплотипической и нуклеотидной изменчивости.

Сеть гаплотипов, построенная по принципу минимального числа нуклеотидных различий между ними, приведена на рис. 2. Из рисунка видно, что распределение гаплотипов чавычи в целом формирует картину “звездчатой” радиации гаплотипов в результате, как правило, единичных нуклеотидных замен. Такое распределение свидетельствует об общности происхождения исследованных популяций и соответственно о едином предковом генофонде. Наличие возможных альтернативных связей между гаплотипами (петле-

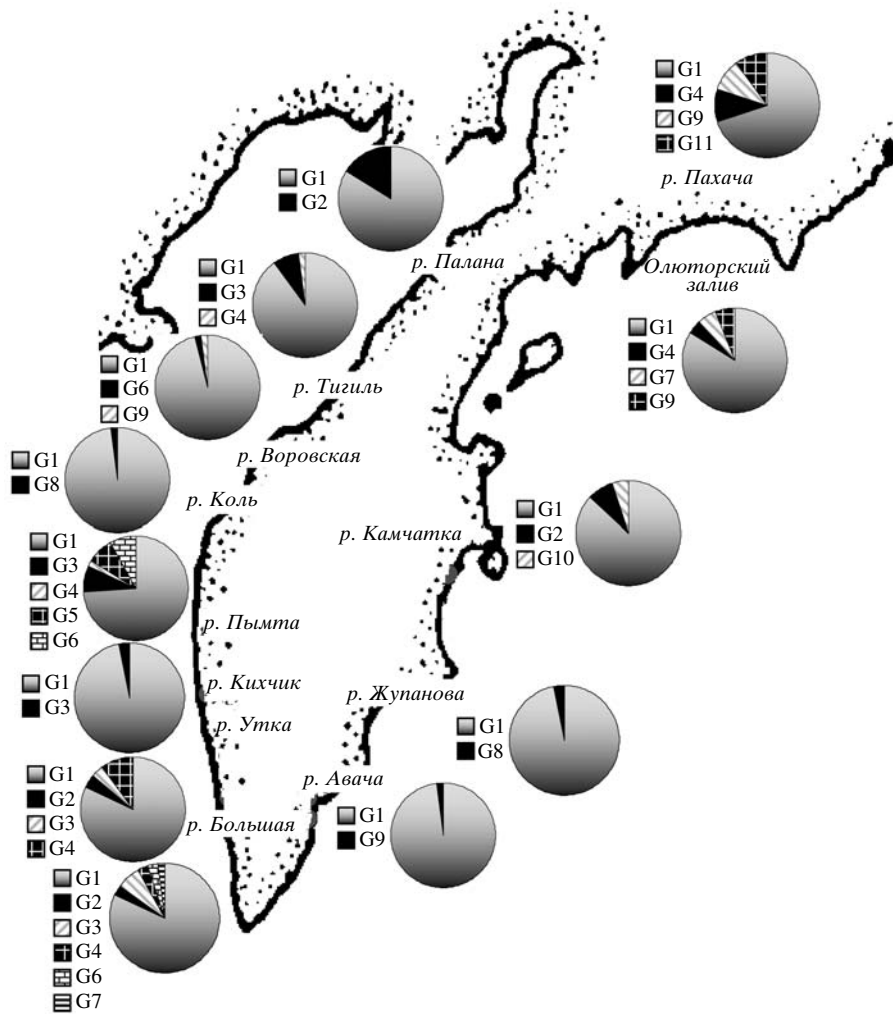


Рис. 1. Распределения частот гаплотипов G1–G11 в популяциях чавычи Камчатки.

вые структуры в сетке) может быть результатом гомоплазии, т.е. повторных и обратных мутаций в мтДНК [28].

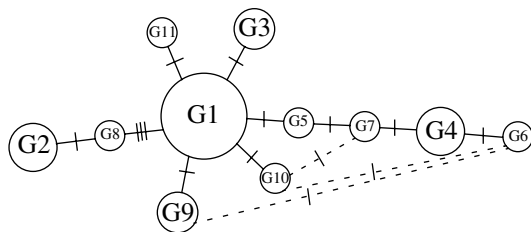


Рис. 2. Генеалогическая сеть гаплотипов чавычи, построенная по принципу минимального числа нуклеотидных замен и показывающая мутационные различия между гаплотипами. Размер окружности приблизительно отражает частоту встречаемости данного гаплотипа во всех исследованных популяциях. Число поперечных штрихов на ветвях обозначает число нуклеотидных замен. Пунктиром обозначены альтернативные связи между гаплотипами.

Анализ количества парных нуклеотидных замен во всех гаплотипах в популяциях чавычи Камчатки позволил выявить максимальное число нуклеотидных замен – девять – в выборке из р. Большая, минимальное – одна нуклеотидная замена между двумя выявленными гаплотипами – у чавычи рек Кихчик и Авача.

Ранее было показано, что в изолированных популяциях или группах локальных популяций конфигурация распределения числа нуклеотидных замен определяется демографической историей [29, 30]. Размер выборок, использованных в нашем анализе, недостаточен для подобных заключений, но позволяет сделать первичную оценку эволюционного разнообразия. В соответствии с вышеизложенным количество нуклеотидных замен в митохондриальных гаплотипах камчатских популяций чавычи варьирует от одного до девяти, что позволяет говорить об очень небольшом эволюционном разнообразии азиатских по-

Таблица 6. Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие в популяциях чавычи

Популяция	Гаплотипическое разнообразие	Нуклеотидное разнообразие
р. Пахача	0.5333 ± 0.18007	0.002454
Олюторский залив	0.2914 ± 0.08160	0.001430
р. Палана	0.2743 ± 0.07093	0.002867
р. Тигиль	0.1800 ± 0.07676	0.000712
р. Воровская	0.0792 ± 0.05213	0.000303
р. Коль	0.0400 ± 0.03803	0.000310
р. Пымта	0.4416 ± 0.08286	0.001796
р. Кихчик	0.0606 ± 0.05612	0.000152
р. Утка	0.3208 ± 0.08147	0.002400
р. Большая	0.3305 ± 0.07737	0.001958
р. Авача	0.0455 ± 0.04292	0.000117
р. Жупанова	0.0667 ± 0.06125	0.000517
р. Камчатка	0.2435 ± 0.07001	0.001873

пуляций и о небольшой глубине дивергенции между ними.

Географическое распределение гаплотипов мтДНК в популяциях Камчатки представлено в табл. 5. Частоты и варианты гаплотипов в исследованных выборках были неодинаковы. Среди особей из р. Большая удалось выявить наибольшее число гаплотипов – шесть, в остальных попу-

ляциях азиатской части ареала их число варьировало от двух (рр. Авача, Жупанова, Палана, Коль, Кихчик) до пяти (р. Пымта).

Анализ частот гаплотипов с использованием псевдовероятностного теста на гомогенность позволил оценить уровень неоднородности чавычи исследованных популяций. При сравнении всех 13 выборок тест показал значимые различия ($\chi^2 = 314.62$; $d.f. = 120$; $P < 0.001$). При отдельном анализе гетерогенности региональных групп популяций Западной и Восточной Камчатки значения χ^2 -теста также оказались статистически значимыми. Для восьми западнокамчатских популяций $\chi^2 = 125.88$ ($d.f. = 56$; $P < 0.001$), для пяти локальностей Восточной Камчатки – $\chi^2 = 66.91$ ($d.f. = 28$; $P < 0.001$). Вероятность гомогенности сравниваемых выборок при всех вариантах анализа оказалась равна нулю.

В табл. 7 приводятся результаты применения методов F -статистики для оценки уровня генетической дифференциации исследуемых популяций. В табл. 8 приведены значимости различий между всеми парами популяций. Оценка проводилась на основе изменчивости числа нуклеотидных замен. Как видно из табл. 8, между большинством сравниваемых пар значимые различия не обнаружены. На азиатской части ареала пять выборок (рр. Палана, Пымта, Коль, Воровская, Авача) при попарном сравнении отличны более чем от половины включенных в анализ локальностей. Было показано, что основной вклад в гетерогенность исследуемой совокупности вносят выборки чавычи из популяций рек Палана и Пымта, в не-

Таблица 7. Значения F_{st} при попарном сравнении популяций чавычи (число пермутаций 3078)

Популяции	р. Палана	р. Тигиль	р. Пымта	р. Утка	Олюторский залив	р. Коль	р. Воровская	р. Кихчик	р. Авача	р. Жупанова	р. Камчатка	р. Большая
р. Тигиль	0.05190											
р. Пымта	0.05402	0.03862										
р. Утка	0.02378	0.00837	0.01746									
Олют. залив	0.03921	0.01275	0.02932	0.00351								
р. Коль	0.11118	0.03345	0.12367	0.08142	0.06270							
р. Воровская	0.08711	0.01588	0.09580	0.06015	0.03687	-0.00662						
р. Кихчик	0.08171	-0.00170	0.08457	0.05039	0.03949	-0.01047	-0.01270					
р. Авача	0.10151	0.02744	0.11317	0.07297	0.04825	-0.01062	-0.01605	-0.01229				
р. Жупанова	0.07561	0.01118	0.08475	0.04986	0.03453	-0.02365	-0.01373	-0.01602	-0.01206			
р. Камчатка	-0.00068	0.01753	0.04697	0.01405	0.01710	0.05367	0.03639	0.03386	0.04731	0.02959		
р. Большая	0.01984	-0.00094	0.00292	-0.00828	0.00202	0.06548	0.04443	0.03539	0.05838	0.03847	0.00843	
р. Пахача	0.05621	0.08053	-0.00830	-0.00691	-0.00164	0.28914	0.20344	0.20009	0.25068	0.18152	0.05742	0.00461

Таблица 8. Уровни значимости различий между популяциями чавычги на основе значений F_{st} (по материалам табл. 7)

Популяции	р. Палана	р. Тигиль	р. Пымта	р. Утка	Олюторский залив	р. Коль	р. Воровская	р. Кихчик	р. Авача	р. Жупанова	р. Камчатка	р. Большая
р. Тигиль	0.045 ± 0.0034											
р. Пымта	0.007 ± 0.0013	0.042 ± 0.0039										
р. Утка	0.124 ± 0.0059	0.227 ± 0.0061	0.113 ± 0.0056									
Олюторский залив	0.048 ± 0.0037	0.177 ± 0.0082	0.054 ± 0.0046	0.333 ± 0.0070								
р. Коль	0.008 ± 0.0018	0.100 ± 0.0055	0.000 ± 0.0000	0.002 ± 0.0008	0.007 ± 0.0014							
р. Воровская	0.017 ± 0.0020	0.180 ± 0.0068	0.002 ± 0.0008	0.012 ± 0.0020	0.048 ± 0.0035	0.999 ± 0.0000						
р. Кихчик	0.031 ± 0.0036	0.491 ± 0.0087	0.009 ± 0.0018	0.057 ± 0.0046	0.041 ± 0.0035	0.999 ± 0.0000	0.999 ± 0.0000					
р. Авача	0.012 ± 0.0022	0.118 ± 0.0060	0.001 ± 0.0006	0.007 ± 0.0014	0.031 ± 0.0026	0.999 ± 0.0000	0.999 ± 0.0000	0.999 ± 0.0000				
р. Жупанова	0.049 ± 0.0032	0.269 ± 0.0075	0.007 ± 0.0017	0.042 ± 0.0033	0.070 ± 0.0043	0.999 ± 0.0000	0.999 ± 0.0000	0.999 ± 0.0000	0.999 ± 0.0000			
р. Камчатка	0.353 ± 0.0089	0.141 ± 0.0062	0.017 ± 0.0022	0.150 ± 0.0060	0.105 ± 0.0045	0.013 ± 0.0017	0.046 ± 0.0036	0.083 ± 0.0051	0.038 ± 0.0035	0.091 ± 0.0057		
р. Большая	0.113 ± 0.0047	0.384 ± 0.0095	0.305 ± 0.0083	0.665 ± 0.0079	0.309 ± 0.0007	0.006 ± 0.0013	0.020 ± 0.0022	0.064 ± 0.0048	0.007 ± 0.0013	0.049 ± 0.0033	0.188 ± 0.0060	
р. Пахача	0.179 ± 0.0078	0.075 ± 0.0044	0.516 ± 0.0087	0.499 ± 0.0087	0.369 ± 0.0085	0.010 ± 0.0015	0.029 ± 0.0033	0.030 ± 0.0034	0.018 ± 0.0027	0.045 ± 0.0040	0.060 ± 0.0039	0.294 ± 0.0076

Примечание. Жирным шрифтом обозначены статистически значимые различия между парами популяций ($P < 0.05$).

Таблица 9. Матрица нуклеотидной дивергенции мтДНК между популяциями чавычи

Популяции	р. Палана	р. Тигиль	р. Пымта	р. Утка	Олюторский залив	р. Коль	р. Воровская	р. Кихчик	р. Авача	р. Жупанова	р. Камчатка	р. Большая
р. Тигиль	2.255E-04											
р. Пымта	2.258E-04	1.786E-05										
р. Утка	1.139E-04	4.825E-05	-2.168E-05									
Олют. залив	2.168E-04	3.536E-05	-1.657E-05	-1.706E-05								
р. Коль	1.886E-04	8.776E-06	7.508E-05	8.431E-05	6.417E-05							
р. Воровская	2.062E-04	3.332E-06	4.581E-05	5.853E-05	3.471E-05	2.251E-06						
р. Кихчик	2.383E-04	-2.136E-06	6.246E-05	9.014E-05	6.363E-05	-4.680E-08	2.069E-06					
р. Авача	2.191E-04	5.824E-06	6.271E-05	7.945E-05	5.182E-05	5.911E-08	-2.571E-06	-3.744E-08				
р. Жупанова	1.550E-04	8.795E-06	7.538E-05	7.627E-05	6.456E-05	-1.034E-05	2.341E-06	-7.800E-08	9.851E-08			
р. Камчатка	2.387E-05	5.434E-05	6.710E-05	1.883E-05	5.632E-05	3.696E-05	4.196E-05	6.281E-05	5.275E-05	1.954E-05		
р. Большая	1.231E-04	1.016E-05	-1.855E-05	-2.677E-05	-3.224E-06	4.438E-05	2.693E-05	4.430E-05	4.246E-05	3.758E-05	7.853E-06	
р. Пахача	1.215E-04	1.753E-05	-7.381E-05	-9.706E-05	-8.502E-05	5.940E-05	8.886E-06	5.853E-05	3.503E-05	5.986E-05	4.639E-06	-6.207E-05

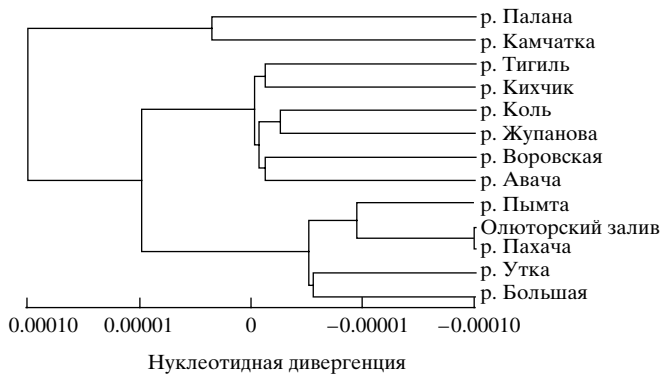


Рис. 3. UPGMA-фенограмма, иллюстрирующая генетические различия между локальными популяциями чавычи Камчатки.

сколькой меньшей степени – из рек Воровская, Коль и Авача.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на достоверный уровень гетерогенности чавычи на изучаемой части ареала по структуре мтДНК, межпопуляционная дивергенция в целом невелика даже с учётом того, что в отдельных случаях степень выраженности отличий между популяциями достигает значимого уровня.

Матрица дивергенции по нуклеотидным последовательностям между популяциями чавычи приведена в табл. 9. Как видно, максимальное значение различий (около 0.02% нуклеотидных замен) прослеживается между выборкой из р. Палана и остальными. Фенограмма на основе матрицы (табл. 9) представлена на рис. 3. Камчатские популяции в соответствии с уровнем нуклеотидной дивергенции сформировали три кластера, каждый из которых включает выборки, имеющие относительно близкие значения данного показателя. В наиболее дифференцированный кластер вошли популяции рек Палана и Камчатка. Кластер с несколько меньшими генетическими расстояниями между образовавшими его выборками включает популяции рек Тигиль, Кихчик, Коль, Жупанова, Воровская и Авача. В третьем кластере объединены популяции, нуклеотидная дивергенция между которыми оказалась минимальной – рр. Большая, Утка, Пымта, а также выборки из Олюторского залива. Можно отметить, что расположение популяций на дендрограмме на основе изменчивости структуры мтДНК не показывает четкой дифференциации популяций чавычи Западной и Восточной Камчатки.

Полученные данные были проанализированы также с использованием программы AMOVA (Analysis of Molecular Variance) в пакете программ Arlequin2000. В одном варианте анализировали всю совокупность выборок. Расчеты показали,

что на долю внутрипопуляционной генетической дисперсии приходится 95.98%, на долю межпопуляционной – 4.02%. В другом варианте расчета популяции объединяли в две группы в соответствии с географической принадлежностью – Западная Камчатка и Восточная Камчатка. При таком объединении выявляется близкая к нулю величина изменчивости, приходящаяся на межгрупповую компоненту. Доля межпопуляционной дисперсии внутри групп и доля внутрипопуляционной изменчивости меняются незначительно по сравнению с предыдущим вариантом анализа.

Вероятной причиной относительно неглубокой дивергенции камчатских популяций чавычи по структуре мтДНК может являться их исторически недавнее происхождение в сочетании с относительно более низкой, чем у других тихоокеанских лососей, скоростью смены поколений, обратная зависимость между которой и уровнем изменчивости мтДНК других видов лососей была показана ранее [4]. Можно предположить, что относительно небольшая глубина межпопуляционной дивергенции свидетельствует о независимой эволюции камчатских популяций в течение исторически небольшого временного периода, что подтверждается также низкой – менее 5% долей генетической изменчивости, приходящейся на межпопуляционную компоненту. Если принять во внимание существующие оценки скорости накопления нуклеотидных замен в мтДНК наземных позвоночных – 2% замен нуклеотидов в течение 1 млн. лет [7, 31], и допустить, что у тихоокеанских лососей приблизительно калибровка “молекулярных часов” соответствует еще меньшей скорости дивергенции пары нуклеотидных последовательностей, равной 1% за 1 млн. лет [32], то с учетом того, что выявленная величина различий между популяциями камчатской чавычи составляет около 0.02%, максимальное время дивергенции соответствует оценке во временном интервале, не превышающем 10–20 тыс. лет. Вероятно, отступление позднплейстоценового ледника (от 10 до 18 тыс. лет назад [33]) обусловило начало процессов расселения, реколонизации и формирования современной картины подразделенности вида на структурные компоненты – популяции.

Авторы благодарят О.Н. Сараванского, Е.Н. Збоеву, Р.А. Збоева, А.Г. Стегару, Н.М. Кинас, С.А. Травина за помощь в сборе материала в сложных условиях труднодоступных районов Камчатки.

Настоящее исследование частично финансировалось грантами ДВО РАН 06-I-П10-015 и 06-I-П11-025.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1983. 238 с.
2. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 287 с.
3. Варнавская Н.В. Принципы генетической идентификации популяций тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* spp. в связи с задачами рационального промысла: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: ИОГен РАН, 2001. 48 с.
4. Брыков В.А. Эволюция генома, изменчивость и дивергенция ДНК у морских животных: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: ИОГен РАН, 2001. 48 с.
5. Чуриков Д.Ю. Генеалогия гаплотипов митохондриальной ДНК у нескольких видов тихоокеанских лососей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: СПбГУ, 2001. 17 с.
6. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. 2002. Т. 38. № 9. С. 1173–1195. (Altukhov Yu.P., Salmenkova E.A. DNA polymorphism in population genetics // Rus. J. Genetics 2002. V. 38. № 9. P. 989–1008.)
7. Avise J.C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. N.Y.; London: Chapman and Hall, 1994. 511 p.
8. Avise J.C. Phylogeography. The history and formation of species. Cambridge MA, London: Harvard Univ. Press, 2000. 447 p.
9. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
10. Полякова Н.Е., Малинина Т.В., Галеев А.В. и др. Изменчивость митохондриальной ДНК у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) // Генетика. 1992. Т. 28. № 12. С. 122–129.
11. Брыков В.А., Полякова Н.Е., Скурихина Л.А. и др. Популяционно-генетическая структура у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестрикционного анализа митохондриальной ДНК: временная гетерогенность в период нерестового хода // Генетика. 1999. Т. 35. № 5. С. 666–673. (Brykov V.A., Polyakova N.E., Skurikhina L.A. et al. Population-genetic structure of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) inferred from the restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA: Temporal heterogeneity at the period of spawning run // Rus. J. Genetics. 1999. V. 35. № 5. P. 560–566.)
12. Брыков В.А., Полякова Н.Е., Скурихина Л.А. и др. Популяционно-генетическая структура у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестрикционного анализа митохондриальной ДНК: динамика изменчивости в поколениях // Генетика. 1999. Т. 35, № 5. С. 657–665. (Brykov V.A., Polyakova N.E., Skurikhina L.A. et al. Population-genetic structure of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) inferred from the restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA: Variation between generations // Rus. J. Genetics. 1999. V. 35. № 5. P. 552–559.)
13. Brykov V.A., Polyakova N.E., Skurikhina L.A., Kukhlevsky A.D. Geographical and temporal mitochondrial DNA variability in populations of pink salmon // J. Fish. Biol. 1996. V. 48. P. 899–909.
14. Брыков В.А., Полякова Н.Е., Подлесных А.В. и др. Влияние биотопов размножения на генетическую дифференциацию популяций нерки *Oncorhynchus nerka* // Генетика. 2005. Т. 41. № 5. С. 635–645. (Brykov V.A., Polyakova N.E., Podlesnykh A.V. et al. The effect of reproduction biotopes on the genetic differentiation of populations of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* // Rus. J. Genetics. 2005. V. 41. № 5. P. 509–517.)
15. Брыков В.А., Полякова Н.Е., Подлесных А.В. Дивергенция митохондриальной ДНК в популяциях нерки (*Oncorhynchus nerka* Walbaum) озера Азабачьего (Камчатка) // Генетика. 2003. Т. 39. № 12. С. 1687–1692. (Brykov V.A., Polyakova N.E., Podlesnykh A.V. Divergence of mitochondrial DNA in populations of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* Walbaum from Azabach'e lake (Kamchatka) // Rus. J. Genetics. 2003. V. 39. № 12. P. 1432–1437.)
16. Варнавская Н.В., Шнигальская Н.Ю., Шаповалов Р.А. Изменчивость частот ферментных генов в популяциях чавычи, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), Азии // Популяционная биология, генетика и систематика гидробионтов: Сб. научных трудов КамчатНИРО. Петропавловск-Камчатский: Изд-во КамчатНИРО, 2005. Т. 1. С. 28–62.
17. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
18. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification / Ed. Erlich H.A. Stockton Press, 1989. 246 p.
19. Gharrett A.J., Gray A.K., Brykov V.A. Phylogeographical analysis of mitochondrial DNA variation in Alaskan coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* // Fish. Bull. 2001. V. 99. P. 528–544.
20. Zardoya R., Garrido-Pertierra A., Bautista J.M. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // J. Mol. Evol. 1995. V. 41. P. 942–951.
21. Wilhelm V., Villegas J., Miquel A. et al. The complete sequence of the mitochondrial genome of the chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* // Biological Research. 2003. V. 36. P. 223–231.
22. McElroy D.M., Moran P., Bermingham E., Kornfield I. REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data // J. Heredity. 1992. V. 83. P. 153–158.
23. Nei M., Tajima F. Maximum likelihood of the number of nucleotide substitution from restriction sites data // Genetics. 1983. V. 105. P. 207–217.
24. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for shifting genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5269–5273.
25. Rolf F.J. NTSYS-ps: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version. 1.60. N.Y.: Exter Publ. Ltd, 1990.
26. Schneider S., Roessli D., Excoffier L. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Switzerland: Univ. Geneva, 2000.

27. Zaykin D.V., Pudovkin A.I. Two programs to estimate significance of Chi-square values using pseudo-probability test // *J. Heredity*. 1993. V. 84. P. 152.
28. Churikov D.U., Matsuoka M., Luan X. et al. Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) // *Mol. Ecol.* 2001. V. 19. № 9. P. 2329–2339.
29. Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic distances // *Mol. Biology and Evolution*. 1992. V. 5. P. 552–569.
30. Rogers A.R. Genetic evidence for Pleistocene population explosion // *Evolution*. 1995. V. 49. P. 608–615.
31. Avise J.C., Walker D., Johns G.C. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography // *Pr. R. Soc. Lond. B*. 1998. V. 265. P. 1707–1712.
32. Smith G.R. Introgression in fishes: Significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates // *Systematic Biology*. 1992. V. 41. P. 41–57.
33. Брайцева О.А., Мелекесцев И.В., Евтеева И.С., Луникина Е.Г. Стратиграфия четвертичных отложений и оледенения Камчатки. М.: Наука, 1968. 266 с.

Variation of Mitochondrial DNA in Chinook Salmon *Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum Populations from Kamchatka

N. Yu. Shpigalskaya^a, Vl. A. Brykov^b, A. J. Gharrett^c, A. D. Kuhlevsky^b,
R. A. Shaporev^a, and N. V. Varnavskaya^a

^a Kamchatka Research Institute of Fishery and Oceanography, Petropavlovsk-Kamchatskii, 683602 Russia;
e-mail: shpigalskaya@kamniro.ru

^b Institute of Marine Biology, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 69041 Russia;
e-mail: vladbrykov@hotmail.com

^c School of Fishery and Ocean Sciences, Fairbanks Institute of Alaska, AK 99801 United States

Abstract—The variation in mitochondrial DNA (mtDNA) structure among Chinook Salmon *Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum populations from Kamchatka was inferred from restriction length polymorphism analysis using eight restriction endonucleases. The nucleotide sequence variation in three amplified mtDNA regions was examined at seven polymorphic restriction sites in 579 fish from 13 localities. Based on the frequencies of 11 combined haplotypes and the number of nucleotide substitutions, the among- and within-population variation was estimated. The heterogeneity test showed highly significant differences among all the populations. The estimated maximum time of independent divergence of the Asian Chinook salmon populations, whose differences was about 0.02% nucleotide substitutions, did not exceed 10000–20000 years. Apparently, the retreat of the late Pleistocene glacier triggered spreading, recolonization, and formation of the present-day pattern of the species subdivision into structural components.