

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА
Российской академии наук

На правах рукописи

ЮРЧЕНКО Андрей Александрович

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ САХАЛИНСКОГО ТАЙМЕНЯ
PARANUSCHO PERRYI BREVOORT И ВОПРОСЫ ПРИРОДООХРАННОЙ
ГЕНЕТИКИ ВИДА**

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание учёной
степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., профессор Животовский Л. А.

Москва – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Современный и исторический ареал вида.....	10
1.2. Филогенетические отношения сахалинского тайменя.....	11
1.3. Биология вида и миграционное поведение.....	13
1.4. Сокращающаяся численность сахалинского тайменя.....	22
1.5. Основные угрозы сахалинскому тайменю.....	28
1.6. Популяционно-генетические системы видов.....	31
1.7. Метапопуляции	32
1.8. Метапопуляционная концепция для лососевых рыб	34
1.9. Различные уровни для сохранения биоразнообразия: виды, эволюционно-значимые единицы, единицы запаса	38
1.10. Генетические риски при сохранении видов и популяций.....	45
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	57
2.1. Сбор образцов для исследования.....	57
2.2. Разработка панели микросателлитных локусов, генотипирование образцов и секвенирование фрагментов митохондриальной ДНК	59
2.3. Статистический анализ данных.....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	73
3.1. Отклонения от равновесия Харди-Вайнберга и популяционно-генетическая дифференциация выборок	73
3.2. Кластеризация особей на основе попарных индивидуальных расстояний и методом анализа в пространстве главных компонент.....	76
3.3. Кластеризация выборок в пространстве главных компонент и на основе попарных генетических расстояний	80
3.4. Выявление иерархической популяционной структуры с использованием алгоритма программы <i>STRUCTURE</i>	85
3.5. Изоляция расстоянием	89
3.6. Микросателлитное генетическое разнообразие и оценка эффективной численности популяций сахалинского тайменя	91
3.7. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA).....	95
3.8. Филогенетический анализ фрагментов митохондриальной ДНК сахалинского тайменя	96
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	102
4.1. Популяционно-генетическая дифференциация популяций сахалинского тайменя	102
4.2. Иерархическая структура популяций сахалинского тайменя на ареале вида	103
4.3. Зоогеографические регионы Дальнего Востока и группы популяций сахалинского тайменя.....	106
4.4. Формирование генетической структуры популяций сахалинского тайменя.....	110
4.5. Генетическое разнообразие популяций сахалинского тайменя и избежание негативных последствий искусственного разведения вида.....	114
4.6. Заключение.....	118
4.7. Перспективы дальнейшей разработки темы.....	120
ВЫВОДЫ	121
БЛАГОДАРНОСТИ.....	123
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
ПРИЛОЖЕНИЕ	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Лососевые рыбы семейства *Salmonidae* являются одним из главных богатств Дальневосточного Региона России и всей северной части Тихого океана. Всего, в российской части этого региона обитает более 14 видов представителей семейства лососевых, составляющих пять родов и относящихся к трем основным экологическим группам: проходные рыбы (горбуша, кета, сима и др.), полупроходные рыбы (сахалинский таймень, кунджа, мальма и др.), пресноводные рыбы (сибирский таймень, ленок и др.). Все эти виды играют важнейшую роль в речных и прибрежных экосистемах Дальнего Востока, являясь как источником пищи для других рыб и животных, так и ее потребителями (Гриценко, 2002). Проходные лососи, помимо прочего, приносят из богатых районов Тихого океана огромное количество питательных веществ, которые питают относительно бедные горные водотоки, долины которых пронизывают прибрежные экосистемы Северной Пацифики от таежных массивов юга Сихоте-Алиня до густонаселенных низменностей Калифорнии (Hocking, Reimchen, 2006; Hocking, Reynolds, 2011). Крайне важную роль лососевые рыбы играют в экономике Северной Пацифики – промышленные уловы многих видов (горбуша, кета) исчисляются сотнями тысяч тонн, другие же виды играют важную роль для местного промысла (мальма, кунджа, хариус).

Активная хозяйственная деятельность по разработке природных богатств (вырубка леса, добыча угля, нефти, газа), искусственное разведение лососёвых рыб, интенсивный промышленный и браконьерский промысел способны подорвать создававшиеся тысячелетиями связи лососей и экосистем, в которых они обитают, привести к деградации популяционных генофондов видов (Алтухов, 2004).

Гены, виды и экосистемы – три основных уровня разнообразия, определенных Международным Союзом Охраны Природы МСОП (Allendorf, Luikart, 2009). Сохранение генофондов видов, при этом, играет важнейшую роль для их долговременного существования, а долговременный устойчивый промысел

невозможен без определения единиц запаса, границ популяций и должен базироваться на популяционно-генетических данных, позволяющих достоверно описать созданную тысячами эволюционной истории современную популяционную структуру видов (Алтухов, 2004; Животовский и др., 2009)

Среди всех лососевых рыб, обитающих в российской части Тихого океана, единственным видом, занесенным как в Красную Книгу Российской Федерации, так и в Красную Книгу Международного союза охраны природы (IUCN Red list., 2011) стал уникальный полупроходной вид семейства лососевых, сахалинский таймень *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856). Этот вид обладает рядом особенностей (частые миграции, долгий жизненный цикл), которые делают его крайне уязвимым к антропогенным воздействиям и изменениям климата. Выявление и описание популяционной структуры сахалинского тайменя с использованием молекулярных маркеров ДНК представляется неотложной задачей на пути создания эффективной программы по восстановлению и сохранению этого вида. Уникальные свойства сахалинского тайменя (полупроходной образ жизни – совмещение длинной пресноводной и морской стадии, разнообразные регионы обитания, исторически низкая эффективная численность), делают его также важным объектом для изучения влияния антропогенного воздействия на популяционно-генетические системы лососевых рыб.

Степень разработанности темы исследования. Исследованиям популяционно-генетических основ сохранения генофондов лососевых рыб посвящено множество работ, как в отечественной (Алтухов, 1974; Салменкова, 1989; Алтухов и др., 1997, 2004; Животовский и др., 2008, 2009), так и в международной литературе (Waples, 1991, 2002; Allendorf, Waples, 1996; Verspoor et al., 2008). При этом, большая часть исследований касалась интенсивно эксплуатируемых видов тихоокеанских лососей, а полупроходным и хозяйственно менее значимым видам до последнего времени уделялось мало внимания. Большая часть работ, связанных с сахалинским тайменем, посвящена изучению его биологии и образа жизни, а также процессов, связанных со

снижением численности (глава 1). Несмотря на российский и международный «краснокнижный» статус сахалинского тайменя, широкомасштабных исследований по выявлению его популяционной структуры и оценке уровней генетического разнообразия до настоящей работы не проводилось, за исключением анализа небольших выборок с очень ограниченной части ареала по локусам митохондриальной ДНК (Скурихина и др., 2013), а также четырех работ по разработке микросателлитных и митохондриальных молекулярных ресурсов для дальнейших исследований (Hatakeyama et al., 2005; Korun et al., 2009; Шитова и др., 2012; Shedko et al., 2013).

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является описание популяционно-генетической структуры сахалинского тайменя *Parahucho perryi* и разработка практических рекомендаций по сохранению популяционных генофондов вида на основе анализа молекулярных маркеров ДНК.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать эффективную панель микросателлитных маркеров ДНК для анализа популяционно-генетической структуры сахалинского тайменя *Parahucho perryi*.
2. Обеспечить выборки сахалинского тайменя с большей части ареала вида.
3. Генотипировать образцы ДНК сахалинского тайменя по разработанной панели микросателлитных локусов.
4. Провести статистический анализ внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости сахалинского тайменя по микросателлитным локусам ДНК.
5. Секвенировать последовательности участков митохондриальных генов *Co-1* и *CytB*.
6. Провести филогеографический анализ на основе полиморфизма митохондриальных нуклеотидных последовательностей.

7. Выработать рекомендации по сохранению популяционных генофондов сахалинского тайменя на основе полученных результатов популяционно-генетического анализа.

Научная новизна работы. В данной работе впервые описывается генетическая структура популяций редкого эндемичного вида рыб сахалинского тайменя *Parahucho perryi* с использованием репрезентативного набора ядерных (микросателлиты, 19 локусов), а также митохондриальных (2 фрагмента) маркеров. Для этого были исследованы уникальные выборки, собранные на водоемах Дальнего Востока России, в том числе автором, непосредственно в ходе выполнения работы. Выборки, используемые в работе, покрывают большую часть современного ареала вида. Впервые даются рекомендации по сохранению популяционных генофондов вида, обоснованные с позиций природоохранной генетики.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, могут быть использованы для разработки эффективных, научно обоснованных планов по сохранению и восстановлению популяций сахалинского тайменя. Особенно важны полученные данные при планировании реинтродукции сахалинского тайменя, искусственном разведении вида, требующем учета популяционно-генетической структуры. Полученные результаты могут служить отправной точкой для объективного мониторинга популяционных генофондов сахалинского тайменя, в том числе методами активно развивающейся популяционной геномики. Уникальная коллекция проб сахалинского тайменя, собранных в ходе работы, может быть использована для дальнейшего генетического мониторинга вида.

С теоретической точки зрения, результаты могут быть использованы для сравнительной филогеографии рыб Дальнего Востока России, построения биогеографических гипотез. Работа значительно дополняет собой активно развивающееся направление в изучении популяционно-генетических структур

полупроходных видов рыб, распространенных в прибрежных регионах Тихого океана.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Промежуточные и итоговые результаты работы были представлены автором на международной молодёжной конференции "Популяционная генетика: современное состояние и перспективы" (Москва, 2011), 5-ом всероссийском конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012), 16-ой и 17-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2012 - 2013), 20-й международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2013), конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» (Ростов-на-Дону, 2013). Материалы исследования были представлены на итоговых годовых сессиях аспирантов ИОГен РАН в 2011 и 2012 годах. Апробация работы проходила 11 декабря 2014 года на семинаре отдела генетики популяций и природопользования ИОГен РАН.

Положения, выносимые на защиту.

1. Популяционно-генетическая структура сахалинского тайменя является иерархически организованной с высокими значениями популяционно-генетической дифференциации на разных уровнях иерархии.
2. Наблюдаемая по частотам ядерных маркеров ДНК дивергенция групп популяций вызвана скорее малой эффективной численностью и ограниченной частотой миграций между группами, обусловленной, в том числе, природно-географическими условиями мест обитания, чем долговременной изоляцией в ледниковых рефугиумах или современных местах обитания.
3. Работы по реинтродукции и искусственному разведению сахалинского тайменя должны учитывать особенности описанной генетической структуры популяций сахалинского тайменя во избежание деградации популяционных генофондов вида. Производители должны отбираться из того водоема, в котором планируется

выпуск молоди. При невозможности отбора производителей из этого водоёма, они должны быть взяты из популяций того же зоогеографического региона, принадлежащих к одной генетической группе популяций.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК и зарубежных рецензируемых журналах

1. Шитова М.В. Панель микросателлитных локусов для популяционных исследований сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort) / М.В. Шитова, **А. А. Юрченко**, Е. Г. Шайхаев, Л.А. Животовский // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 8- С. 976-982.

2. Zhivotovsky L. Eco-geographic units, population hierarchy, and a two-level conservation strategy with reference to a critically endangered salmonid, Sakhalin taimen *Parahucho perryi* / L. Zhivotovsky*, **A. Yurchenko***, V. Nikitin, S. Safronov, M. Shitova, S. Zolotukhin, S. Makeev, S. Weiss, P. Rand, A. Semchenko // Conservation Genetics – 2015. – Т. 16 – № 2 – 431–441с.

Работы, опубликованные в других изданиях

1. **Юрченко А.А.** Популяционно-генетическая дифференциация сахалинского тайменя (*Parahucho perryi*) / **А.А. Юрченко**, М.В. Шитова, А.Ю. Семенченко, Л.А. Животовский // Международная молодежная конференция «Популяционная генетика : современное состояние и перспективы». Материалы конференции. М.: Цифровичок – 2011. – С. 270

2. Zhivotovsky L.A. What is a conservation unit for Sakhalin taimen (*Parahucho perryi*)?: Genetics & Geography / L.A. Zhivotovsky, **А.А. Yurchenko**, M.V. Shitova, A.Yu. Semchenko, S. F. Zolotukhin, S.N. Safronov // Taimen workshop, 2011, December 9-10, Auckland, New Zealand <http://www.stateofthesalmon.org/pdfs/4_Zhivotovsky.pdf>

3. **Юрченко А.А.** Популяционно-генетическая структура сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) по 19 микросателлитным локусам ДНК и выводы для сохранения вида / **А.А. Юрченко**, М.В. Шитова, А.Ю. Семенченко, С.Ф. Золотухин, С.Н. Сафронов, Л.А. Животовский // V Всероссийский медико-биологический Конгресс молодых учёных с международным участием «Симбиоз-Россия 2012». 03-08 декабря 2012 г. Тверь. С. 134-135

4. **Юрченко А.А.** Популяционно-генетическая структура сахалинского тайменя *Parahucho perryi* Brevoort, 1856 по 19 микросателлитным локусам ДНК и выводы для сохранения популяционных генофондов вида / **А.А. Юрченко**, М.В. Шитова // Материалы Международного молодежного научного форума "ЛОМОНОСОВ-2013" / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, К.К. Андреев, М.В. Чистякова. [Электронный ресурс]. г. Москва: МАКС Пресс, 2013. С.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современный и исторический ареал вида

Сахалинский таймень *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) обитает в разнообразных природных условиях Российского Дальнего Востока и северных японских островов. Ареал вида включает водоемы острова Сахалин, япономорского побережья Приморского края и юга Хабаровского края, севера острова Хонсю, островов Хоккайдо, Итуруп и Кунашир. Современный ареал сахалинского тайменя показан на Рисунке 1.1.1. Во многих местах (в частности в Приморском крае) ареал вида разорван, что связано с исчезновением отдельных популяций. В наше время сахалинский таймень не встречается в реках залива Петра Великого, хотя еще в конце XIX века был обычной рыбой для тех мест (Крюков, 1984), а в начале 20-го века отмечался в реке Барабашевка к югу от Владивостока (Таранец, 1936). Данных об обитании сахалинского тайменя севернее устья реки Амур по материковому побережью Японского моря нет, хотя в работе Fukushima с соавторами (2011) бассейны рек на участке от Сахалинского залива до Удской губы считаются пригодными для обитания вида по совокупности своих гидроморфологических особенностей. Южной границей современного распространения сахалинского тайменя в Приморском крае принято считать реку Киевка (Золотухин, 2000). На острове Сахалин таймень встречается повсеместно, но наиболее многочисленные популяции приурочены к северным районам острова, а также отдельным водоемам. Относительно редок и малочислен сахалинский таймень в водотоках полуострова Шмидт, а также в водоемах северо-запада острова севернее реки Тык, где обитает сибирский таймень *Hucho taimen* (Сухонос и Сафронов, 2006). В водоемах Японии таймень сохранился преимущественно на острове Хоккайдо.

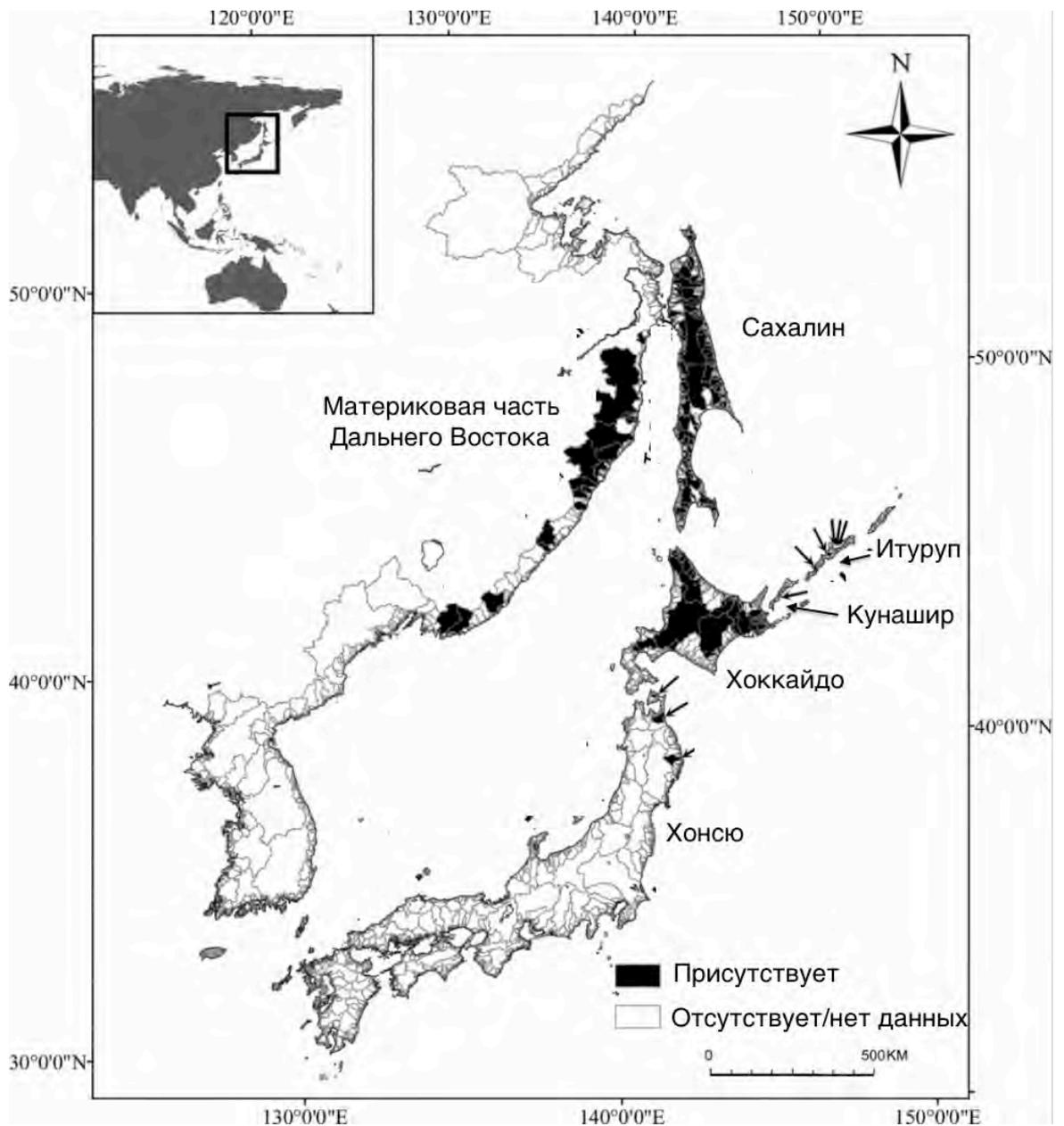


Рисунок 1.1.1. Современное распространение сахалинского тайменя *Parahucho perryi*. Черным цветом выделены бассейны рек с достоверно обитающими в них популяциями сахалинского тайменя. Черными стрелками обозначены отдельные небольшие водоемы, населенные особями вида (из Fukushima et al., 2011).

1.2. Филогенетические отношения сахалинского тайменя

Сахалинский таймень – единственный представитель своего рода *Parahucho*, занимающего филогенетическое положение в семействе Лососевые

(Salmonidae), которое включает в себя разнообразные рода эволюционно относительно молодых рыб с циркумполярным распространением. Ранее сахалинский таймень объединяли в один род (*Hucho*) с сибирским тайменем *Hucho taimen* (Pallas, 1773), но позже он был выделен в подрод (Vladykov, 1962), а затем в отдельный род *Parahucho* (Глубоковский, 1990). Выделение сахалинского тайменя, как представителя отдельного рода, было затем подтверждено данными по исследованию митохондриальной и ядерной ДНК (Осинов, 1991; Phillips, 1995; Shed'ko et al., 1996; Matveev, 2007; Олейник и Скурихина, 2008). Помимо значительных генетических различий, сахалинского тайменя отличает от рыб рода *Hucho* полупроходной образ жизни с регулярными миграциями. Морфологическое сходство рыб родов *Hucho* и *Parahucho* следует признать конвергентным, так как виды обоих родов занимают сходные экологические ниши в населенных ими водоемах (Золотухин, 2000). Согласно молекулярно-генетическим датировкам появление сахалинского тайменя относится к середине олигоцена – около 27 миллионов лет назад (Crête-Lafrenière et al, 2012). Эта информация также дополняется находкой ископаемой рыбы в Агневской свите (датируется 19-16 миллионами лет) на острове Сахалин, отнесенной к *Parahucho* spp., которая, однако, не была по своим остеологическим признакам полностью сходна с современным сахалинским тайменем (Соловьев, 1996; Назаркин, 2000). На эволюционном древе лососевых рыб сахалинский таймень занимает промежуточное положение между родами *Salvelinus* (гольцы) и *Oncorhynchus* (тихоокеанские лососи) с одной стороны и родом *Salmo* (благородные лососи) с другой (Рисунок 1.2.1).

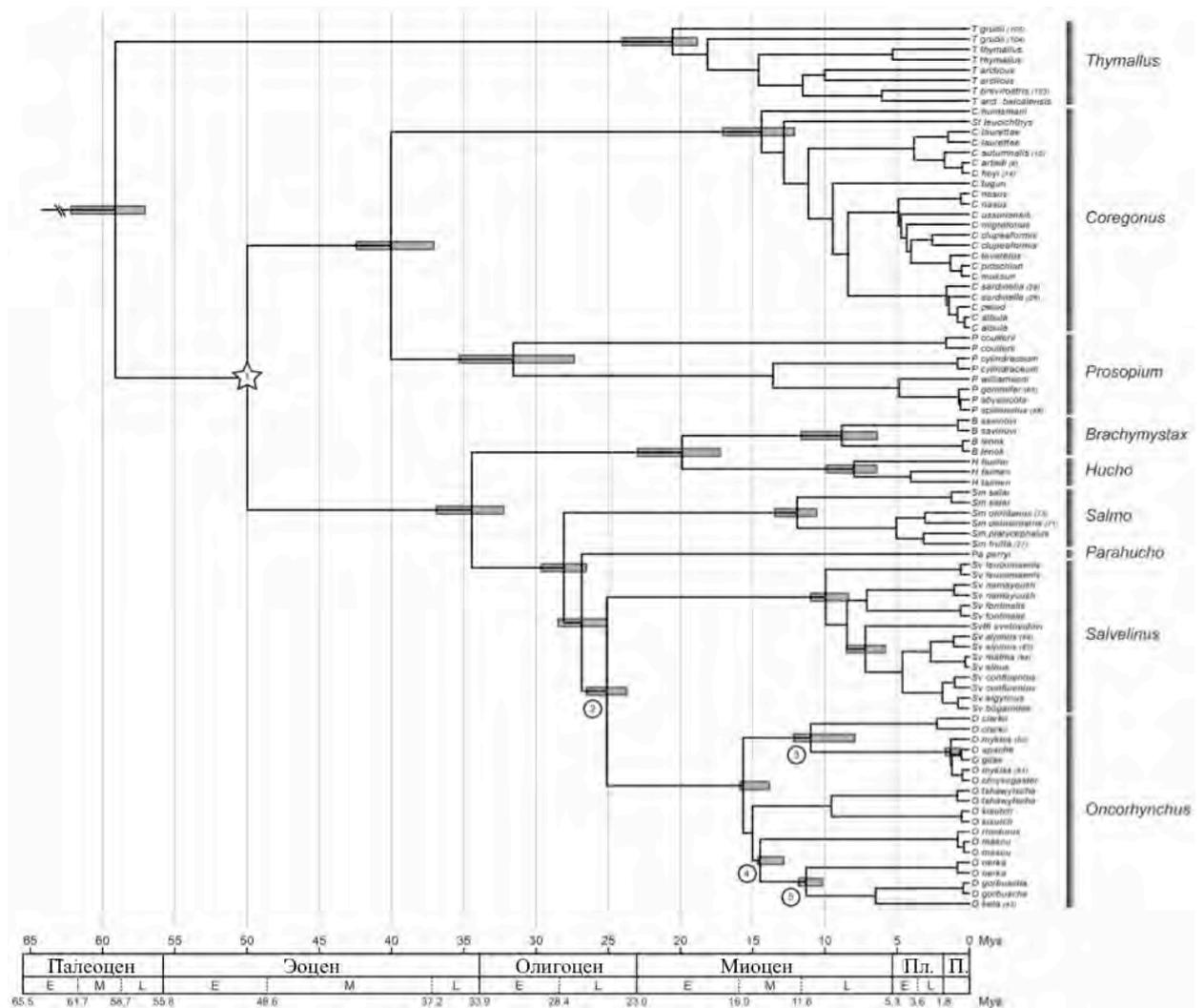


Рисунок 1.2.1. Байесовская хронограмма, построенная по митохондриальным и ядерным генам рыб семейства лососевых и откалиброванная по нескольким видам ископаемых предков современных лососевых рыб (из Crête-Lafrenière, 2012). Показаны 95% интервалы времени диверсификации таксонов.

1.3. Биология вида и миграционное поведение

По данным О. Ф. Гриценко (Гриценко, 1980) сахалинский таймень отличается большой стабильностью меристических признаков на ареале и слабо выраженным половым диморфизмом. Достоверные различия в разных частях ареала наблюдаются только по числу позвонков. Также, авторы высказывают предположение о возможной клинальной изменчивости этого признака.

Темп роста сахалинского тайменя тесно связан с особенностями водоемов, в которых он обитает и существенно отличается на ареале (Рисунок 1.3.1). Вероятно, на темп роста таймений влияют сразу несколько локальных факторов – питание младших возрастных групп, питание старших возрастных групп (выход в море или нагул в пресных водоемах), температурный режим, кормовая база водоемов.

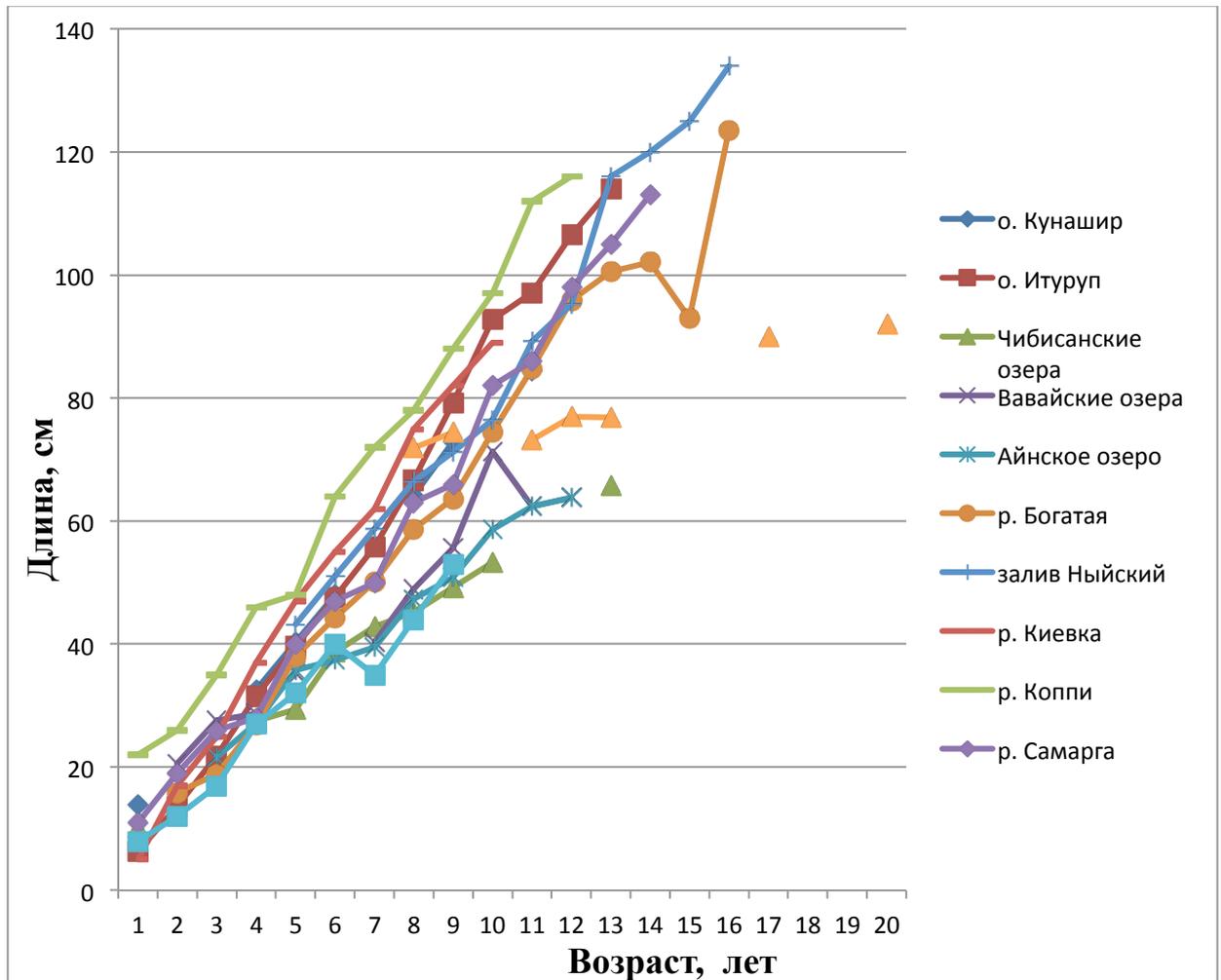


Рис. 1.3.1. Линейный рост сахалинского тайменя из разных водоемов (по материалам Yamashiro 1965; Соков, 1998; Золотухин, 2008; Борзов; Гриценко 2002;)

Сахалинский таймень является выраженным хищником, конечным звеном в пищевых цепях населенных им экосистем. Мальки тайменя постепенно переходят в реках от бентофагии к хищничеству потребляя личинок миноги и

ручейников, покатную молодь кеты. После ската в лагуны и заливы сахалинский таймень начинает активно питаться массовыми рыбами, обитающими в толще воды – сельдью, корюшкой, навагой, мойвой, а также креветками и покатной молодью миноги (Гриценко, 1977). У тайменя из озер острова Хоккайдо отмечено питание массовыми донными рыбами (Kawamura, 1983). В районе реки Самарга (север Приморского края) сахалинский таймень активно потребляет тихоокеанскую сардину, горбушу и терпуга (Парпура, 1991; Семенченко, 2003). В реках взрослые таймени обычно нападают из засады на проплывающих мимо рыб (гольцов рода *Salvelinus*, хариусов, красноперок) и грызунов подобно сибирскому тайменю и ленкам (Ondachi, 2004; Гриценко, 2007), в то время как в морском побережье, лагунах и озерах они активно гоняются за добычей, в том числе и небольшими группами.

Нерест сахалинского тайменя изучен далеко не во всех районах его воспроизводства. Регулярные наблюдения за нерестом ежегодно ведутся лишь на острове Хоккайдо. Нерест тайменя происходит в весеннее время после вскрытия льда в момент снегового паводка в речных бассейнах на песчано-галечном грунте, при температуре воды 3-12°C. По разным данным, производители начинают миграцию либо с мест зимовки в реке, либо из моря, куда выходят на короткий период перед нерестом. Нерестилища вида расположены в верховьях притоков рек. На острове Сахалин в крупных реках нерестилища расположены в верховьях, а в малых реках в нижнем и среднем течении (Гриценко, Чуриков, 1977; Гриценко, 2002). В материковых реках наиболее вероятными местами нереста считаются русловые протоки и притоки средней части бассейнов (Парпура, 1991; Золотухин и др., 2000). По данным Парпуры И.З. (1991) возраст впервые нерестующих особей 8-10 полных лет. Рыбы младшего репродуктивного возраста имеют двух-, трехгодичный цикл, а 16-19 – годовалые нерестятся ежегодно. Индивидуальная абсолютная плодовитость (ИАП) составляет 3570-16600 икринок (Гриценко, 1977; Золотухин, 2000). Типичная нерестовая станция: небольшая протока основного русла шириной 3-4 м, глубиной около 1 м со скоростью

течения 0.3-0.5 м/сек. Дно песчано-галечное. нерест происходит во второй половине мая при температуре воды 4-7 градусов. Нерестуют пары, формирование которых сопровождается «турнирами» самцов. В озерах Курильских островов отмечен нерест тайменя в ручьях впадающих в озера (Соков, 1998).

Важно представить информацию об особенностях миграций тайменя. Сахалинский таймень относится к полупроходным видам рыб, тесно связанным с пресными и солоноватоводными водоемами. Несмотря на важность вопроса о миграциях сахалинского тайменя для природоохранных целей, до недавнего времени практически не было работ, подробно освещающих эту сторону жизни данного вида. Наиболее типичным описанием миграций сахалинского тайменя было принято следующее: таймень зимует в реках и солоноватоводных озерах, весной на короткое время (еще подо льдом) скатывается в море, откуда затем начинает нерестовую миграцию в верховья малых рек и среднее течение крупных, на нерест; после нереста таймени скатываются в море, лагуны и приустьевые участки рек, где нагуливаются до осени, периодически заходя в пресную воду; в конце сентября-начале ноября начинается зимовальная миграция в реки; молодь тайменя начинает скатываться после прохождения пика весеннего паводка и заканчивает во время летней межени (Гриценко, 2002). Также, отмечалось, что в некоторых реках, как, например, в Поронае, таймень может оставаться все лето, не выходя в море (Гриценко, 1977). Если нагульные летние и зимовальная миграция подтверждались многочисленными поимками тайменя в реках и побережье, то ранее упомянутая «короткая преднерестовая миграция в море» не поддерживалась какими-либо документальными свидетельствами. В последние годы появился ряд крупных исследований, призванных подробнее осветить характер миграций сахалинского тайменя.

Единственная работа, выполненная с использованием радиометок проведена коллективом японских авторов под руководством доктора Кентаро Хонда в Университете Хоккайдо (Honda, 2012). Трехлетнее исследование проводилось на реке Беканбеуши на юге острова Хоккайдо (Рисунок 1.3.2) .

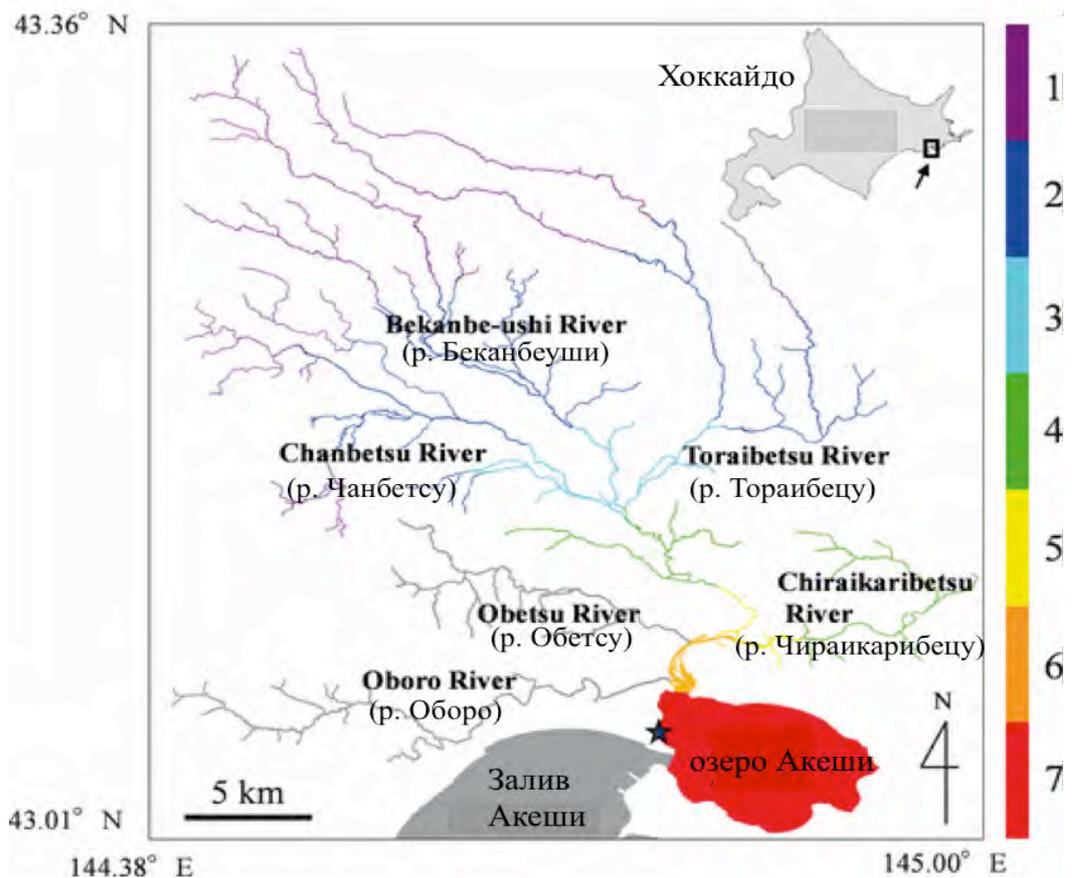


Рисунок 1.3.2. Бассейн реки Беканбеуши разделенный исследователями на семь зон (1-7) от верхнего течения к нижнему, включая озеро Аккеша (из Honda, 2012).

Авторы прикрепили радиопередатчики на 45 взрослых тайменей отловленных в бассейне реки Беканбеуши. Вдоль русла реки были установлены радиоприемники, позволявшие получать информацию о перемещении тайменей в речном бассейне и регулярно осуществлялись сплавы на каноэ с переносными радиоприемниками. Наиболее важным результатом исследования оказалась обнаруженная экологическая пластичность сахалинского тайменя: с мая по ноябрь рыбы активно использовали все основные сегменты речного бассейна. На рисунке 1.3.3 видно, что, несмотря на наличие некоторых паттернов пространственного обитания, таймени с высокой вероятностью встречаются во всех сегментах речного бассейна и в озере Аккеша. Весной, после нереста, рыбы активно мигрируют вниз по течению, занимая различные места обитания. Затем,

летом, рыбы не перестают перемещаться, и большинство тайменей за летний сезон успевает побывать в 2-3 притоках реки. Миграции, по данным авторов, осуществляются чаще в темное время суток, в то время как днем рыбы чаще отстаиваются и передвигаются мало. Авторы работы приходят к выводу, что таймень старается избегать температуры воды выше 20°C, которая, по-видимому, является для него стрессовой. Было зафиксировано всего несколько выходов тайменя из озера Акеша в море, ни один из которых не продлился более чем 1 день. Таким образом, популяция тайменя реки Беканбеуши может считаться пресноводной.

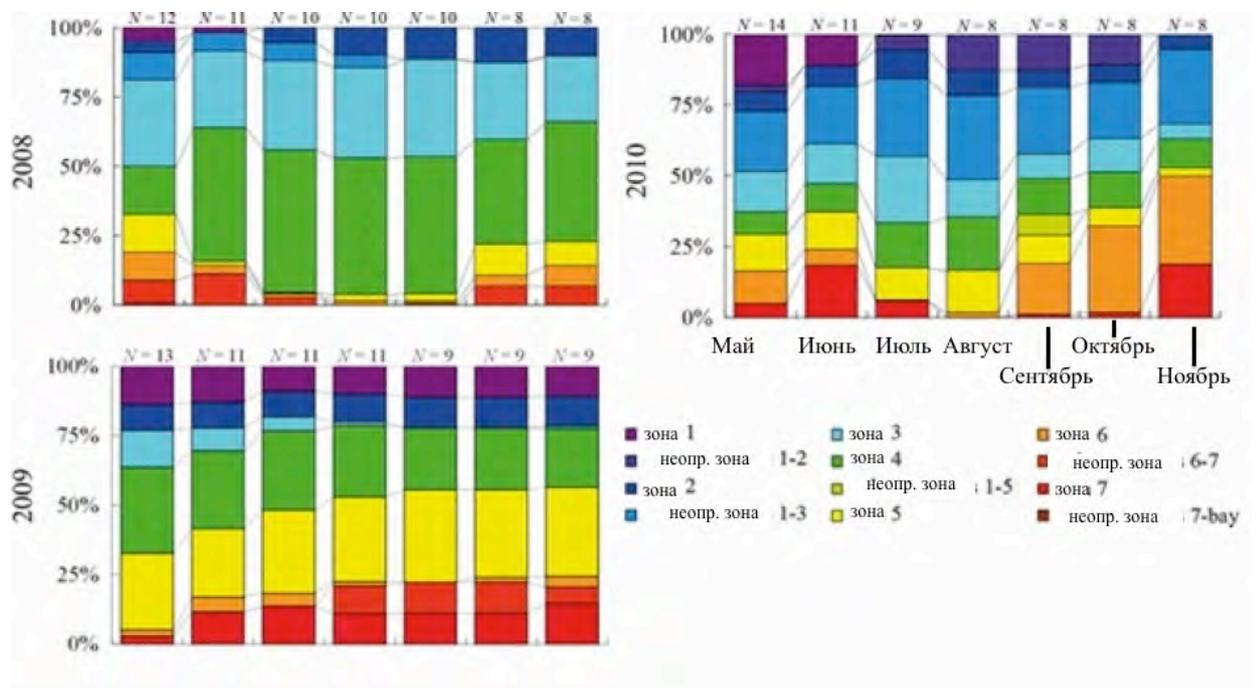


Рисунок 1.3.3. Места обитания меченных сахалинских тайменей в бассейне реки Беканбеуши с мая по ноябрь (из Honda, 2012). Цвета соответствуют обозначениям речных сегментов на рисунке 1.3.4.

Использование эффекта дифференциального накопления кальция и стронция в костных структурах анадромных рыб получило широкое распространение сравнительно недавно (Zimmerman, 2005). В специальной работе (Arai, 2010) авторами исследовалось соотношение кальция и стронция в отолитах искусственно разводимых особей сахалинского тайменя, подвергнутых

экспозиции в воде различной солености (Рисунок 1.3.4). Наблюдается четкая и высокая корреляция между соленостью воды, в которой содержались таймени и соотношением стронция и кальция в отолитах. Нужно отметить, что сходные паттерны можно обнаружить у рыб в пресноводной среде, но при активном питании морскими, недавно вошедшими в реку видами.

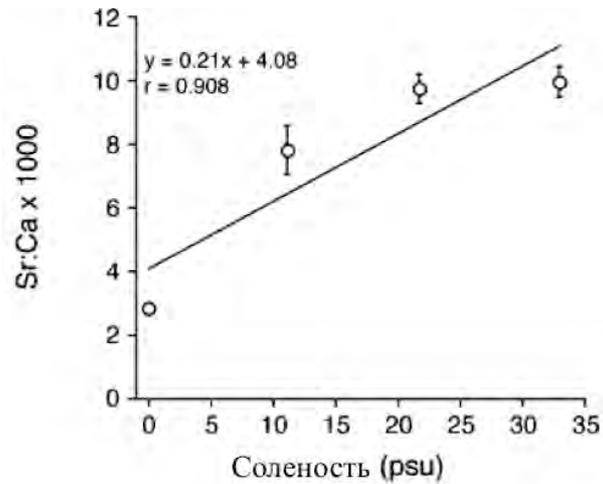


Рисунок 1.3.4 Зависимость между соотношением стронция и кальция и соленостью воды в отолитах искусственно разводимого сахалинского тайменя (из Arai, 2010).

С использованием данной методики, за последние годы было проведено несколько исследований на диких популяциях вида. В озере Акеши (место впадения реки Беканбеуши) на юге Хоккайдо, весной, авторами работы (Honda, 2010) было собрано десять особей сахалинского тайменя, погибших при промысле разнорыбицы в озере. У большинства особей паттерн соотношения стронция и калия был сходным – низкие значения в начальный период и на протяжении всей жизни. Тем не менее, у некоторых особей отмечалось повышенное соотношение в последние годы жизни. Авторы связывают это с обитанием в солоноватоводных условиях озера Акеши, отмечая, что большая часть данной популяции все же ведет пресноводный образ жизни, стараясь избегать морских вод.

В другой работе (Suzuki, 2011) были исследованы отолиты тайменей, пойманных в Охотском море недалеко от реки Сарафуцу (одна из наиболее богатых тайменем рек острова Хоккайдо). Паттерны соотношения стронция/кальция показали, что вероятно все рыбы провели большую часть жизни в условиях высокой солености.

Авторы статьи обсуждают также возможный возраст первого ската тайменя в море и приходят к выводу, что он может происходить как в 2, так и в 3-4 года. Значительную разницу в образе жизни тайменей рек Беканбеуши и Сарафуцу авторы связывают с геоморфологией их бассейнов: река Сарафуцу имеет прямой вынос в море, без сколько-нибудь продолжительного эстуария, а Беканбеуши впадает в солоноватоводное озеро.

В работе Кристиана Циммермана с соавторами (Zimmerman et al, 2012) исследуются рыбы все с той же реки Сарафуцу, а также Коппи и Тумнин Хабаровского края. На основании паттернов накопления стронция/кальция, авторы делают заключения о пресноводном характере жизни тайменей реки Коппи. Эти данные представляют большой интерес, но остается открытым вопрос о тайменях, облавливаемых неводами в мористой части бухты Коппи (персональное сообщение рыбаков из тех мест). Откуда приходят эти рыбы - неизвестно.

Практически на всем ареале обитания сахалинского тайменя ведется активное прибрежное рыболовство, а также рыболовство на внутренних водоемах, целью которого становятся дальневосточные лососи, гольцы, красноперки, корюшка и другие рыбы. Таймени, совершающие различные миграции, регулярно попадают в эти орудия лова (Семенченко, 2003; Edo, 2005). Имея многолетнюю информацию по прилову сахалинского тайменя на ареале, можно было бы составить довольно четкую картину о характере и объемах миграций, но с момента занесения сахалинского тайменя в региональные красные книги рыбаки стали скрывать его уловы, и составить четкую картину не представляется возможным.

Таким образом, исходя из ранее опубликованных исследований, можно заключить, что сахалинский таймень имеет сложный характер миграций, определяемый совокупностью различных факторов – от геоморфологии речных бассейнов до, возможно, генетических адаптаций. Примеры рек Коппи, Сарафуцу и Беканбеуши показывают существование трех экологических форм сахалинского тайменя по отношению к периоду нагула – пресноводных резидентов, полупроходных рыб и рыб предпочитающих солоноватые воды морских лагун. Если проводить аналогию с близкими по экологии рыбами (микижа, мальма, кунджа), потенциальное пространство факторов, определяющих характер нагульной миграции тайменя, можно ограничить основными: обеспеченность пищей в местах расселения молодежи и взрослых рыб, геоморфология речного русла, соленость и температура прилежащих к устью морских участков. В общем плане, характер миграций сахалинского тайменя можно описать следующим образом: нерест в верхних притоках рек, скорый скат в море или лагуну (при наличии) в бедных пищей водоемах (некоторые особи, тем не менее, могут остаться в речном русле на лето), и расселение по всему бассейну, включая эстуарную зону в крупных водоемах. При этом остается не ясно, почему, например, таймени двух самых крупных рек Сахалина ведут себя совершенно по-разному: в реке Тымь крупные особи уходят в Ныйский залив, тогда как в Поронае остаются на весь год (Гриценко, 1977). Характер перемещений тайменя в море малоизучен – известно лишь, что он не попадает в дрейфтерные сети в открытом море, но при этом облавливается ставными неводами и каравками в прибрежье. Сообщалось о поимке тайменей в море на расстоянии до двух километров от устья реки Сарафуцу, на удалении в 500 метров от берега (Edo, 2005). С повышением температуры, к середине лета таймени уходят вверх по течению рек, либо продолжают оставаться в прохладном прибрежье (Honda, 2012). Осенью во многих водоемах (Набиль, Тымь, Даги) наблюдается зимовальная миграция тайменя, когда рыбы поднимаются вверх по течению реки на много километров вверх и встают на глубоких, с хорошей проточностью, ямах основного русла. Особенности зимовки тайменя остаются крайне

малоизученными: авторы ранее приведенного исследования (Honda, 2012), несмотря на очевидную осведомленность в этом вопросе, совершенно обходят стороной данный аспект биологии вида, приводя данные лишь для весенне-осенних месяцев. Гриценко (2002) указывает на известные места зимовки тайменя в озере Тунайча на юге острова Сахалин, при этом конкретных данных не приводится. Сообщается, что в малых реках зимуют лишь мелкие особи, а крупные заходят на зимовку в большие реки и озера. Ни один из авторов не сообщает о поимке тайменя зимой в море, хотя авторы работы о тайменях реки Сарафуцу (Suzuki, 2010) отмечают, что неизвестно, проводит ли он зиму в соленой воде.

Открытым остается вопрос о том, откуда именно таймени начинают свою нерестовую миграцию: с мест зимовки или все же выходят на короткий преднерестовый нагул в морское побережье?

1.4 Сокращающаяся численность сахалинского тайменя

Авторы книги «Таймени и ленки Дальнего Востока» (Золотухин и др., 2000), по совокупности биологических и экологических показателей относят сахалинского тайменя к К-стратегам, рыбам имеющим долгий жизненный цикл, невысокую плодовитость и изначально малую относительную численность для населенных ими сообществ рыб. Надо отметить, что среди лососевых рыб севера Тихого океана, плодовитость взрослых тайменей одна из самых высоких. По мнению Парпуры И.З. (Парпура, 1991), сообщества рыб, в которых обитает сахалинский таймень, возникают в стабильных условиях, при условии медленной эволюции. С этим тезисом можно поспорить, особенно в свете последних открытий в области палеогеографии и сравнительной филогеографии Дальнего Востока: череда оледенений одного только плейстоцена кардинальным образом меняла среду обитания и вызывала изоляцию популяций, сдвиги видовых ареалов и последующие экспансии на освобожденные от ледников территории с

активными микроэволюционными и видообразовательными процессами (Brykov et al., 2010; Liu et al., 2011; Брыков и др., 2013). Тем не менее, факт остается фактом – занимая вершину пищевой цепи в пресных водоемах, этот лосось не может достигать очень высокой численности особенно там, где не распространена его анадромная форма.

Обобщим для начала литературные данные по возрастному составу тайменя. Важно отметить, что разные исследователи использовали различные орудия лова с определенной селективностью по отношению к размерному ряду отлавливаемых рыб, особенно это касается рыб младших возрастов – многими орудиями лова, как, например, крупноячеистыми неводами они просто не улавливаются. Тем не менее, на массовом материале из различных источников можно сделать некоторые выводы о преобладающих возрастных классах сахалинского тайменя в различных водоемах. Обратимся к Рисунку 1.4.1. – заметно, что возрастные ряды рек Самарга и Богатая имеют значительно больший разброс, чем для рек Коппи и Киевка.

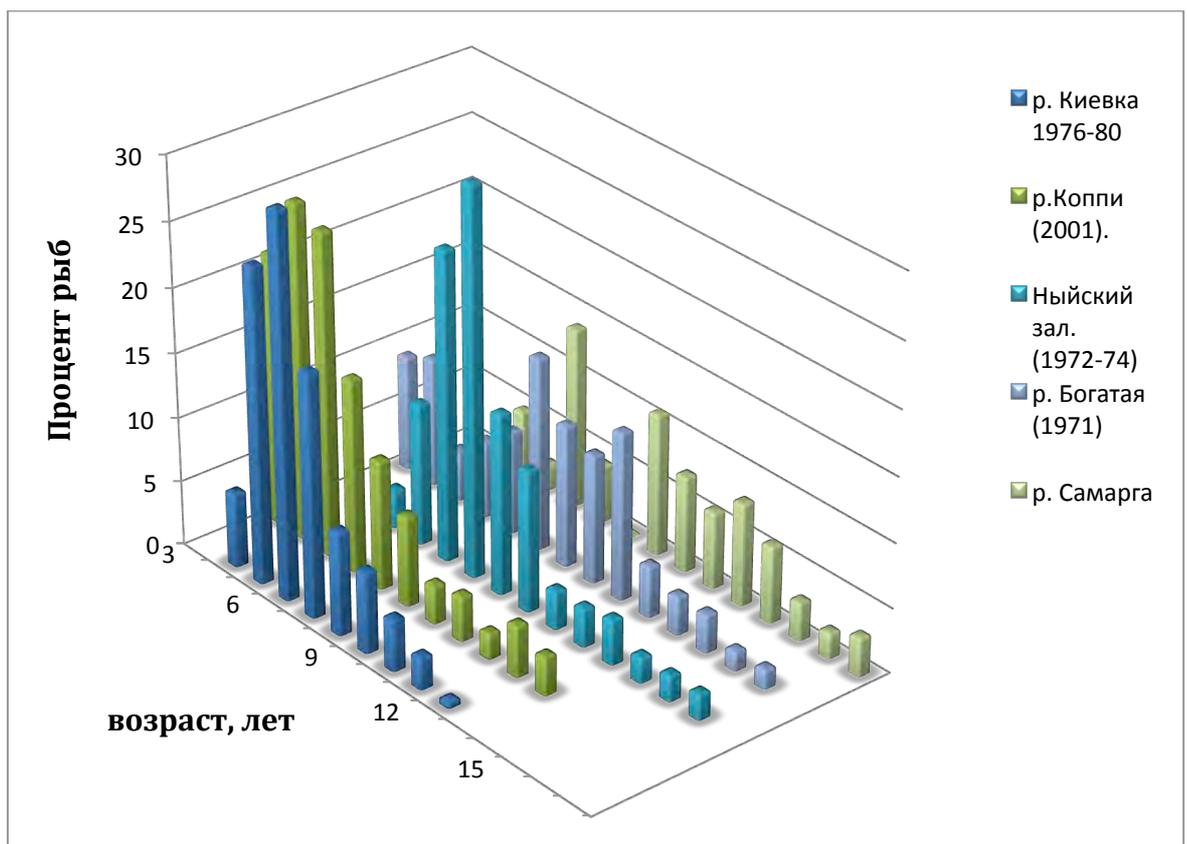


Рисунок 1.4.1. Процентное соотношение рыб различного возраста обоих полов в уловах из разных водоемов (по материалам: Гриценко, 1974; Гриценко, 1977; Бушуев, 1983; Семенченко, 2003; Золотухин, 2004).

Гистограмма данных по уловам в Ныйском заливе в начале семидесятых годов оценивалась авторами исследования (Гриценко, 1977) как тревожный показатель – уже тогда они заключали, что вылов тайменя в Ныйском заливе чрезмерно высок, и уровень общей смертности (58%) более чем втрое превышает уровень естественной смертности тайменя, в то время как в малооблавливаемой на тот момент популяции реки Богатой эти показатели сходны (около 16-19%).

Обратимся к рисунку 1.4.2 – заметна сильная разница в процентном соотношении тайменей половозрелой части популяции. Вновь хорошие показатели у рек Самарга, Богатая. Внимание заслуживают показатели Ныйского залива разных лет. Как говорилось ранее, Гриценко сделал вывод о более чем трехкратном превышении общей смертности над естественной в этом водоеме по материалам уловов в 1972-1974 гг. Спустя тридцать лет мы видим, что доля половозрелых рыб сократилась более чем в три раза с 15 до 5 процентов.

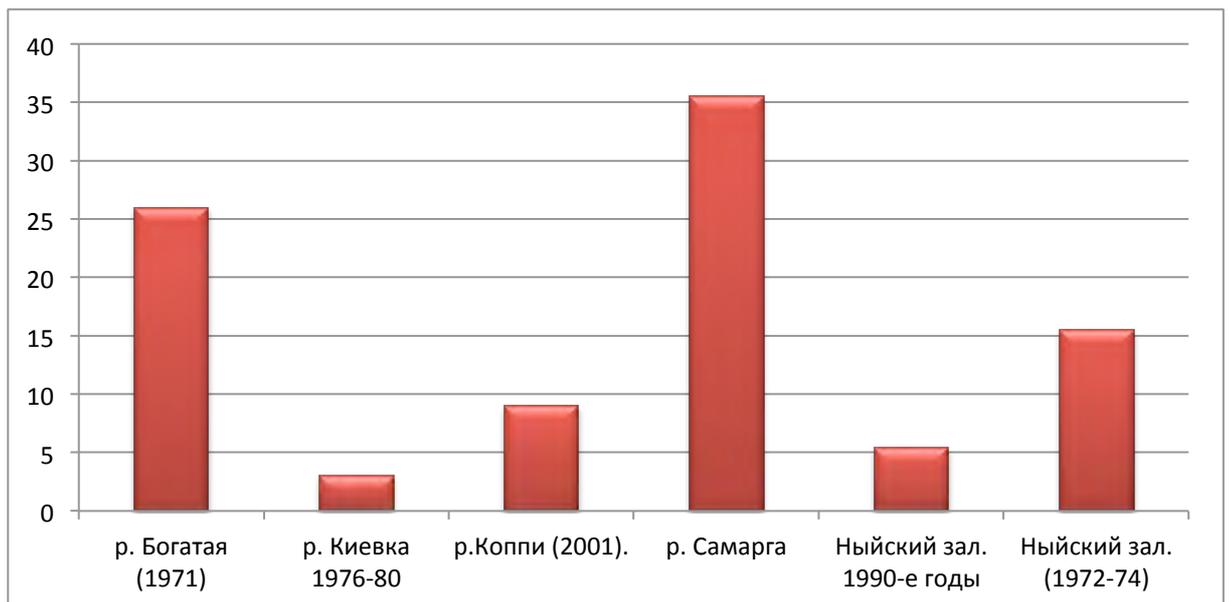


Рисунок 1.4.2. Процент рыб старше 11 лет в уловах (по материалам: Гриценко, 1974; Гриценко, 1977; Бушуев, 1983; Семенченко, 2003; Золотухин, 2004; Сафронов, 2006).

Показательная картина проявляется при рассмотрении многолетних данных по уловам сахалинского тайменя в различных частях ареала. На рисунке 1.4.3 можно отчетливо наблюдать нарастание уловов в Ныйском заливе до 1978, когда вылов достиг более 80 тонн тайменя в год. После, официальные уловы резко падают и остаются на постоянном низком уровне нескольких тонн в год вплоть до 1991 года, когда перестали вести статистику по виду. Таким образом, на северо-восточном Сахалине популяции сахалинского тайменя испытали на себе чрезмерный промысел еще в 70-х годах прошлого века.

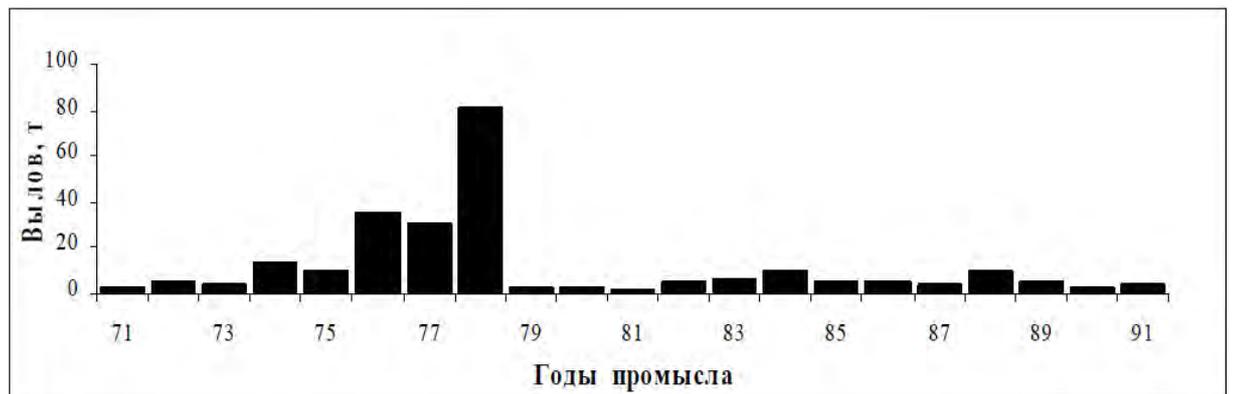


Рисунок 1.4.3 Динамика вылова сахалинского тайменя в Ныйском заливе (северо-восточный Сахалин) в 1971-1991 годах (из Сафронов, 2006).

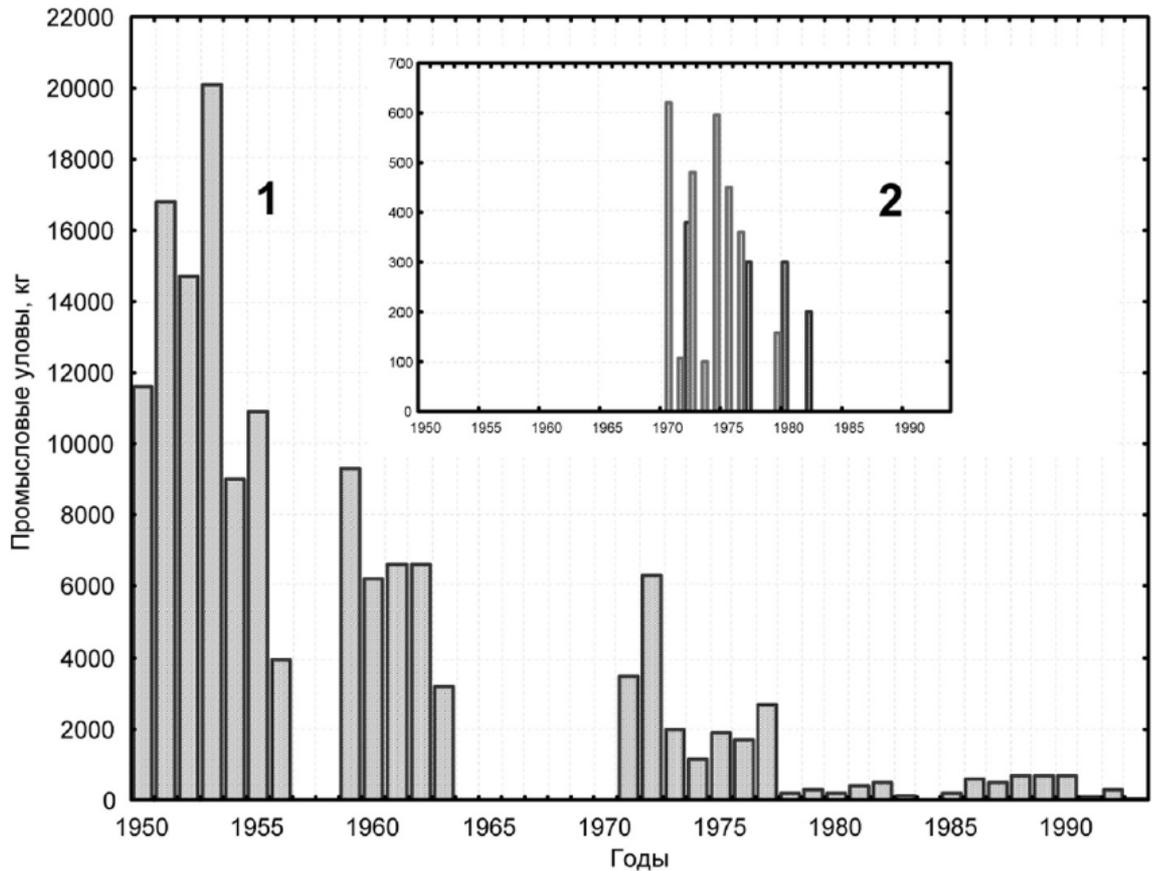


Рисунок 1.4.5. Межгодовая динамика прибрежных уловов сахалинского тайменя ставными неводами в реках материкового побережья Приморья. 1 — реки Тумнин и Коппи, 2 — реки Самарга и Киевка (из Золотухин, 2008).

Схожая картина наблюдается и по материковым популяциям (Рисунок 1.4.5 -2). После перелома в 1950-1970 годах уловы резко пошли на убыль. Вполне очевидно, что помимо современного высокого уровня браконьерства и прилова тайменя резкое снижение численности вида обусловлено и историческими последствиями перелома еще в середине 20-го века.

В работе Никитина В.Д. (2013), опубликованной на сайте Сахалинского Научно-Исследовательского Института Рыбного Хозяйства и Океанографии обобщаются многолетние данные по уловам молоди сахалинского тайменя при исследовании рек острова Сахалин – делаются выводы о деградации многих популяций сахалинского тайменя, особенно в периферийных участках обитания. На Рисунке 1.4.6 приведены обобщенные данные работы.

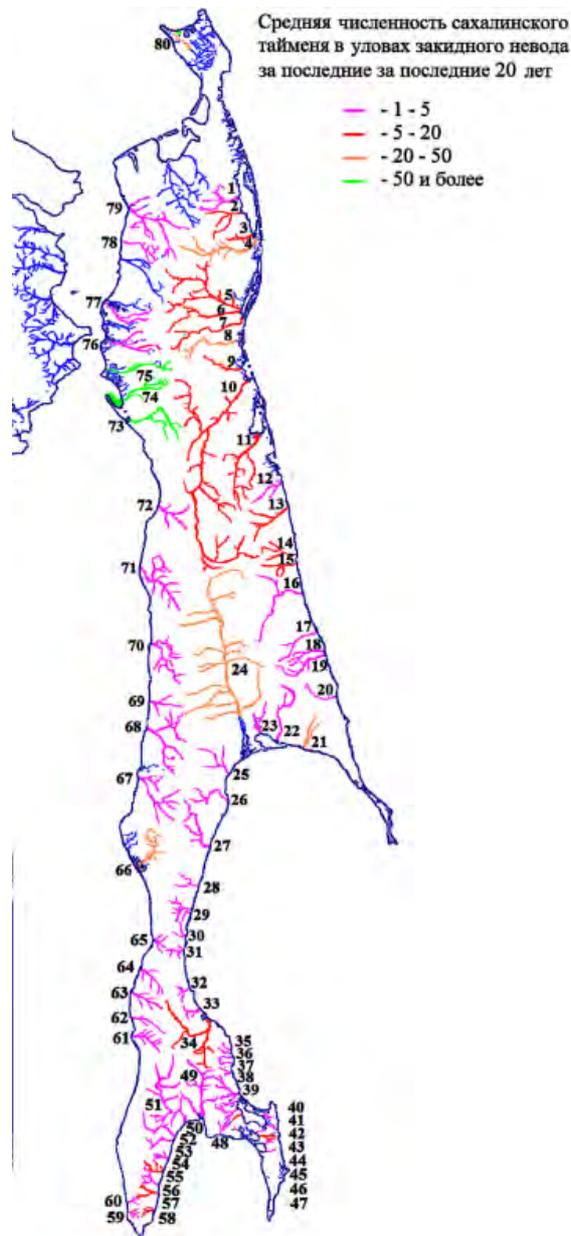


Рисунок 1.4.6. Средняя численность молоди сахалинского тайменя за последние 20 лет в уловах закидного невода (из Никитин, 2013).

Наиболее многочисленными предстают популяции отдельных рек Северо-Западного Сахалина, а также некоторых других крупных водоемов (Эвай, Даги, Айнская, Владимировка), в то время как большая часть водоемов принадлежит к классу с низкой численностью тайменя.

1.5. Основные угрозы сахалинскому тайменю

Угрозы популяциям сахалинского тайменя на ареале вида можно подразделить на три основные группы:

1) Изменение климата.

Продолжающееся глобальное потепление не может не сказаться на распространении лососевых рыб и их численности. Ареал сахалинского тайменя сильно вытянут с юга на север от относительно теплого Японского моря до сурового побережья северо-восточного Сахалина. Известно, что даже слабые колебания температуры оказывают сильнейшее воздействие на численность животных. В работе Дилана Фрэйзера (Fraser et al, 2011) на основе обширных прямых экспериментальных и литературных данных было показано, что локальные генетические адаптации играют важнейшую роль в эволюции и существовании лососевых видов рыб. Один из главных факторов локальных адаптаций у лососевых – температурный режим водоемов (Fraser et al, 2011; Miller, 2012; Vincent, 2013). Справедливо предположить, что эти данные также относятся и к сахалинскому тайменю. Известно, что с глобальным потеплением первыми, в середине 20 века, начали вымирать популяции южного края ареала сахалинского тайменя – в реках залива Петра Великого и на острове Хонсю. В специальной работе, где рассматриваются причины вымирания популяций сахалинского тайменя на ареале и, в частности, в Японии (Fukushima, 2012), автор, однако, затрудняется с выбором наиболее катастрофического фактора вымирания популяций островов Хоккайдо и Хонсю – повышение температуры на протяжении 20 века на 0.01°C в год или же развитие агрохозяйственных комплексов в долинах рек. Тем более, что оба эти фактора сильно связаны – фермы располагаются в наиболее «теплых» речных бассейнах. Численность южных популяций сахалинского тайменя (реки Киевка, Партизанская и Черная на материковом побережье, а также реки юга острова Сахалин) неуклонно сокращается, но опять же крайне затруднительно определить вклад повышения температуры за долгий период на фоне сильного воздействия населения на

рыбные запасы водоемов этих регионов: юг Приморья и Сахалина – самые густонаселенные районы Дальнего Востока.

2) Деградация мест обитания сахалинского тайменя.

Сахалинский таймень обитает в относительно малонаселенных районах Дальнего Востока России и на самом малонаселенном острове Японии – Хоккайдо. Несмотря на это, даже ограниченная хозяйственная деятельность в этих районах приводит к быстрому исчезновению популяций сахалинского тайменя. В Японии, в работе Мишио Фукушимы (Fukushima, 2012), было показано, что большая часть исчезающих и исчезнувших популяций сахалинского тайменя ассоциированы с бассейнами рек, где ведется активная хозяйственная деятельность человека. В Японии долгое время практиковалось так называемое «спрямление русел рек», когда протяженные участки рек превращались в стремительные глубокие каналы, лишенные укрытий для молоди лососевых рыб и ям для отдыха взрослых производителей лососевых.

Лесные пожары возникают на Дальнем Востоке каждый год. Порой выгорают значительные доли бассейнов рек, как это было в начале двухтысячных годов на тайменных реках Вал и Даги. По сообщениям местных жителей, зимой, от выпавшей в реки золы и упавших обугленных деревьев в реке случился замор и наблюдалось много погибших тайменей. Такой же эффект – массовый замор сахалинского тайменя наблюдался после пожаров на реке Дуй, впадающей в Японское море (Золотухин и др., 2000).

3) Браконьерский вылов и прилов сахалинского тайменя при промысле лосося.

Авторы многих работ (Соков, 1998; Золотухин, 2000; Семенченко, 2007) прямо указывают, что браконьерский промысел сахалинского тайменя – основная угроза виду. Будучи крупной хищной рыбой, сахалинский таймень добывается практически на всех стадиях жизненного цикла. Облову подлежат рыбы в возрасте от 2 лет. А. Ю. Семенченко с соавторами (Семенченко и др., 2011) приводят пример, когда во многих реках, рыболовами-любителями активно облавливаются совсем молодые особи тайменя длиной 10-15 см.

Помимо прилова при любительском лове существует и специальная охота на тайменя, особенно в еще богатых этим видом районах. Все лето продолжается облов сахалинского тайменя спиннингами на акватории Набильского залива Сахалинской области как местными, так и приезжими рыбаками. Ловля эта ведется совершенно безнаказанно и каждый день. Наиболее драматичным моментом является осенняя ловля сахалинского тайменя. С первыми заморозками и осенним похолоданием воды рыбы устремляются в крупные реки, пресные и солоноватоводные озера на зимовку, активно питаясь в период миграции. В это время (октябрь-декабрь) сотни рыболовов вылавливают тайменей спиннингами в низовьях рек северо-восточного (реки Набиль, Даги, Вал, Аскасай, Пильтун), и северо-западного Сахалина, а также в озерах (Айнское, Тунайча). Этот неконтролируемый лов обычно замаскирован под ловлю «разнорыбицы».

Надо отметить, что промысел зимующих тайменей на реке Набиль ведется давно, Федорчук В.В. описывал лов тайменей в 30-е годы 20-го века на зимовальных ямах представителями коренных малочисленных народов севера с помощью острог, когда за ночь вылавливалось до сотни крупных рыб (Федорчук, 1998).

Варварским, специализированным и очень широко распространенным в Сахалинской области является метод лова посленерестовых сахалинских тайменей в реках на загородках.

Отдельного внимания заслуживает прилов сахалинского тайменя при промысле дальневосточных лососей. Несомненно, что таймень, нагуливающийся в море регулярно попадает в лососевые невода. К сожалению, данных об относительных уловах сахалинского тайменя в неводах практически нет. Семенченко А. Ю. (Семенченко, 2003) сообщает, что летом при промысле лососей в устье реки Самарга каждый день попадается один-два крупных тайменя.

1.6. Популяционно-генетические системы видов

Большая часть видов на Земле обитает в гетерогенной среде обитания, изобилующей естественными (горные хребты, реки, морские течения, заливы) и искусственными (города, дороги, водохранилища, плотины) преградами, ограничивающими свободное перемещение особей одного вида по всей территории своего ареала и, соответственно, – генного потока между особями одного вида в разных частях ареала. Наличие локальных адаптаций групп индивидов к определенным абиотическим и биотическим факторам, ассортативное скрещивание, факторы изоляции, приводят к возникновению популяционных структур видов, с различной степенью своеобразия и сложности.

Естественные популяции большинства видов подразделены на отдельные локальные единицы, в которых наблюдается случайное скрещивание – демы, локальные популяции, или субпопуляции. Терминология в этом направлении науки изобилует синонимами, появление которых связано как с научными традициями школ разных стран, так и различными объектами исследований (термин субпопуляция часто используется для обозначения локальных популяций лососевых рыб, дем – для обозначения локальных популяций мелких млекопитающих).

Популяции часто структурированы на несколько иерархических уровней от локальных до региональных. Особенности этой структурированности очень видоспецифичны – для тихоокеанских лососей эта иерархия выстраивается с уровня континентов (Американский и Евразийский) до уровня отдельных нерестовых ручьев в бассейнах крупных рек, входящих в свою очередь в биогеографически близкие группы бассейнов рек (Алтухов, 2004). Наиболее часто, в контексте теории иерархической популяционной структуры, рассматривается модель лишь с двумя уровнями – локальные демы (субпопуляции) и региональные группы демов (субпопуляций). При ее наличии крайне важно выявить эту иерархическую структуру и магнитуду различий на каждом уровне иерархии, что является обязательным шагом на пути

природоохранного менеджмента (Алтухов, 2004; Allendorf, Luikart, 2009). Для ее описания чаще всего используется иерархическая F-статистика, разделяющая полиморфизм на локальную и региональную компоненты – пропорции глобальной дифференциации, обусловленные различиями между субпопуляциями внутри регионов (F_{SR}) и между регионами (F_{RT}). Иерархическая структура популяций часто также описывается с помощью метода AMOVA (Excoffier et al., 1992) (*analysis of molecular variance* - анализ молекулярной дисперсии), который является аналогом дисперсионного анализа.

1.7. Метапопуляции

Термин «метапопуляция» был предложен Ричардом Левинсом в 1970 году для описания популяционной системы, состоящей из ряда локальных популяций, обменивающихся друг с другом мигрантами с той или иной интенсивностью и состоящей из отдельных, подразделенных мест обитания (Dobson, 2003). Важным свойством метапопуляции является, как наличие мест обитания, незанятых в определенное историческое время (но которые возможно колонизировать), так и периодическое исчезновение отдельных локальных популяций как следствие вымирания (Levins, 1969). В модели Левинса, метапопуляция – это группа маленьких демов, занимающих серию одинаковых мест обитания, изолированных друг от друга плохо пригодными для обитания ландшафтами. Локальная популяция имеет вероятность вымирания (e) в определенный интервал времени. Пустые места обитания подвергаются реколонизации с вероятностью (c) особями из других мест обитания (Формула 1). Метапопуляционная динамика – это баланс между вымиранием и реколонизацией, и в каждый момент времени некоторая пропорция мест обитания (p) заселена и некоторая пуста. При равновесии:

$$p^* = \frac{c}{c + e}$$

(1)

Концепция метапопуляции стала ценной теоретической основой для понимания природоохранных аспектов популяций и видов (Hanski, Gyllen, 1997). Со временем появились более реалистичные метапопуляционные модели, чем таковая Левинса: включающие в себя неравный размер локальных популяций и разные уровни миграций между ними, дифференциальные скорости вымирания и реколонизации. Наиболее обширные отдельные места обитания поддерживают наиболее крупные популяции, вымирание которых маловероятно. Находящиеся с ними рядом более мелкие места обитания имеют более высокую вероятность быть быстро реколонизованными, чем отдаленные места обитания. Было введено понятие «эффекта помощи», для описания миграций особей в субпопуляцию, которая нуждается в генетической или демографической «поддержке» для продолжения существования (Brown, Kodric-Brown 1977, Ingvarsson, 2001).

Очень важны свойства метапопуляционной структуры по отношению к генетическому дрейфу и разнообразию (Allendorf, Luikart, 2009; цит. по Wright, 1943, 1945; Kimura, Weiss, 1964): если численность каждой из субпопуляций снижается и генетический дрейф усиливается, снижается и гетерозиготность каждой из них, случайно фиксируются разные аллели в разных субпопуляциях, за счет чего, разнообразие целой метапопуляции остается застывшим во времени (Рисунок 1.7.1).

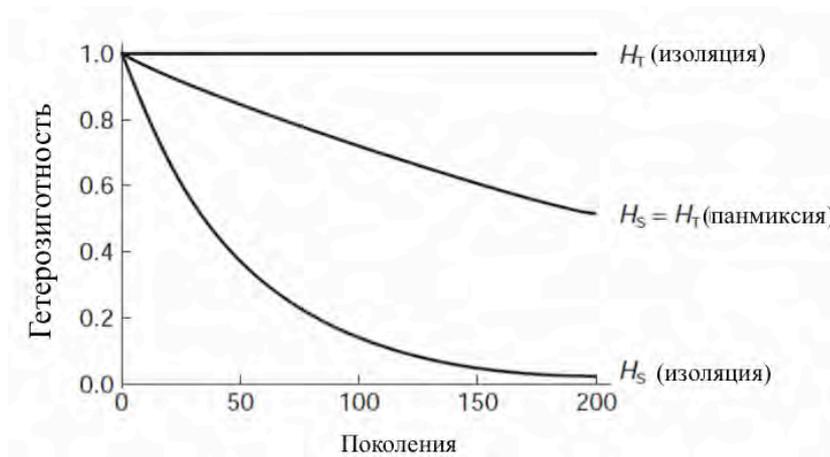


Рисунок 1.7.1. Ожидаемое падение гетерозиготности для каждой локальной популяции (H_s) и тотальной метапопуляции (H_t) состоящей из 6

локальных популяций, $N=25$ каждая. Для случаев панмиксии и полной изоляции (из Allendorf, Luikart, 2009).

Не менее интересен и эффект метапопуляционной структуры, влияющий на эффективную численность популяции. Райт (Wright, 1943) показал, что:

$$N_{eT} \approx \frac{N_T}{1 - F_{ST}} \quad (2)$$

Где N_{eT} – долговременный эффективный размер популяции, а N_T – общая численность всех особей. Таким образом, с увеличением подразделенности (измеряемой обычно в F_{ST}), будет увеличиваться и долговременная эффективная численность целой метапопуляции (Nunney, 2000). Также, данное уравнение демонстрирует, что эффективная численность тотальной метапопуляции при наличии подразделенности будет больше, чем простая сумма эффективных размеров (N_{es}) субпопуляций.

Таким образом, эффект метапопуляционной структуры на эффективную численность естественных популяций сложен. Долговременная эффективная численность может быть как меньше, так и больше суммы субпопуляционных N_e , в зависимости от ряда причин: скорости вымирания и реколонизации, паттернов миграции, разницы в численности и продуктивности локальных популяций. Все эти факторы должны скрупулёзно рассматриваться при разработке программ по сохранению биоразнообразия (Waples, 2002).

1.8. Метапопуляционная концепция для лососевых рыб

Популяционные системы лососевых рыб наиболее полно описываются с применением концепции метапопуляций (Schtickzelle, 2007). Эта концепция наилучшим образом подходит к полупроходным и проходным видам семейства

лососевых – видов, чья среда и отдельные ее компоненты, находясь в прибрежных экосистемах северного полушария уязвимы как к флуктуациям климата (оледенения, изменение уровня океана, потепления, засушливые периоды и др.), так и воздействию человека (избыточный промысел, разрушение мест обитания и др.). В свою очередь, проходные и полупроходные рыбы, занимая широкие ареалы вдоль крупных морских бассейнов, совершают постоянные миграции, возвращаясь к родным водоемам для нереста, но при этом демонстрируют значительную степень стрейнга, позволяющую им поддерживать регулярные потоки генов между локальными популяциями и, при возможности, занимать новые места обитания, расширяя свой ареал.

Наиболее информативно, применение метапопуляционной концепции раскрывается в работе Николаса Штицкзелле «*A metapopulation perspective for salmon and other anadromous fish*» (Schtickzelle, 2007). Расширяя метапопуляционную концепцию Левинса, ее можно описать, как «любую группу отдельных локальных популяций с миграциями между ними, безотносительно динамики появления и исчезновения отдельных локальных демонов» (Harrison, Taylor, 1997).

Чтобы соответствовать метапопуляционной концепции, сеть отдельных мест обитания лососевых рыб (локальных субпопуляций) должна удовлетворять трем базовым принципам:

1) Локальная популяция занимает отдельное место обитания, отделенное от остального ландшафта. При условии, если места обитания вида следуют один за другим, постепенно и перекрываясь – это не соответствует концепции.

2) Существует асинхронность в динамике численности локальных популяций, делаая нереалистичным вариант их одновременного случайного вымирания. С полностью синхронизированной динамикой отдельных популяций, существование метапопуляции не более, чем существование любой отдельной популяции.

3) Отдельные места обитания не являются полностью изолированными, позволяя потокам генов проходить между ними. Без миграций динамика

отдельных популяций исключительно локальна, метапопуляционные процессы не происходят, и долговременное существование системы затруднено (Schtickzelle, 2007).

Рассмотрим основные экологические и биологические особенности лососевых рыб с точки зрения метапопуляционной теории:

1. **Дискретность мест обитания.** Лососевые рыбы обитают в различных условиях среды, и отличаются сложным жизненным циклом с длительными миграциями, многие виды успевают посетить за свою жизнь различные места обитания. Ключевым звеном жизненного цикла лососевых рыб является размножение, происходящее исключительно в дискретных пресных водоемах.

2. **Асинхронность в динамике численности локальных популяций.** Асинхронность в динамике локальных популяций лососевых рыб колеблется в зависимости от их численности и степени стрейнга. Наибольшие различия в демографической динамике локальных популяций лососевых наблюдаются для тесно связанных с гетерогенной пресноводной средой обитания видов – полупроходных и жилых (мальма, кунджа, сахалинский таймень), большая часть жизненного цикла которых проходит в пресноводных водоемах (зимовка, нерест, первые несколько лет жизни), а морское побережье используется лишь для нагула. Добавляет асинхронности и большая протяженность ареалов многих лососевых рыб.

3. **Степень миграций внутри метапопуляций лососевых рыб.** Известно, что несмотря на ярко выраженный хомминг лососевых рыб, часть из них идут на нерест не в родные водоемы. Механизмы этих «ошибок» - так называемого стрейнга, как и самого явления хоминга до конца неизвестны детально (Keefner, Caudill, 2013). За последние годы было проведено множество исследований уровня миграций между локальными популяциями лососевых рыб. Авторы одной из недавних работ (Keefner, Caudill, 2013) обобщили результаты исследований стрейнга за период с 1954 по 2012 годы (преимущественно американское тихоокеанское побережье), обнаружив достаточно высокие его значения (Рисунок

1.8.1, 1.8.2). Из рисунков видно, что для некоторых видов (кета, кижуч, горбуша) средними являются значения стрейнга из популяции на уровне 5-15%.

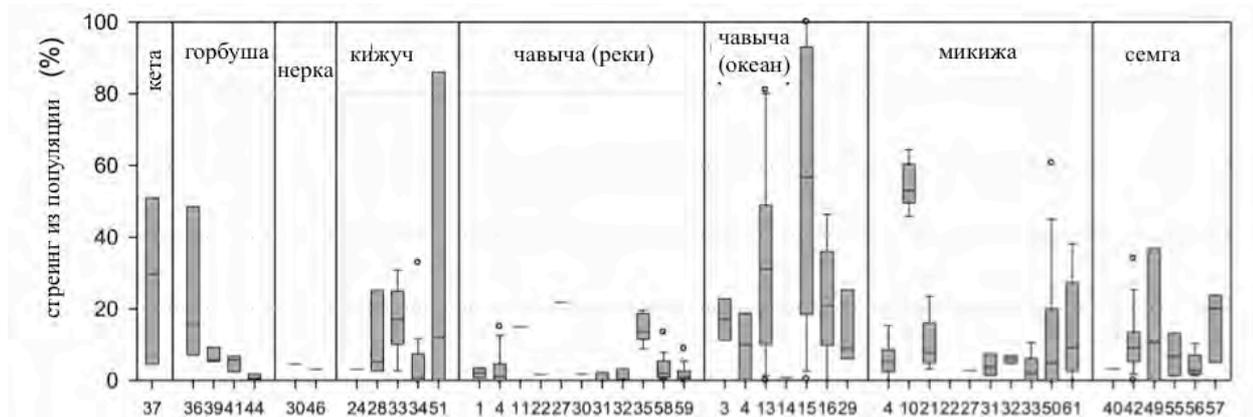


Рисунок 1.8.1. Процент стрейнга из популяции (процент рыб, которые не возвращаются в родной водоем, ось y) для 7 видов лососевых рыб (номера по оси x – номера исследований). Методы, положенных в основу анализа исследований, полагались в основном на заводские или экспериментальные группы рыб, поэтому могли переоценить степень стрейнга, в то же время мониторинг в реципиентных популяциях не был тотальным и мог недооценить его уровень (из Keefer, 2013)

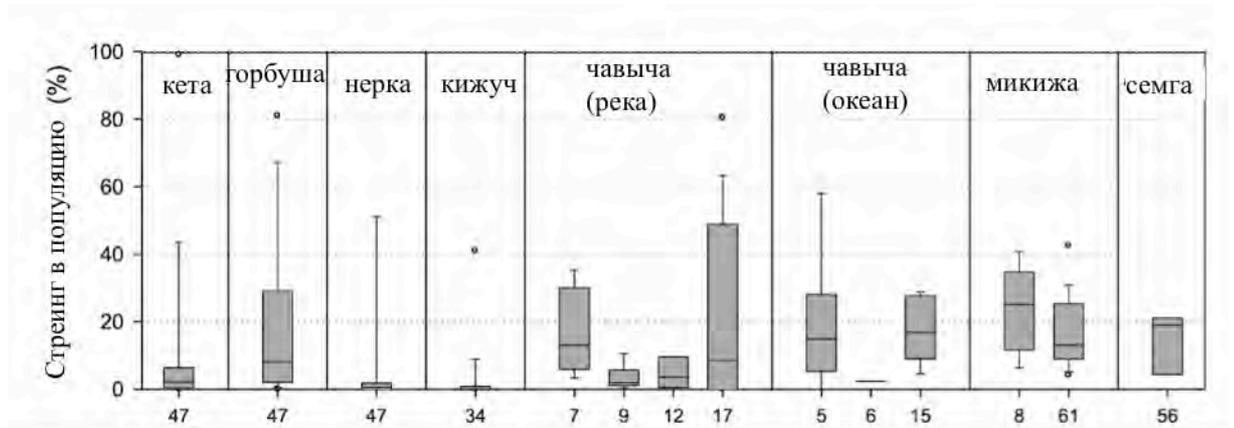


Рисунок 1.8.2. Процент стрейнга в популяцию (процент рыб, которые вернулись не в свой водоем, ось y) для 7 видов лососевых рыб (номера по оси x – номера исследований (из Keefer, 2013)).

1.9. Различные уровни для сохранения биоразнообразия: виды, эволюционно-значимые единицы, единицы запаса.

Определение оптимальных таксономических и популяционных единиц для охраны и рационального использования – ключевая задача природоохранной генетики (Allendorf, Luikart, 2009). Совокупность морфометрических, филогенетических и филогеографических методов помогает выявить высшие уровни популяционно-видовой иерархии – виды и подвиды. В пределах вида идентификация и сохранение естественного множества генетически отличных локальных популяций – основная задача, позволяющая сохранить его эволюционный потенциал и предотвратить вымирание (Hilborn et al., 2003, Luck et al., 2003., Allendorf, Luikart, 2009). Идентификация популяционных единиц очень важна, для оперативного направления ресурсов по сохранению видов на одну или несколько локальных популяций. Биологи и управленцы должны эффективно определять локальные популяции и их географические границы для планирования вылова (избежание перепромысла отдельных элементов метапопуляции), проектов по транслокации и реинтродукции особей (избежание аутбредной и инбредной депрессии). Крайне важны методы природоохранной генетики, в реальной практике сохранения видов – в связи с ограниченностью материально-финансовых ресурсов необходимо научно и обоснованно приоритизировать какие именно таксоны и популяции должны наилучшим образом охраняться и восстанавливаться (Allendorf, Luikart, 2009).

Гены, виды и экосистемы – три основных уровня разнообразия, определенных Международным Союзом Охраны Природы МСОП (Allendorf, Luikart, 2009). Существуют противоречия на счет того, какой из уровней наиболее важен (Bowen, 1999), но совершенно ясно, что все три уровня должны получать необходимое внимание специалистов (Allendorf, Luikart, 2009). Рассмотрение каждого из этих уровней в отдельности помогает нам понять взаимодействующие процессы, формирующие мировое разнообразие, а в будущем создать и единый синтез знаний, накопленных на разных уровнях исследования. Четвертый уровень

разнообразия – генетически дивергированные локальные популяции, слагающие метапопуляционные системы видов, вероятно – самый важный уровень для приложения усилий по сохранению разнообразия, объединяющий в себе ключевые элементы остальных уровней (Allendorf, Luikart, 2009). Сохранение системы многих, генетически различных локальных популяций и их структуры необходимо для долговременного выживания видов и функционирования экосистем (Luck et al., 2003).

Немаловажен вопрос, о том, сохранению чего именно должно уделяться особое внимание – существующих паттернов популяционно-генетического разнообразия или же процессам, их генерирующим (экологическим и эволюционным). Мориц (Moritz, 2002), на примере синтеза филогеографических данных и экологических факторов мест обитания видов развивает концепцию о необходимости совмещения этих подходов. Генетическое разнообразие предлагается разделять на две компоненты: адаптивное разнообразие и нейтральная дивергенция, вызванная фактором изоляции. Сохранение видов и их различных зон обитания должно включать охрану и поддержание их исторически изолированных (дивергированных) популяционных генофондов, потому что они с малой долей вероятности смогут быть восстановлены. В то же время, адаптивные особенности могут быть лучшим образом защищены сохранением причин отбора – гетерогенных ландшафтов обитания жизнеспособных популяций, чем непосредственно сохранением специфических фенотипов (в зоопарках, на фермах, в криобанках). Мориц предлагает: 1) определить географические зоны, представляющие неотъемлемую часть исторического внутривидового разнообразия; 2) определить зоны, важные для адаптивной диверсификации или смешения исторически изолированных популяций; 3) в пределах этих зон максимизировать защиту протяженных гетерогенностей естественной среды обитания, на основе которых отбор и миграции могут эффективно осуществляться для поддержания жизнеспособности популяций и адаптивного генетического разнообразия.

Конечно же, процессы, создающие современное биоразнообразие очень важны, но их поддержание требует в первую очередь мониторинга и поддержания существующих популяционно-генетических систем (предотвращать процессы фрагментации и сохранять миграционные связи). Особенное внимание должно уделяться поддержанию здоровья экосистем, в которых существуют крупные популяции – ведь именно в них наиболее эффективно проходят процессы естественного отбора, являющиеся неотъемлемой частью адаптаций видов, в то время как в малых популяциях преобладают процессы генетического дрейфа и развитие быстрых адаптаций маловероятно (Willi et al., 2006; Allendorf, Luikart, 2009). Лесика и Аллендорф отмечают (Lesica, Allendorf, 1995), что природоохранная ценность периферических популяций зависит от их генетической дивергенции от других популяций. Если периферические популяции генетически и морфологически отличны от центральных популяций вида – такие популяции вносят существенный вклад в разнообразие вида и должны рассматриваться в контексте долговременных природоохранных планов.

Эволюционно-значимая единица (ESU – *evolutionary significant unit*) может быть определена как популяция или группа популяций, которая требует отдельного управления или приоритета для сохранения ввиду своей значительной обособленности, как экологической, так и эволюционно-генетической (Allendorf, Luikart, 2009). Впервые этот термин был использован Райдером (Ryder, 1986), а в последствии, был предложен широкий ряд определений этого концептуального для природоохранной биологии термина (Таблица 1.9.1).

Таблица 1.9.1. Основные определения эволюционно-значимых единиц (По: Fraser, Bernatchez, 2001; Allendorf, Luikart, 2009).

Авторы	Критерии
Ryder, 1986	Подгруппа популяций вида, которая обладает генетическими особенностями, значительными для настоящих и будущих поколений вида, значительным адаптивным генетическим полиморфизмом.

Авторы	Критерии
Waples, 1991	<p>Популяция или группа популяций, которые:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Значительно репродуктивно изолированы от других таких групп вида. 2) Представляют значительный компонент эволюционной истории вида, имея отдельные адаптации.
Dizon et al., 1992	<p>Популяции или группы популяций, демонстрирующие значительную дивергенцию аллельных частот, морфологических признаков, географического распространения, популяционных параметров (комплекс признаков).</p>
Avisé, 1994	<p>Ряд популяций, произошедший от сходных филогенетических линий.</p>
Moritz, 1994	<p>Популяции, которые:</p> <ol style="list-style-type: none"> А) Демонстрируют реципрокную монофилетичность по митохондриальным локусам. Б) Демонстрируют значительную дивергенцию по аллельным частотам ядерных генов.
Vogler, DeSalle, 1994	<p>Кластеризующиеся группы особей или популяций, диагностируемые по определенным характеристикам, отличающиеся от других таких групп.</p>
Crandall et al., 2000	<p>Популяции утратившие «экологическую взаимозаменяемость» (имеют различные адаптации или различающееся давление отбора – жизненные стратегии, морфологию, вариабельность по количественным локусам, местам обитания), генетическую общность и взаимозаменяемость (не имеют недавних генных потоков, и демонстрируют соответствие между географической и филогенетической подразделенностью).</p>
Fraser, Bernatchez,	<p>Генофонд, демонстрирующий сильно ограниченные генные потоки от других генофондов в пределах высших</p>

Авторы	Критерии
2001	организационных уровней вида.

Как видно из таблицы 1.9.1, трудно дать четкое и содержательное в своей совокупности по набору факторов определение ESU в связи с различающимися трактовками и использованием этого термина в природоохранной биологии. Определение ESU, в связи с различными подходами для ее определения, зачастую сложнее, чем определение вида. При попытках использовать разные молекулярно-генетические маркеры для определения ESU очень остро возникает проблема неодинаковых эволюционных скоростей для различных маркеров, а неполное расхождение генетических линий выявляется в подавляющем большинстве случаев. На основе синтеза и анализа различных определений ESU, Аллендорф и Луикарт (Allendorf, Luikart, 2009) выделяют и обсуждают три основных концептуальных критерия, в разное время оказавших сильное влияние на концепцию ESU, и обсуждаемых в литературе до сих пор:

1) **Изоляция и адаптация** (Waples, 1991). Долговременная репродуктивная изоляция (обычно сотни поколений), ведущая к тому, что ESU представляет собой уникальный продукт прошлых эволюционных событий, которые не смогут повториться (по крайней мере, в экологическом временном масштабе). Экологическая или адаптивная уникальность, позволяющая ESU быть «резервуаром» генетической и фенотипической вариабельности, вероятно важной для будущего эволюционного потенциала. Эти рамки стали частью официальной политики государственных природоохранных организаций США.

2) **Реципрокная монофилия**. Моритц (Moritz, 1994) предложил простой и легко применимый критерий для определения ESU: “ESU должна быть реципрокно монофилетична по митохондриальной ДНК и демонстрировать значительную дивергенцию по аллельным частотам ядерных локусов”. Реципрокная монофилия в контексте ESU по Моритцу означает, что все филогенетические линии в пределах ESU должны иметь значительно более близкого общего предка, чем линии между ESU. Этот критерий крайне удобен

для практической и быстрой диагностики ESU. Серьезнейший недостаток критерия Моритца – игнорирование адаптивной составляющей ESU, в отличие от вышерассмотренного двухуровневого критерия Уэпса. Критерий Моритца базируется на кладистическом филогенетическом подходе с использованием нейтральных локусов, игнорирует небольшие генные потоки, являющиеся составной частью большинства популяционных систем, но способные крайне сильно исказить предположения о реципрокной монофилии, особенно с увеличением выборки. Поэтому, вероятнее всего, с использованием этого критерия будут диагностированы как ESU лишь маленькие изолированные популяции (вероятно прошедшие стадию бутылочного горлышка или эффекта основателя), в которых действие дрейфа не позволяет эффективно работать естественному отбору и их ценность для эволюции вида находится под сомнением. Вероятно, критерий Моритца более подходит для диагностирования подвидов и других внутривидовых единиц высшей иерархии, чем популяционная.

3) **Взаимозаменяемость.** Крэндаль (Crandall et al., 2000) предложил, что идентификация ESU должна базироваться на концепции экологической и генетической «взаимозаменяемости». Идея в том, что особи могут быть перемещены между популяциями и занимать те же ниши, выполнять ту же экологическую роль, как резидентные особи, без какого-либо уменьшения выживаемости вследствие генетических причин (аутбредная депрессия). Если мы способны отвергнуть нулевую гипотезу о взаимозаменяемости - значит, имеем дело с разными ESU. В идеальном случае, оценка взаимозаменяемости должна быть основана на наследуемых адаптивных количественных признаках. Большой плюс этого подхода в том, что он интегрирует в себе как генетическую, так и экологическую (адаптивную) составляющие и основан на тестируемой гипотезе.

Взаимозаменяемость может быть протестирована в лабораторных условиях, и в реципрокном скрещивании. Главная проблема этого подхода – он трудноосуществим практически для большинства крупных видов животных и растений, особенно с длительным жизненным циклом. В случае же с крупными видами, находящимися под угрозой исчезновения, такой эксперимент выглядит

совсем мало возможным. Когда мы не можем напрямую измерить взаимозаменяемость, приходится использовать суррогатную меру взаимозаменяемости – разницу в особенностях жизненного цикла, уровень дифференциации мест обитания, ряд генов демонстрирующих значительную адаптивную дифференциацию. Этот вариант часто используется при применении определения ESU Уэпса.

Различные определения концепции ESU перекрываются во многих существенных критериях (Таблица 1.9.1). Многие предлагают двухуровневый подход, включающий изоляцию и адаптивную дивергенцию. Основными принципами и критериями являются: значительный уровень репродуктивной изоляции, адаптивная дифференциация, и согласованность между набором различных данных – генетических, морфологических, поведенческих, географических (Allendorf, Luikart, 2009). Чем дольше изоляция, и сильнее различается окружающая среда (или давление отбора), тем более вероятно, что популяции или группы популяций представляют собой отдельные единицы, требующие отдельного управления и рассмотрения в контексте природоохранных мероприятий. Мы не должны полагаться лишь на один критерий, как, например, реципрокная монофилия по митохондриальной ДНК. Чем больше фактов и различных типов данных согласованно подтверждает существование различий между популяциями, тем сильнее доказательство их статуса, как ESU.

Единицы запаса (MU – *management unit*) обычно определяют как популяции, которые демографически независимы друг от друга, и в связи с этим требуют отдельного менеджмента (промыслового, природоохранного и др.). Их популяционная демографическая динамика определяется в большей мере локальной скоростью рождаемости и смертности, чем иммиграцией. Идентификация MU актуальна для кратковременного менеджмента – определения промысловых участков, выдачи квот на добычу биоресурсов, мониторинга популяционных показателей (Allendorf, Luikart, 2009).

MU в отличие от ESU обычно не демонстрирует долговременной независимой эволюции или выраженной адаптивной дифференциации, но в то же

время, MU должна представлять собой популяцию, важную для долговременного существования ESU и/или вида (Allendorf, Luikart, 2009). Сохранение многих, а не одной - двух популяций вида критично для его долговременного существования (Алтухов, 2004; Hughes et al., 1997; Hoops, Mooney, 1998).

MU, обычно меньше, чем ESU, так что одна ESU может содержать в себе несколько MU, являющихся собой дивергированными субпопуляциями в пределах основной метапопуляции. Моритц (Moritz, 1994) определяет термин MU, как популяцию, которая значительно дивергирована от других по аллельным частотам (как аппроксимация изоляции).

Переоценка числа MU может приводить к распылению ограниченных ресурсов для сохранения и неэффективному менеджменту. Это может происходить вследствие применения слишком большого числа высокополиморфных локусов (микросателлитов) для маленькой выборки субпопуляций, между которыми находятся статистически значимые различия, неподкрепленные биологическим смыслом. Поэтому, для выявления как MU, так и ESU, выборки должны браться равномерно по всему ареалу вида. Теоретически, выборки должны быть многократными и популяционно-репрезентативными, т.е. следовать временной и пространственной подразделенности вида на популяционные компоненты (Животовский, 2013), а полученные значения попарной межпопуляционной дифференциации сопоставляться между собой, для выявления естественных для вида значений на разных уровнях популяционной иерархии, с использованием прямой демографической и биологической информации.

1.10. Генетические риски при сохранении видов и популяций

В этом разделе мы рассмотрим с точки зрения теории и экспериментальных данных по лососевым рыбам три, связанных едиными процессами, явления и их последствия – аутбридинг, инбридинг и малый размер

популяции. Если отбросить стохастические факторы (ураганы, извержения вулканов), а также прямое воздействие на численность популяций человеком (охота, перелов, уничтожение мест обитания), вышеобозначенные факторы являются важнейшими в теории и практике природоохранной генетики, способными повлиять на судьбу вида, вплоть до его полного исчезновения.

Инбредная депрессия и концепция минимального жизнеспособного размера популяции. Явление снижения жизнеспособности особей, полученных в результате близкородственного скрещивания, мы будем называть далее инбредной депрессией (ИД). В основе этого явления, чаще всего, лежат следующие генетические механизмы:

1. Снижение генетического разнообразия популяции приводит к ее неспособности противостоять новым инфекциям из-за снижения адаптивного потенциала полиморфных, связанных с иммунным ответом локусов.

2. Появление ранее скрытых в гетерозиготах вредных аллелей в гомозиготном состоянии. Учитывая огромное количество генетического груза в здоровых популяциях животных (Muller, 1950; Kimura et al., 1963; Crow, 1993), при резком снижении численности индивиды становятся гомозиготными сразу по множеству вредных аллелей.

3. Снижение генетического разнообразия понижает способность популяции адаптироваться к будущим изменениям окружающей среды (как биотическим, так и абиотическим), снижая пластичность геномов популяции (Reed et al., 2003).

4. Уменьшение доли гетерозигот снижает полезный эффект сверхдоминирования для ряда локусов (Crow, 2000).

С давних времен, работники зоопарков, фермеры, собаководы стараются избежать инбредной депрессии в искусственных популяциях животных. Но какой должна быть эффективная численность популяции, чтобы избежать негативных эффектов близкородственного скрещивания? Впервые концепция минимального

жизнеспособного размера популяции (MVPS – *minimum viable population size*) была предложена в работах Соуле и Франклина в 1980 году (Soule, Franklin, 1980). В этих работах подводился теоретический базис под вопрос, насколько маленькой может быть популяция, чтобы избежать сильной инбредной депрессии с большой долей вероятности на протяжении 5 поколений (короткий промежуток времени)? На основе мнений животноводов, а также ограниченных данных по одомашненным и лабораторным животным была выведена цифра в 50 особей, как минимальная эффективная численность популяции, чтобы избежать инбредной депрессии и ее негативных последствий. На самом деле, негативные последствия инбредной депрессии сильнее выражаются в дикой, менее предсказуемой естественной среде обитания, чем в стабильных условиях искусственного разведения (Fox, Reed, 2011, цит. по Frankham et al., 2014). Также, наряду с MVPS для коротких промежутков времени, Франклином был предложен пороговый уровень для длинных временных (эволюционных) интервалов, равный эффективной численности популяции в пятьсот особей. Такой пороговый уровень численности должен был не только позволить популяции избежать инбредной депрессии в ряду многих поколений, но и позволить ей адаптироваться к новым, меняющимся условиям среды обитания (Jamieson, Allendorf, 2012). После, эта концепция, а в последствии, так называемое «правило 50/500» неоднократно обсуждалось, вызывая, порой жаркие дискуссии на страницах природоохранных научных журналов, между ведущими научными школами в области сохранения биоразнообразия – Фреда Аллендорфа и его оппонента Ричарда Фрэнкама (Jamieson, Allendorf, 2012; Frankham et al., Jamieson, Allendorf, 2013; Frankham et al., 2014). Главными вопросами обсуждения являлись критерии и их предсказательная ценность, чтобы делать выводы о том, какой именно должна быть минимальная эффективная численность популяции. Наиболее современный и развернутый анализ был сделан в недавней статье Фрэнкама с коллегами (Frankham et al., 2014). На основе теоретических разработок и экспериментальных данных последних лет из области природоохранной генетики, авторы приходят к следующим заключениям:

- 1) Для краткосрочных программ по сохранению биоразнообразия продолжать использовать временной промежуток в 5 поколений. Использовать меру именно в поколениях, так как она эффективно масштабируется и коррелирует с другими важными биологическими особенностями животных.
- 2) MVPS для краткосрочного сохранения жизнеспособности популяции должен быть не менее 100 особей, а не 50, как постулировалось долгое время. Согласно данным Фрэнкама с соавторами, современные модели и эмпирические знания показывают, что при численности $N_e=50$, общая приспособленность популяции, в среднем падает на 26% за 5 поколений (O'Grady et al., 2006).
- 3) Современная генетическая теория предсказывает (Weber, Diggins, 1990; Willi et al., 2006), что для долговременного существования популяции ее эффективная численность должна быть не менее 1000 особей, а не 500, как считалось ранее (Frankham et al., 2014).
- 4) Экстраполяцию номинальной численности популяций до эффективной численности (при отсутствии надежных данных по последней) нужно производить очень аккуратно, учитывая особенности видов (длина поколений, перекрываются они или нет, плодовитость). Вместо используемой универсальной меры $N_e/N_c = 0.10-0.14$ (Frankham, 1995; Palstra, Ruzzante, 2008), применять более широкие рамки $N_e/N_c = 0.1 - 0.2$.
- 5) Фрагментированные из-за антропогенного воздействия популяции должны подвергаться реинтродукции согласно определенным правилам (Weeks et al., 2011), с целью восстановления исторических генных потоков.
- 6) Инбредная депрессия и возможность ее развития должны включаться во все модели и учитываться, как неотъемлемая часть природоохранных программ.
- 7) От 12 до нескольких диплоидных леталей должно браться в расчет при прогнозировании инбредной депрессии (в зависимости от истории популяции и типа размножения – полового или бесполого).

Аутбридинг. В отличие от инбредной депрессии, хорошо задокументированной и описанной на разных уровнях организации (от молекулярного до видового), данные по аутбредной депрессии при скрещивании особей из разных популяций достаточно противоречивы. Теоретические основы аутбредной депрессии лежат в плоскости эпистатических, а также хромосомных взаимодействий в геноме. Перед специалистами в области охраны окружающей среды часто возникает вопрос о восстановлении каких-либо популяций, достигших очень низкой численности за счет популяций доноров, поэтому риски возникновения аутбредной депрессии и снижения плодовитости и выживаемости гибридов должны оцениваться очень тщательно.

Наиболее простой генетический механизм заключается в том, что локально-адаптированные популяции (особенно с высокой эффективной численностью) развивают в своих геномах взаимодействующие эпистатические системы, наилучшим образом соответствующие локальным условиям мест обитания (климатические факторы, «местные» патогены и др.), а будучи перемещенными в другие условия становятся мало адаптированными к ним, и испытывают повышенную смертность. Хороший пример этого явления – многочисленные транслокации лососевых рыб, не увенчавшиеся успехом, неудачность которых увеличивается с расстоянием, на которое перемещались рыбы (Fraser et al., 2011).

Другой генетический механизм возникновения аутбредной депрессии более сложен и кроется в особенностях эпистатических аллельных взаимодействий по разным локусам и вызываемых ими нарушениях развития, стерильности, снижения выживаемости гибридов. Основа этого явления – концепция коадаптированных генных комплексов (КГК). КГК представляют собой набор аллелей, которые в данных условиях среды позволяют организму эффективно выживать. В простейшем случае рассматривается модель с двумя локусами (А и В) и четырьмя аллелями (А,а,В,в). В одной популяции создается

КГК, состоящий из аллелей ААВВ по этим локусам, в другой же создается КГК из других аллелей ааbb. При смешивании двух популяций, в результате кроссинговера, эти генные комплексы разрушаются и создаются летальные или слаболетальные аллельные комбинации, ведущие к снижению приспособленности популяции (Рисунок 1.10.1).

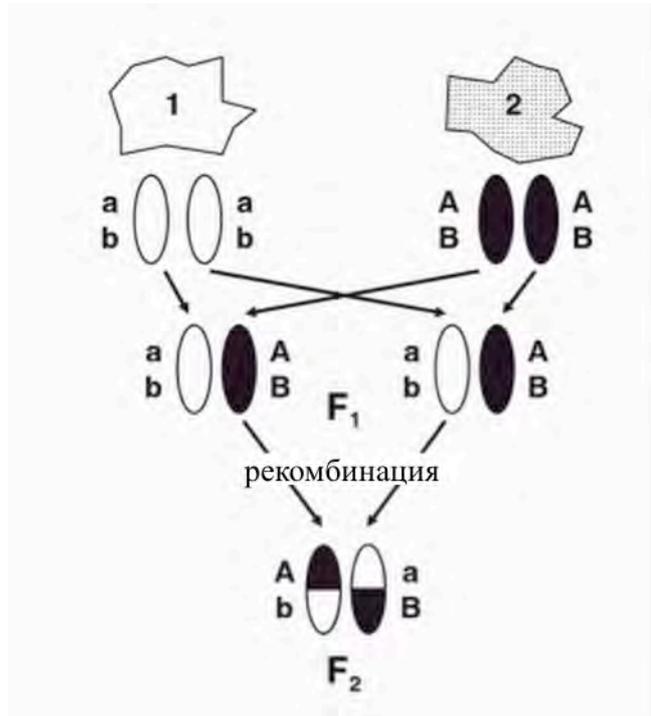


Рисунок 1.10.1. Коадаптированные генные комплексы, возникающие в двух локальных популяциях (1 и 2) в условиях различных мест обитания, и последующая рекомбинация (после скрещивания особей), разрывающая связи внутри них (По: Frankham et al., 2002).

На данный момент накоплено немало примеров наличия КГК в популяциях животных и репродуктивной изоляции разных уровней ею вызываемых (Lacy, 1998; Berton et al., 1999; Dudash, Fenster, 2000). Учитывая, что в организмах животных 10-25 тыс. генов, и огромное число аллельных вариантов, истинные масштабы распространенности КГК в естественных популяциях должны быть очень широкими, а их роль в эволюции и видообразовании нельзя недооценивать.

Какова вероятность аутбредной депрессии при осуществлении транслокации особей по причине разрыва КГК ? Исследования последних лет позволяют говорить, что создание устойчивых КГК требует с одной стороны длительных эволюционных промежутков (тысячи поколений), а с другой стороны наличие высокой эффективной численности. В условиях сильного генетического дрейфа возникновение КГК относительно маловероятно (Gavrilets, 2004).

На основе анализа, накопленного в литературе за многие годы исследования материала, в 2011 году, почти параллельно вышло две крупных работы, посвященных обобщению имеющихся данных по аутбредной депрессии и выработке практических рекомендаций для природоохранного менеджмента (Frankham et al., 2011, Weeks et al., 2011).

В начале, авторы одной из работ (Frankham et al., 2011) выделяют три наиболее вероятных механизма аутбредной депрессии:

1) Хромосомные различия.

Эффект фиксированных хромосомных различий в возникновении репродуктивной изоляции хорошо документирован (White, 1978; Rieseberg, 2001). Популяции с фиксированными хромосомными различиями имеют высокую вероятность возникновения аутбредной депрессии. Особенно выражен эффект у полиплоидных видов. В естественных популяциях нередки различия в числе хромосом, вызванные такими причинами, как генетический дрейф, отбор, летальность гетерозигот по хромосомным абберациям.

2) Адаптивная дифференциация в аллопатрии.

Фанк с соавторами (Funk et al, 2006) сообщает о более чем 500 видах животных, внутри которых показан тот или иной уровень репродуктивной изоляции, ассоциированный с экологической дивергенцией. В трех изолированных озерах Британской Колумбии, колюшки (*Gasterosteus* spp.) независимо развили бентосную и лимническую формы. Скрещивание между этими формами из одного и трех разных озер приводит к пониженной приспособленности потомства, в то время как скрещивание рыб одной формы из разных озер, не приводит к этому эффекту (Rundle et al., 2000). Значительная часть генов,

ассоциированных с репродуктивной изоляцией у разных видов, имеет признаки естественного отбора (Orr et al., 2007).

3) Генетический дрейф и популяционное бутылочное горлышко.

Популяционные бутылочные горлышки раньше часто рассматривались, как один из главных факторов в развитии репродуктивной изоляции (Mayr, 1963; Templeton, 2008). Несмотря на это как теоретические, так и экспериментальные изыскания отмечают, что все же отбор является основным фактором развития репродуктивной изоляции, не считая случаев возникновения хромосомных aberrаций (Coayne, Orr, 2004; Gavrilets, 2004; Templeton, 2008). Дрейф вместе с естественным отбором может вести к развитию и эволюции различных коадаптированных генных комплексов в полностью изолированных популяциях в пределах одинаковых экологических условий (Whitlock et al, 1995). Несмотря на это, популяции, испытывающие сильную инбредную депрессию, вероятнее выиграют от «генетической помощи из вне», чем проиграют от последствий аутбредной депрессии (Fenster, Galloway, 2000).

Далее, на основе указанных трех механизмов и реальных данных по многим видам животных, авторы обсуждаемого исследования (Frankham et al., 2011) разрабатывают математическую модель, согласно которой вероятность возникновения локальных адаптаций и аутбредной депрессии является функцией четырех факторов: разница в силе отбора для разных мест обитания, наследуемость количественных признаков (как функция генетического разнообразия для репродуктивной приспособленности), эффективный размер популяции и количество поколений, прошедших с начала изоляции популяций. Фрэнкхам с коллегами утверждают, что для развития репродуктивной изоляции в одинаковых экологических условиях мест обитания, как минимум тысячи поколений требуются в отсутствие фиксированных хромосомных aberrаций (Frankham et al., 2011). В различных же экологических условиях мест обитания признаки репродуктивной изоляции между популяциями растений,

беспозвоночных и позвоночных животных могут развиваться в масштабах всего лишь десятков поколений (Frankham et al., 2011, цит. по Hendry et al., 2007).

Обобщая все эти данные, Франкхем с соавторами создает схематичное «дерево решений», которые логично принимать, имея начальную информацию по кариотипам, уровню репродуктивной изоляции и адаптаций популяций (Рисунок 1.10.2).

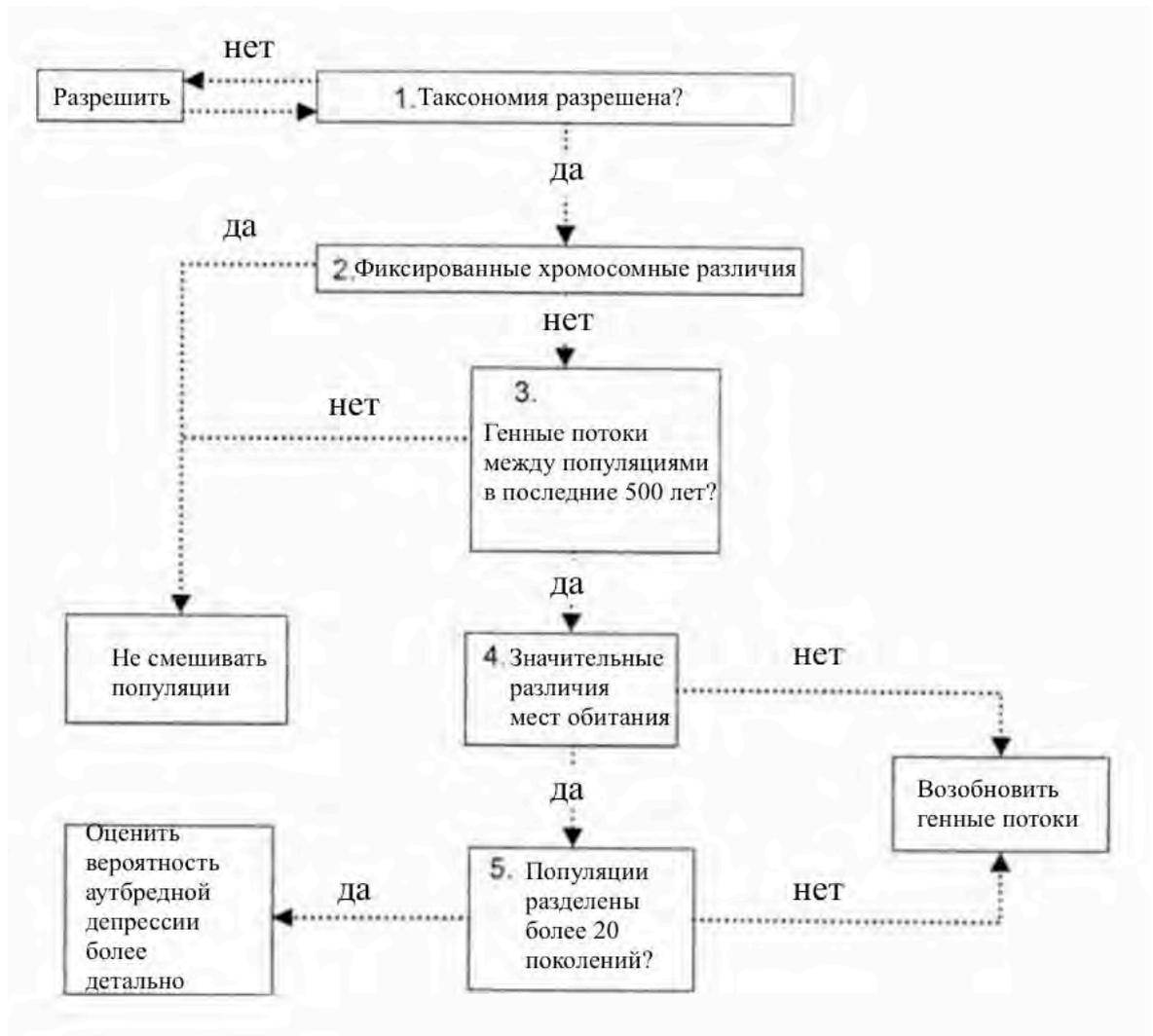


Рисунок 1.10.2. Дерево решений для предсказания вероятности возникновения аутбредной депрессии при осуществлении природоохранных программ (По: Frankham et al., 2011).

История изучения аутбредной депрессии у лососевых рыб достаточна обширна. Проводились как прямые эксперименты, направленные на выявления эффектов аутбридинга, так и исследования, по результатам множественных

(особенно в 20 веке) транслокаций рыб в целях искусственного воспроизводства видов. Гилк с коллегами (Gilk et al., 2004) сообщала о ярко выраженной аутбредной депрессии у рыб третьего поколения горбуши, полученных от скрещивания особей из популяций на расстоянии 1000 км друг от друга как для поколений четных, так и нечетных лет. Интересно, что также наблюдались негативные последствия гибридизации для горбуши нечетных лет в первом поколении, в то время как для рыб четного поколения этого эффекта в первом поколении не наблюдалось. Авторы связывают это с возможно различной природой аутбредной депрессии – появлением плохо адаптированных мультилокусных генотипов в первом поколении и разрывов коадаптированных генных комплексов в третьем поколении. Еще более выраженный эффект аутбредной депрессии у горбуши описал Гарретт с соавторами (Gharrett et al., 1999), изучая гибридов между рыбами нечетного и четного поколений. Кроме того, ими был показан эффект гетерозиса у горбуши – увеличение средних размеров тела. Ванг с соавторами (Wang et al., 2007) показали худшую выживаемость икры и эмбрионов у гибридов отдаленных популяций горбуши. Учитывая, что среди тихоокеанских лососей горбуша характеризуется наибольшими значениями стрейнга между популяциями, можно ожидать, что для других видов лососевых аутбредная депрессия должна быть выражена сильнее? Экспериментальные данные на этот счет разнятся: например, Дан с соавторами (Dann et al., 2010) не обнаружили признаков аутбредной депрессии у гибридов первого и второго поколений кижуча юго-восточной Аляски, хотя, между популяциями наблюдалась значительная генетическая дифференциация. Макгинити с коллегами (Mcginity et al., 2003) описывают пониженную выживаемость и существенное изменение миграционного поведения для гибридов между заводскими и дикими популяциями атлантического лосося – еще один важный аспект аутбредной депрессии для районов с развитой лососевой аквакультурой. Хауде с соавторами (Haude et al., 2010) показали пониженную приспособленность гибридов заводских и диких рыб атлантического лосося к избеганию хищников, что интересно наследуемостью поведенческого признака с

одной стороны, и показательно в контексте возможной экологической аутбредной депрессии с другой.

Сегодня, доминирующим и наиболее научно-обоснованным является подход, согласно которому, аутбредные процессы должны быть по возможности исключены, а при значительной необходимости, для поддержания численности малых изолированных популяций, должны использоваться смежные популяции с наименьшим от них уровнем дивергенции из сходных мест обитания. В то же время возможно смещение в публикации данных об аутбредной депрессии, но более редкие сообщения об ее отсутствии, что преувеличивает с одной стороны негативные последствия аутбредной депрессии, а с другой стороны занижает полезные эффекты гетерозиса, как было отмечено в книге «Введение в природоохранную генетику» Ричардом Фрэнкхамом (Frankham et al., 2002).

Таким образом, сахалинский таймень населяет фрагментированный под действием антропогенных факторов ареал, который был подвергнут сокращению в 20-ом веке. Вид является единственным представителем рода *Parahucho*, отделившегося от общего предка с гольцами и тихоокеанскими лососями около 25-30 миллионов лет назад. Миграционное поведение сахалинского тайменя отличается активными миграциями внутри пресноводных бассейнов, а также существуют доказательства выхода в море. Как долго таймень находится в море, и заходит ли в другие водоемы остается неизвестным. Сахалинский таймень обладает исторически низкой численностью, которая быстро снижается с середины 20-го века под влиянием перелова, разрушения среды обитания и, возможно, климатических изменений на краях ареала. Популяционная структура сахалинского тайменя остается совершенно неизученной, хотя морфометрические данные говорят о большой схожести популяций. Широкомасштабных популяционно-генетических исследований, которые могли бы пролить свет на особенности миграций сахалинского тайменя на ареале, генетического разнообразия популяций, особенностей формирования его популяционно-генетической структуры до настоящего времени не проводилось. Накопленный за

последние десятилетия опыт природоохранной генетики должен применяться для сохранения популяционных генофондов сахалинского тайменя.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Сбор образцов для исследования

В работе использованы выборки, добытые в ходе многочисленных экспедиций на реках Дальнего Востока России в период с 1996 по 2012 годы. Выборки, взятые после занесения сахалинского тайменя в Красную книгу РФ и Сахалинской области, собирались согласно разрешениям Министерства Природных Ресурсов Российской Федерации. Рыбы отлавливались закидным неводом длиной 22 метра, с ячеей 18 миллиметров на речных плесах и неглубоких ямах, а также спиннингом с одинарным крючком без бородки. Сразу после поимки длина рыбы измерялась мерной лентой, пинцетом отбиралось несколько чешуек и отрезался маленький кусочек плавника, после этого рыба отпускалась в естественную среду обитания. Автор работы принимал непосредственное участие в отлове особей сахалинского тайменя в ходе экспедиций. Кусочки плавников сразу помещались в пробирку с 98% этанолом, и, по окончании экспедиции, хранились при температуре -40 °С.

Часть проб была получена в виде ихтиологических чешуйных коллекций, любезно предоставленных разными исследователями, работавшими на Дальневосточных реках. Подробное описание собранных выборок представлено в Приложении 1 и на Рисунке 2.1.1.

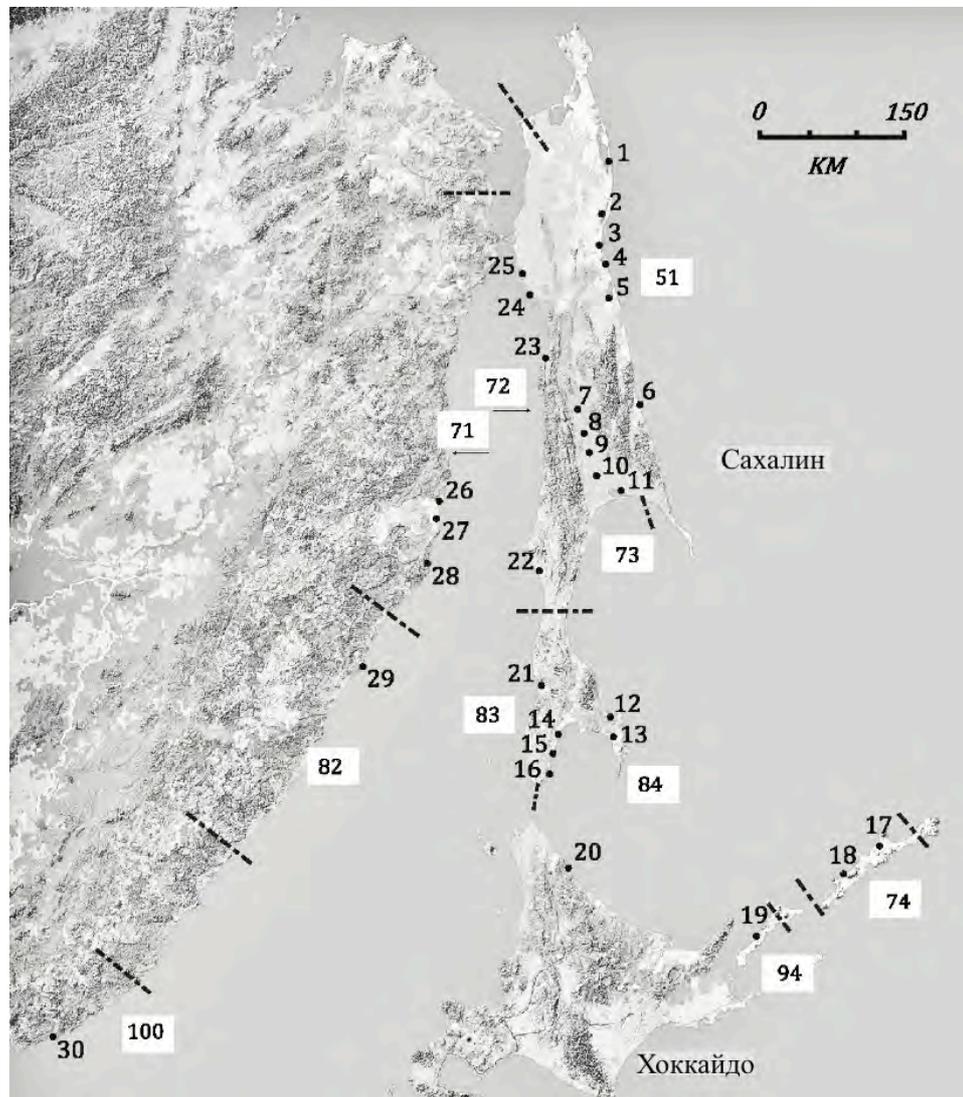


Рисунок 2.1.1. Карта выборок сахалинского тайменя. Номерами без выделения обозначены водоемы, номера в белых квадратах – зоогеографические регионы Дальнего Востока (по Мартыненко, 2007). Пунктирные линии – границы экорегионов. В скобках дан размер каждой выборки. **1**: зал. Пильтун (8), **2**: р. Вал (14), **3**: р. Даги (40), **4**: р. Тымь (11), **5**: р. Набиль (20), **6**: р. Лангери (10), **7**: р. Поронай (11) и её притоки (**8**: Онорка (12), **9**: Брусничная (11), **10**: Ельня (21)), **11**: оз. Невское (8), **12**: оз. Тунайча (16), **13**: оз. Большое Вавайское (28), **14**: р. Урюм (3), **15**: р. Ульяновка (11), **16**: р. Могучи (6), **17**: р. Лебединое (7), **18**: р. Куйбышевка (7), **19**: оз. Валентины (6), **20**: р. Сарафуцу (9), **21**: оз. Тайное (9), **22**: оз. Айнское (60), **23**: р. Агнево (13), **24**: река и залив Виахту (42), **25**: зал. Тык (10), **26**: р. Улика (15), **27**: р. Тумнин (26), **28**: р. Коппи (24), **29**: р. Самарга (9), **30**: р. Киевка (6).

2.2. Разработка панели микросателлитных локусов, генотипирование образцов и секвенирование фрагментов митохондриальной ДНК

Микросателлитные локусы ДНК являются надежным, проверенным инструментом для выявления популяционной структуры видов (Sunnucks, 2000), широко применяются для нужд судебной генетики, природоохранной биологии и различных микроэволюционных исследований (Weir et al., 2006). На момент начала данного исследования (2009 год) вышло две работы (Hatakeyama et al., 2005, Korun et al., 2009) японских и австрийских исследователей, предложивших две панели из пятнадцати динуклеотидных и восьми тетрануклеотидных локусов, соответственно. К сожалению, большинство локусов в обоих наборах имели большой размер конечного ПЦР-продукта и не могли быть разделены в полиакриламидном геле (широко используемая методика генотипирования, в том числе, применяющаяся и в Лаборатории Генетических Проблем Идентификации ИОГен РАН). Чтобы преодолеть эту трудность были созданы новые праймеры для опубликованных ранее микросателлитных локусов сахалинского тайменя, а также опробована амплификация на тотальной ДНК тайменя 21 микросателлитного локуса, из созданных изначально для других видов лососевых рыб (Crane et al., 2004; Jackson et al., 1998; Rexroad et al., 2002; Nelson, Beacham., 1999; Smith et al., 1998; Small et al., 1998; Olsen et al., 2000; Buchholz et al., 2001). Шесть из них успешно амплифицировались и дополнили собой панель локусов для популяционно-генетических исследований сахалинского тайменя. В Таблице 2.2.1 представлены праймерные последовательности, использовавшиеся в работе для амплификации образцов ДНК сахалинского тайменя и генотипирования выборок, а также общая характеристика микросателлитных локусов ДНК.

Таблица 2.2.1. Праймеры для амплификации образцов ДНК сахалинского тайменя

Локус	Праймерные последовательности	Число аллелей	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Число успешно генотипированных образцов	Ожидаемая гетерозиготность (He)	Температура отжига праймеров, °С	Мотив микросателлита	Ссылка
Pper1g	F: gtaccacactactttgtgcttt	54	120-250	460	0.957	53	(TGTC)n	(Шитова и др., 2012)
	R: cacagtcagtaaggcagctca							
Pper2g	F: caagtaggggtgaatcaacatgtt	24	154-246	464	0.929	53	(GACA)n	(Шитова и др., 2012)
	R: atgtggccattgttctgatgat							
Pper3g	F: ccaactctctctgtattatgt	25	142-250	460	0.929	53	(GTCT)n	(Шитова и др., 2012)
	R: tgacacacaccggagctagt							
Pper5g	F: gctctggacctttctgtg	11	152-172	465	0.610	55	(AC)n	(Korun et al., 2009)
	R: gtttaaagggtaaagggtgtgag							
Hper25E	F: gcaggctaactctaaatgtg	2	106-112	468	0.489	56	(GA)n	(Шитова и др., 2012)
	R: catgtatatgtattgcaatctcac							
Pper8g	F: gagggattaagagatagatataa aga	8	109-123	471	0.777	53	(AG)n	(Шитова и др., 2012)
	R: gtcaatggcaaaaagtatctaagtc							
Smm17	F: aaggatggtgaggacaataca	7	130-144	469	0.471	52	(CA)n	(Шитова и др., 2012)
	R: accttgagaatctatatgtgtgcta							
Omy301	F: acttaagactggcaacctt	2	70-72	473	0.341	52	He известна	(Шитова и др., 2012)
	R: ctacacggccttcgggtgaga							
Pper11g	F: tgtcaggaggacacactgta	20	154-226	452	0.882	53	(ATGG)n	(Шитова и др., 2012)
	R: gttttgttcagcaccaaatcac							
Hper15E	F: tggtagcatccatgtgga	8	96-112	470	0.651	53	(GT)n	(Hatakeyama et al., 2005)
	R: catccagcctatcgaagcc							
Hper4E	F: cacactcatgaccagatataaca	4	98-106	472	0.104	56	(GT)n	(Шитова и др., 2012)
	R: tcagctgatgtaagaaggctt							
Hper16E	F: tgggggaggtggcggttt	9	134-152	467	0.633	56	(GT)n+(G T)m	(Шитова и др., 2012)
	R: gagaagcacgtattgttttagtca							
Pper6g	F: gatgtaattaccttgtgtgactaca	17	101-155	464	0.834	53	(CA)n	(Шитова и др., 2012)
	R: gtaaagtttcattgccaccacaatca							
Pper7g	F: ggaatcgctgctcaatg	7	128-152	466	0.540	54	(TG)n	(Шитова и др., 2012)
	R: tgcagtatgtgtgggtgctct							
Bletri3	F: cagacgtggcgcttgtttgt	9	113-137	466	0.548	55	(CAT)nC(ATT)n	(Froufe et al., 2004)
	R: ctagtcaggaagcaagtgatg							
BleTet5	F: cttctcaccggcctgagtgt	11	175-280	471	0.248	57	(TGTC)n	(Froufe et al., 2004)
	R: ttgaatgggctatctggctgt							
Hper5E	F: agataacatgaggaaggag	3	172-	465	0.471	53	(CA)n	(Hatakeyama et al., 2005)

Локус	Праймерные последовательности	Число аллелей	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Число успешно генотипированных образцов	Ожидаемая гетерозиготность (He)	Температура отжига праймеров, °С	Мотив микросателлита	Ссылка
	R: gcgaacgcagagataatag		186					ma et al., 2005)
Oki10g	F: gaggctggacagattggatt	33	148-232	455	0.922	55	(CTGT)n	(Шитова и др., 2012)
	R: gggagctacagctttttacaatc							
Hper6	F: gtaatagcagtcctttgtgaaagtg	7	95-107	452	0.260	56	(CA)n	(Шитова и др., 2012)
	R: gtgcatttatccaggggtgact							

В ходе данной работы тотальная днк сахалинского тайменя выделялась с помощью наборов Diatome DNA prep kit 200 (компания Изоген). Количество и качество полученных препаратов ДНК определяли путем электрофореза в 0.7% агарозном геле в буфере TBE (трис-ЭДТА-боратная система), а затем пробы просматривались в УФ-свете после окраски бромистым этидием (5 мкг/мл, 10-15 мин.). Для определения концентрации ДНК интенсивность свечения исследуемых образцов сравнивалась с интенсивностью свечения ДНК фага λ известной концентрации. После определения количества ДНК ее разводили до концентрации 50-100 нг/мкл с помощью «ЭкстраГен» (ООО «ИзоГен», Россия). Полученные препараты ДНК использовали для проведения дальнейших исследований.

Для ПЦР-амплификации использовали наборы Gene Park PCR Core (ООО «ИзоГен», Россия), к которым добавляли 5 мкл смеси праймеров (конечная концентрация каждого - 0.5 мкМ) и 5 мкл исследуемой ДНК. Амплификацию микросателлитных локусов проводили в термоциклерах «Applied Biosystems 9800 Fast» и «Applied Biosystems Veriti 96 Well Fast» при следующем режиме: реакцию начинали процессом денатурации в течение 2 мин. при 94°C, затем проводили 30 циклов, включающих 30 секунд денатурации ДНК-матрицы при температуре 94°C, 30 сек. отжига праймеров при 50-60°C и синтез новых цепей в течение 30 сек. при 72°C; далее следовала элонгация – 2 мин. при 72°C и охлаждение до 4°C. При апробации всех локусов использовалась температура отжига для каждой

пары праймеров 50-51°C, в зависимости от полученных результатов для некоторых пар праймеров температура повышалась до 54-56°C.

Аликвоты амплифицированных продуктов разделяли в вертикальном блоке 6% неденатурирующего полиакриламидного геля в 0.5x TBE буфере pH 8.0 (Маниатис и др., 1984) при 300В в течение 2-3.5 часов.

Полученные электрофореграммы визуализировали путем окрашивания бромистым этидием (5 мкг/мл, 10-15 мин.) и фотографировали в УФ-свете.

Для точности определения длин ПЦР-продуктов микросателлитных локусов использовался метод «лестница»: брался один образец из 3-10 соседних на геле (в зависимости от степени различий между ними), затем образцы ранжировались по определенному размеру и прогонялись вместе. При анализе каждой новой выборки, для таких прогонов использовалось несколько образцов (от максимально длинных до максимально коротких) из прошлых (в том числе первых) выборок, что гарантировало сопоставимость аллельных длин между выборками. Если образец определенного размера «выскакивал» из своей размерной группы в геле, он переамплифицировался и подвергался электрофорезу в геле вновь.

Амплификация и секвенирование митохондриальных фрагментов ДНК.

Для анализа митохондриальной ДНК сахалинского тайменя были выбраны два фрагмента, традиционно используемые в филогеографических исследованиях: часть гена цитохромоксидазы-1 (*COI*) и цитохрома *b* (*CytB*), длиной 600 п.н. и 429 п.н. соответственно. Помимо этих локусов также рассматривался фрагмент D-петли длиной 420 пн, было секвенировано 48 последовательностей, но полиморфизм в нем оказался крайне низким (2 полиморфных сайта) и он был исключен из дальнейшего анализа. Рассматривались и другие фрагменты из имеющихся в доступных базах данных последовательностей (ND5, АТР6), но использованные в работе оказались наиболее информативными. Фрагменты были амплифицированы по той же методике, что и микросталлитные локусы с использованием праймеров,

разработанных на основе митохондриального генома сахалинского тайменя (Shedko et al., 2013). Последовательности праймеров представлены в таблице 2.2.2. Оба использованных в работе фрагмента мтДНК для 103 особей сахалинского тайменя из разных частей ареала (Рисунок 2.2.1, Таблица 3.2.2) были секвенированы в компании «Синтол».

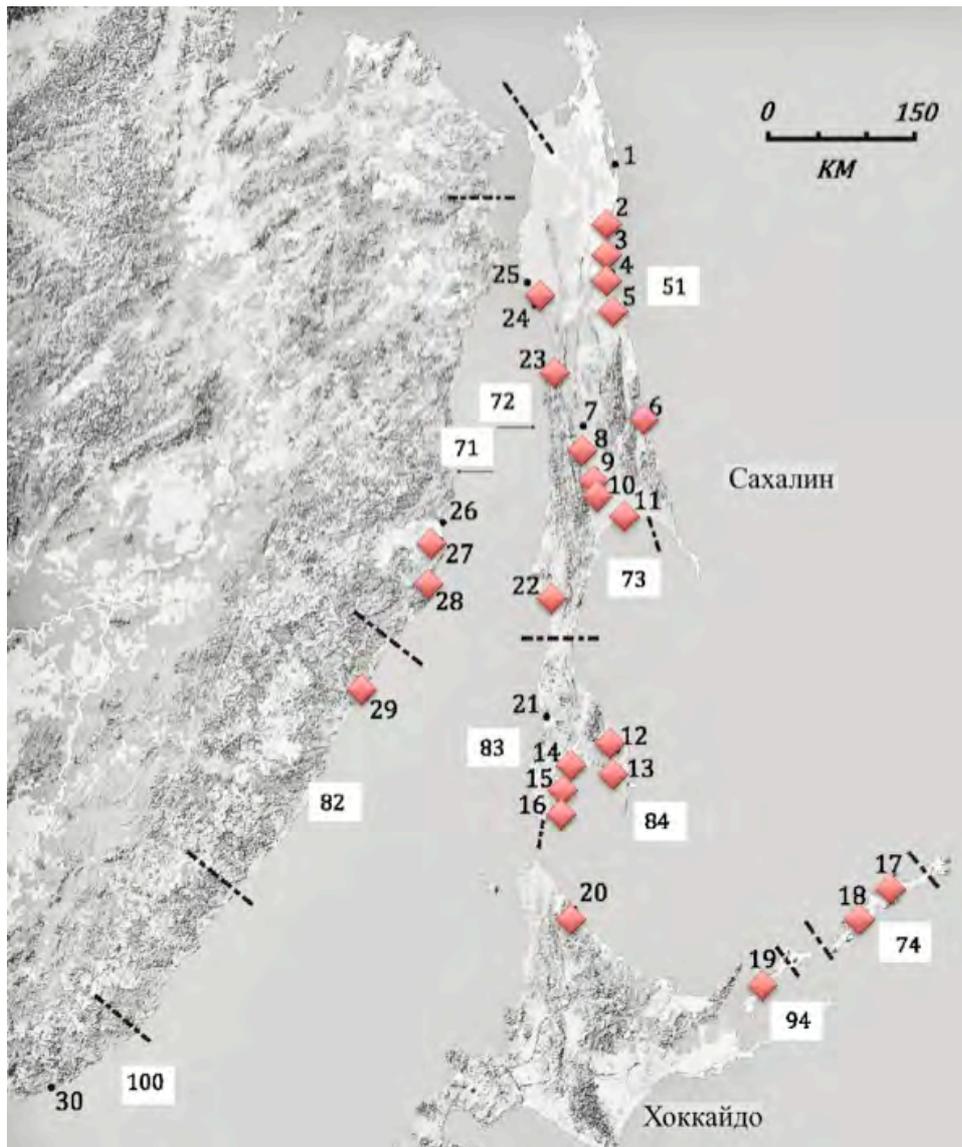


Рисунок 2.2.1. Ромбами отмечены выборки использовавшиеся для филогеографического анализа фрагментов митохондриальной ДНК сахалинского тайменя (в скобках дано число исследованных проб): 2: р. Вал (4), 3: р. Даги (5), 4: р. Тымь (6), 5: р. Набилъ (3), 6: р. Лангери (4), 8: Онорка (5), 9: Брусничная (1), 10: Ельная (6)), 11: оз. Невское (2), 12: оз. Тунайча (3), 13: оз. Большое Вавайское

(4), **14**: р. Урюм (2), **15**: р. Ульяновка (3), **16**: р. Могучи (5), **17**: р. Лебединое (5), **18**: р. Куйбышевка (2), **19**: оз. Валентины (5), **20**: р. Сарафуцу (4), **22**: оз. Айнское (4), **23**: р. Агнево (3), **24**: река и залив Виахту (9), **27**: р. Тумнин (4), **28**: р. Коппи (8), **29**: р. Самарга (6).

Таблица 2.2.2 Прамеры для амплификации фрагментов митохондриальной ДНК сахалинского тайменя.

Локус	Праймерные последовательности	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Температура отжига праймеров, °С
CO1	F: CCTTTATTAGTATTTGGTGCCT	836	58
	R: CCGACAGTAAACATATGGTG		
CytB	F: CGAGGACTTTACTATGGCTCCTAC	844	60
	R: CAGGCTCATCAAGGGCTTTATTT		

2.3 Статистический анализ данных

Популяционная дифференциация.

При большом объеме материала наиболее правильной стратегией является анализ всех выборок из всех водоемов в отдельности, так как они могут представлять собой рыб, принадлежащих разным экологическим группам, быть близкими родственниками, кроме того, может существовать темпоральная гетерогенность в популяциях (Животовский, 2013). В данной работе основной анализ протекал на двух уровнях – первичных выборок и популяционных выборок. Под популяционными выборками в работе подразумевается от одной до трех объединенных выборок с одного водоема, между которыми не было найдено статистически значимой генетической дифференциации по результатам попарного теста гетерогенности (Weir, 1990) на основе 10000 межлокусных бутстреп-репликаций в программе Microsatellite Analyzer (Dieringer, Schlötterer, 2003). Две выборки рассматривались как одна гомогенная, и впоследствии объединялись, если 95% доверительный интервал значений θ (Weir, Cockerham, 1984) перекрывался со значением 0.

Необходимость рассмотрения популяций на ряду с выборками вытекает из особенностей исследуемого материала с одной стороны (крайняя сложность сбора проб редкого краснокнижного вида), и особенностей многих методов популяционного-генетического анализа (оценка эффективной численности, анализ популяционной структуры в пространстве главных компонент, популяционные дендрограммы с бутстреп-поддержкой и др.), сильно зависящих от размера выборки (с уменьшением размера выборки возрастает ошибка оценки частоты каждого аллеля в популяции), с другой стороны.

Для оценки значимости отклонений от равновесия Харди-Вайнберга в выборках по каждому из локусов использовался «Exact test» (Weir, 1990; Zaykin et al., 1995) в программе GDA (Lewis, Zaykin 2001), с последующей корректировкой p -значений с помощью *sequential Bonferroni correction* (Rice, 1989). Для оценки отклонений от равновесия Харди-Вайнберга в выборках и популяциях усредненно по всем локусам использовался «*Global Test*» (Raymond, Rousset, 1995) в программе GenePop 4 (Rousset, 2008) на основе избытка и недостатка гетерозигот в популяции, с числом Марковских цепей (MCMC) = 10000. Для тестирования эффекта размера выборки, все особи из одного водоема объединялись, и вновь тестировались. Значимость отклонений была скорректирована с помощью *sequential Bonferroni correction* (Rice, 1989).

Кластеризация выборок.

Метод анализа в пространстве главных компонент (Jolliffe, 2005) – один из основных способов уменьшить размерность данных, потеряв наименьшее количество информации и, выявив, при этом основные паттерны изменчивости выборки. Метод активно применяется во многих науках и является очень популярным в популяционной генетике на протяжении десятилетий как для небольшого числа признаков (Menozzi et al., 1978), так и для огромных массивов данных по генетическим полиморфизмам (Novembre et al., 2008). Для кластеризации особей в пространстве главных компонент была создана матрица с размерами ПЦР-продукта каждого аллеля для каждого локуса по оси X и особями по оси Y. В случае гомозиготы по одному и тому же аллелю какого-либо локуса в

клетку матрицы ставилось значение «1» напротив особи, в случае же гетерозиготного генотипа особи по этому локусу ставилось значение «0.5» напротив каждого из двух аллелей гетерозиготы. Остальные клетки, а также не идентифицированные генотипы заполнялись значениями «0». Анализ в пространстве главных компонент производился в программе *PAST* (Hummer et al., 2009) с использованием ковариационной матрицы, размах вариации, приходящийся на каждую из компонент, тестировался с помощью 1000 бутстреп-репликаций.

Для популяционных выборок был использован классический метод анализа в пространстве главных компонент на основе частот аллелей. Для каждой популяции были определены частоты всех аллелей для каждого локуса, а затем была создана матрица с популяциями по оси Y и аллелями по оси X. В большинстве программных пакетов существует выбор между ковариационной или корреляционной матрицей для вычисления главных компонент. Учитывая, что отдельные аллели имеют высокую частоту во многих популяциях, а число аллелей сильно варьирует для каждого из локусов, была использована корреляционная матрица, нивелирующая различия по размаху вариабельности для каждого признака. Анализ также был выполнен с использованием программы *PAST* (Hummer et al., 2009).

Наряду с методом анализа в пространстве главных компонент, широко используется для выявления значительно дивергированных групп особей на уровне популяция-вид построение дистанционных деревьев методом ближайшего соседства (*Neighbor-Joining*) на основе попарных индивидуальных мультилокусных генотипов (*Dps-distance*, пропорция одинаковых аллелей, Bowcock et al., 1994). Метод хорошо зарекомендовал себя для выявления паттернов генетической изменчивости как человеческих, так и других популяций (Culver et al., 2000; Eizirik et al., 2001; Johnson et al., 2006).

Межиндивидуальные попарные дистанции (*Dps*) были рассчитаны в программе *MSA 4.05* (Dieringer, Schlötterer, 2003) с трансформацией $1-Dps$.

Дерево по методу ближайшего соседства построено на основе матрицы в программе *PhyIip* (Plotree, Plotgram, 1989).

Наряду с подходом, основанным на кластеризации отдельных особей, также существует подход на основе кластеризации выборок или заранее предопределённых популяций (на основе географической близости, морфологического сходства, языкового сходства для человеческих популяций). В основе популяционного подхода к кластеризации лежит разница в частотах аллелей между далекими, изолированными популяциями и сходство между близкими, недавно дивергировавшими, и, возможно, имеющими миграционные потоки популяциями. При этом использование средней частоты аллелей в популяции помогает избежать сильных отклонений из-за наличия редких аллелей, ошибок генотипирования при малых выборках. Главное преимущество метода – возможность тестировать наличие групп популяций с помощью бутстрепа по локусам – метод малоприменимый для отдельных особей, ввиду наличия лишь двух аллелей у каждого индивида. При небольшом числе локусов (10-20) с умеренным аллельным разнообразием в ходе бутстреп репликаций хорошую статистическую поддержку получают лишь очень сильные паттерны популяционной дифференциации на уровне скорее подвидов, чем популяций, что было продемонстрировано в ряде работ (Culver et al., 2000; Eizirik et al., 2001). В то же время, усреднение частот аллелей в популяционных выборках позволяет интенсивно тестировать гипотезу об эволюционной близости популяций, сглаживая эффект малой выборки. Для построения дистанционных деревьев на уровне предопределённых (выборки с одного водоема) популяций вычисления осуществлялись в программе *MSA* 4.05 (Dieringer, Schlötterer, 2003) с использованием расстояния *Dps* (Bowcock et al., 1994), а также расстояния Нея *Da* (Nei et al., 1983), придающего больший вес редким аллелям. Дендрограммы были построены с помощью программы *Consense* пакета *PhyIip* (Plotree, Plotgram, 1989) и визуализированы в программе *Figtree* 1.4 (Rambaut, 2009).

Анализ в программе *STRUCTURE*.

Среди новых вычислительных методов последних лет, одним из наиболее значимых и популярных является разработанный Джонатоном Притчардом байесовский алгоритм, реализованный в программном пакете *STRUCTURE* (Pritchard et al., 2000). Алгоритм подразумевает наличие нескольких популяций (K) для выборки особей, генотипированных по ряду локусов. Подразумевается, что в каждой популяции наблюдается равновесие Харди-Вайнберга и свой паттерн неравновесия по сцеплению. Пользователь дает программе генотипы каждой особи и задает вероятный размах числа возможных популяций. После этого запускается алгоритм, основанный на использовании Марковских Цепей Монте-Карло. В ходе каждого шага Марковской цепи особи перетасовываются между возможным числом популяций, а в это время считаются частоты аллелей и соотношение Харди-Вайнберга для каждой популяции, вычисляется логарифм значения функции максимального правдоподобия для заданного числа популяций. После этого, выбирается наиболее правдоподобное число популяций, которое максимизирует популяционную изменчивость при заданной модели. Со времен первой статьи алгоритм приобрел новые дополнения и очень активно используется исследователями по всему миру (12760 цитирований на 2014 год, <http://scholar.google.ru/>).

Для оценки популяционной структуры сахалинского тайменя на основе мультилокусных генотипов использовалась программа *STRUCTURE* 2.3.4. (Pritchard et al., 2000), тестировались от 1 до 30 K (вероятное число популяций) для полного набора данных. Для каждого числа K анализ повторялся 10 раз с целью сбора необходимой статистики по значениям и средней дисперсии логарифма значения функции правдоподобия. Тестирование числа возможных популяций производилось с помощью 450 000 генераций Марковских Цепей Монте-Карло, с отбрасыванием (*burn-in*) первых 250 000 генераций. В модели подразумевалось наличие разных частот аллелей для каждого локуса между разными популяциями (*uncorrelated allele frequency*) и возможность миграционных потоков между любыми популяциями (*admixture*). Такие свободные параметры были использованы, чтобы позволить программе выбрать

оптимальное число популяций, полагаясь лишь на частоты аллелей и равновесие Харди-Вайнберга, не делая предположений о predetermined популяционной структуре. Изначально алгоритм программы *STRUCTURE* создавался для классической «островной» модели популяции. Дальнейшее активное использование алгоритма с данными из природных и искусственных (породы) популяций животных, а также тестирование на моделях обнаружило слабость к выявлению иерархической метапопуляционной структуры, часто встречающейся в природе, особенно для ступенчатой модели миграций (Evanno et al., 2005), подразумеваемой в нашем случае, исходя из особенностей вида (миграция на небольшие расстояния между соседними водоемами). Для решения этой проблемы был предложен алгоритм выявления оптимального числа K не только на основе чистых значений функции правдоподобия, но и с учетом величины стандартных отклонений для каждого набора репликаций (Evanno et al., 2005). Данная статистика получила название *delta-K* (дельта- K). Методика позволяет выявить число высших иерархических групп популяционной структуры, а повторение анализа для каждой из групп в отдельности позволяет определить число демов, низших групп метапопуляционной иерархии свойственной, в том числе, и лососевым рыбам. Выборки были разделены между пятью выявленными группами исходя из наибольшего значения коэффициента принадлежности (*membership coefficient*) по всем особям для каждой выборки, а также географической принадлежности популяций, и, описанный выше анализ был повторен для каждой из пяти групп. Для визуализации и постобработки файлов *STRUCTURE* использовались программы *CLUMPP* 1.1.1 (Jakobsson, Rosenberg, 2007) и *Distrupt* 1.1 (Rosenberg, 2004).

Изоляция расстоянием.

Изоляция расстоянием (выраженная в корреляции между попарными генетическими и географическими расстояниями) может служить одним из доказательств наличия потока генов между удаленными популяциями. Тестирование гипотезы производилось в программе *GenAlex* 6.5 (Peakall, Smouse, 2012), уровень статистической значимости корреляции определялся с помощью

10000 пермутаций. Были сформированы две матрицы на основе попарных генетических дистанций Нея Da (Nei et al., 1983) с трансформацией $Da / (1 - Da)$ и попарных географических расстояний, которые измерялись как расстояние вдоль берега между устьями двух рек (места взятия выборок для рек Поронай и Тымь). Генетическая дистанция Нея Da была выбрана, как одна из наиболее устойчивых к влиянию демографических факторов (Takezaki, Nei, 1996). Между Сахалином и Хоккайдо линия проводилась от мыса Крыльон, между Сахалином и материком в южной части Амурского лимана. Для тестирования протяженности дистанций, на которых чаще всего наблюдается значительная корреляция между генетическими и географическими дистанциями, был использован пространственный анализ автокорреляции: *Spatial Autocorrelation Analysis* (Smouse, Peakall, 1999) с интервалом в 50 км и тестированием с помощью 5000 бутстреп-репликаций.

Анализ полиморфизма фрагментов митохондриальной ДНК.

Статистики уровня полиморфизма фрагментов митохондриальной ДНК тайменя были рассчитаны в программе *DNASP 5.10.1* (Rozas et al., 2003) и *GenAlex 6.5* (Peakall, Smouse, 2012). Генеалогическая между гаплотипами сеть была построена с использованием метода *median-joining* (Bandelt et al., 1999) в программе *Network* (Forster et al., 2004), альтернативных связей между гаплотипами обнаружено не было и сеть была визуализирована с помощью программы *Haplotype Viewer* (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>). Для филогенетического анализа модель нуклеотидных замен была определена в программе *jModelTest 2* (Darriba et al., 2012) с использованием байесовского информационного критерия (Posada, Backley, 2004), ею оказалась *HKY* (Nashegawa et al., 1985). Филогенетический анализ последовательностей выполнялся в программе *MrBayes 3* (Ronquist, Huelsenbeck 2003) в ходе 10 миллионов генераций Марковской Цепи Монте-Карло. Конвергенция всех параметров проверялась в программе *Tracer 1.5* (Rambaut, Drummond, 2005), результаты первых двух миллионов итераций были отброшены (*burn-in*). Дополнительно была построена дендрограмма методом ближайшего соседства

(*neighbor-joining*) на основе *p-distance* в программе *MEGA 6* (Tamura et al., 2013) с тестированием топологии с помощью 10000 бутстреп-репликаций.

Анализ дисперсии молекулярного разнообразия (AMOVA).

Одним из способов тестирования популяционно-генетических гипотез об уровнях популяционной иерархии является метод *AMOVA* (анализ дисперсии молекулярного разнообразия) предложенный Лаурентом Экскоффьером в 1992 г. (Excoffier et al., 1992), позволяющий разделять молекулярную вариабельность на несколько компонент: от внутри индивидуальной до межгрупповой популяционной и оценить вклад каждой компоненты в общую генетическую изменчивость вида. Метод также позволяет оценить долю молекулярной изменчивости, приходящейся на каждый уровень внутривидовой иерархии. Анализ проводился в программе *Arlequin 3.5* (Excoffier et al., 2005) с тестированием с помощью 1000 пермутаций.

Генетическое разнообразие и эффективная численность популяций.

Для оценки генетического разнообразия с помощью микросателлитных маркеров ДНК обычно используется две меры – аллельное разнообразие и ожидаемая гетерозиготность. Оценки с использованием малого числа локусов и/или малыми выборками могут дать очень смещенную оценку генетического разнообразия, поэтому требуется интенсивное тестирование и получение надежных доверительных интервалов этих показателей. Анализ усредненного по всем локусам аллельного разнообразия популяций сахалинского тайменя проводился в программе *MSA 4.05* (Dieringer, Schlötterer, 2003), и тестировался с помощью 200 пермутаций на выборке из 5 рыб с помощью метода *rarefaction*. В связи с сильно варьирующим числом особей в выборках и их малым в среднем числом, для оценки ожидаемой гетерозиготности (H_e) была использована ее несмещенная оценка (uH_e ; Nei, 1978)

Эффективная численность популяций является одним из важнейших показателей для планирования природоохранных мероприятий (Soule, 1987). К сожалению, оценка эффективной численности популяций животных, и рыб в особенности - очень нетривиальная задача. Наиболее надежными являются

методы разделенных во времени выборок, когда из одной и той же популяции несколько поколений подряд берутся выборки, и эффективная численность измеряется, исходя из разницы в частотах аллелей (Nei, Tajima, 1981; Waples, 1989). Этот метод почти неприменим к редким видам с малой численностью и длительными поколениями. Альтернативный метод, позволяющий достаточно точно измерять эффективную численность популяций, основан на неравновесии по сцеплению между аллелями различных локусов (Hill, 1981, Waples, 2006; Waples, Do, 2010), при котором большее неравновесие по сцеплению наблюдается в меньших популяциях. Если выборка состоит из особей одного поколения, то скорее оценивается гармоническая средняя между числом производителей предыдущего поколения и эффективной численностью поколения (Waples et al., 2014), в случае же сильно перекрывающихся поколений и выборки из особей разных возрастов, оценка N_e близка к долговременной эффективной численности популяции с определенным занижением (Waples, Do 2010; Waples et al., 2014). Эффективная численность популяций сахалинского тайменя оценивалась в программе *NeEstimator V.2* (Do et al., 2014), с использованием метода неравновесия по сцеплению (Waples, 2006), тестирование и получение доверительных интервалов проводилось с помощью бутстрепа и методики *jackknife*, расчет минимальной частоты используемых аллелей (P_{crit}) : $1/2 S$, где S – размер выборки, как было предложено авторами метода (Waples, Do, 2010).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Отклонения от равновесия Харди-Вайнберга и популяционно-генетическая дифференциация выборок.

Статистически значимого избытка гетерозигот в изученных выборках и популяциях сахалинского тайменя не обнаружено. Для 3 выборок и 4 популяций обнаружен недостаток гетерозигот (Таблица 3.1.1), что может быть вызвано как инбридингом, так и смешением разных субпопуляций в одной выборке (эффект Валунда). Все выборки с недостатком гетерозигот относятся к озерно-лагунным системам с впадающими в них реками и ручьями, где происходит размножение тайменя, что делает эффект Валунда наиболее вероятным объяснением наблюдаемых отклонений.

Таблица 3.1.1. Значимость отклонения от равновесия Харди-Вайнберга для отдельных выборок и водоемов (в случае с множественными выборками) на основе теста на недостаток и избыток гетерозигот в популяции. Красным цветом с астериском обозначены статистически значимые результаты с применением *sequential bonferroni correction*.

Выборки					Водоемы			
	Избыток гетерозигот		Недостаток гетерозигот		Избыток гетерозигот		Недостаток гетерозигот	
Выборка	<i>p</i> -значение	Стандартная ошибка	<i>p</i> -значение	Стандартная ошибка	<i>p</i> -значение	Стандартная ошибка	<i>p</i> -значение	Стандартная ошибка
1	0.9992	0.0001	0.0008	0.0002				
2	0.9053	0.0058	0.0947	0.0058				
3А	0.9456	0.0057	0.0544	0.0057				
3В	0.5433	0.0081	0.4567	0.0081	0.9790	0.0048	0.0122	0.0034
4	0.8344	0.0054	0.1656	0.0054				

Выборки					Водоёмы							
	Избыток гетерозигот		Недостаток гетерозигот		Избыток гетерозигот		Недостаток гетерозигот					
Выборка	<i>p</i> -значение	Стандартная ошибка	<i>p</i> -значение	Стандартная ошибка	<i>p</i> -значение	Стандартная ошибка	<i>p</i> -значение	Стандартная ошибка				
5A	0.6549	0.0094	0.3451	0.0094	0.9829	0.0030	0.0163	0.0032				
5B	0.9594	0.0041	0.0406	0.0041								
6	0.0388	0.0018	0.9612	0.0018								
7	0.6243	0.0091	0.3757	0.0091								
8	0.0215	0.0011	0.9785	0.0011								
9	0.3179	0.0093	0.6821	0.0093								
10	0.9911	0.0007	0.0089	0.0007								
11	1.0000	0.0000	0.0000*	0.0000								
12A	1.0000	0.0000	0.0000*	0.0000					1.0000	0.0000	0.0000*	0.0000
12B	0.4872	0.0080	0.5128	0.0080								
13A	0.5428	0.0104	0.4572	0.0104					0.8995	0.0080	0.1220	0.0122
13B	0.8351	0.0113	0.1649	0.0113								
14	0.1940	0.0022	0.8298	0.0019								
15A	0.9998	0.0000	0.0002	0.0000								
15B	0.2696	0.0034	0.7304	0.0034					1.0000	0.0000	0.0000*	0.0000
16	0.8743	0.0035	0.1257	0.0035								
17	0.0029	0.0001	0.9971	0.0001								
18	0.3576	0.0035	0.6424	0.0035								
19	0.1523	0.0032	0.8477	0.0032								
20	0.6306	0.0101	0.3694	0.0101								
21	0.9820	0.0008	0.0180	0.0008								
22A	1.0000	0.0000	0.0000*	0.0000					0.9999	0.0000	0.0000*	0.0000
22B	0.5551	0.0244	0.4449	0.0244								
22C	0.9024	0.0074	0.0976	0.0074								
23A	0.5671	0.0030	0.4623	0.0029	0.8821	0.0073	0.1194	0.0077				
23B	0.6747	0.0084	0.3253	0.0084								
24A	0.9309	0.0064	0.0691	0.0064	1.0000	0.0000	0.0000*	0.0000				
24B	0.9996	0.0001	0.0004	0.0001								
25	0.6012	0.0102	0.3988	0.0102								
26	0.9850	0.0017	0.0150	0.0017								
27A	0.5499	0.0205	0.4501	0.0205	0.7937	0.0147	0.2232	0.0223				
27B	0.5615	0.0137	0.4385	0.0137								
28A	0.9627	0.0044	0.0373	0.0044	0.8512	0.0130	0.1418	0.0172				
28B	0.1165	0.0078	0.8835	0.0078								
29	0.4905	0.0116	0.5095	0.0116								
30	0.9853	0.0007	0.0147	0.0007								

Выборки сахалинского тайменя демонстрируют высокую степень популяционно-генетической дифференциации. В Приложении 4 приведены результаты бутстреп - теста на гетерогенность для всех пар выборок, а в Таблице 3.1.2 даны средние значения и 95% интервалы параметра θ , перекрывающиеся со значением 0 для выборок из одного водоема. Подавляющее число попарных сравнений (768 из 820) демонстрируют значительную генетическую дифференциацию (θ , аналог Fst) на уровне средних значений (Рисунок 3.1.1) и не перекрываются со значением 0, что является индикатором высокой статистической значимости. Из 52 попарных сравнений, 95% интервал которых перекрывается с нулем, 9 относятся к выборкам из одних и тех же водоемов (Таблица 3.3.1), а остальные демонстрируют крайне низкие средние значения дифференциации (Рисунок 3.1.1). Все выборки из одних и тех же водоемов демонстрируют генетическую гомогенность по результатам теста. Таким образом, большая часть выборок сахалинского тайменя статистически значимо дифференцированы, со средними значениями параметра θ около 12.

Таблица 3.1.2. Средние значения и 95% интервалы параметра θ , для попарных выборок из одних и тех же водоемов

Пары выборок		Мин. 95%	Среднее значение θ	Макс. 95% CI
3A	3B	-0.007099	0.011283	0.033074
5A	5B	-0.018451	-0.006585	0.006460
13A	13B	-0.015396	-0.001223	0.015404
22A	22B	-0.005788	0.004284	0.015825
22A	22C	-0.008634	0.002664	0.014239
22B	22C	-0.012213	-0.000960	0.011774
23A	23B	-0.038151	0.026672	0.119431
28A	28B	-0.013240	0.002641	0.019774

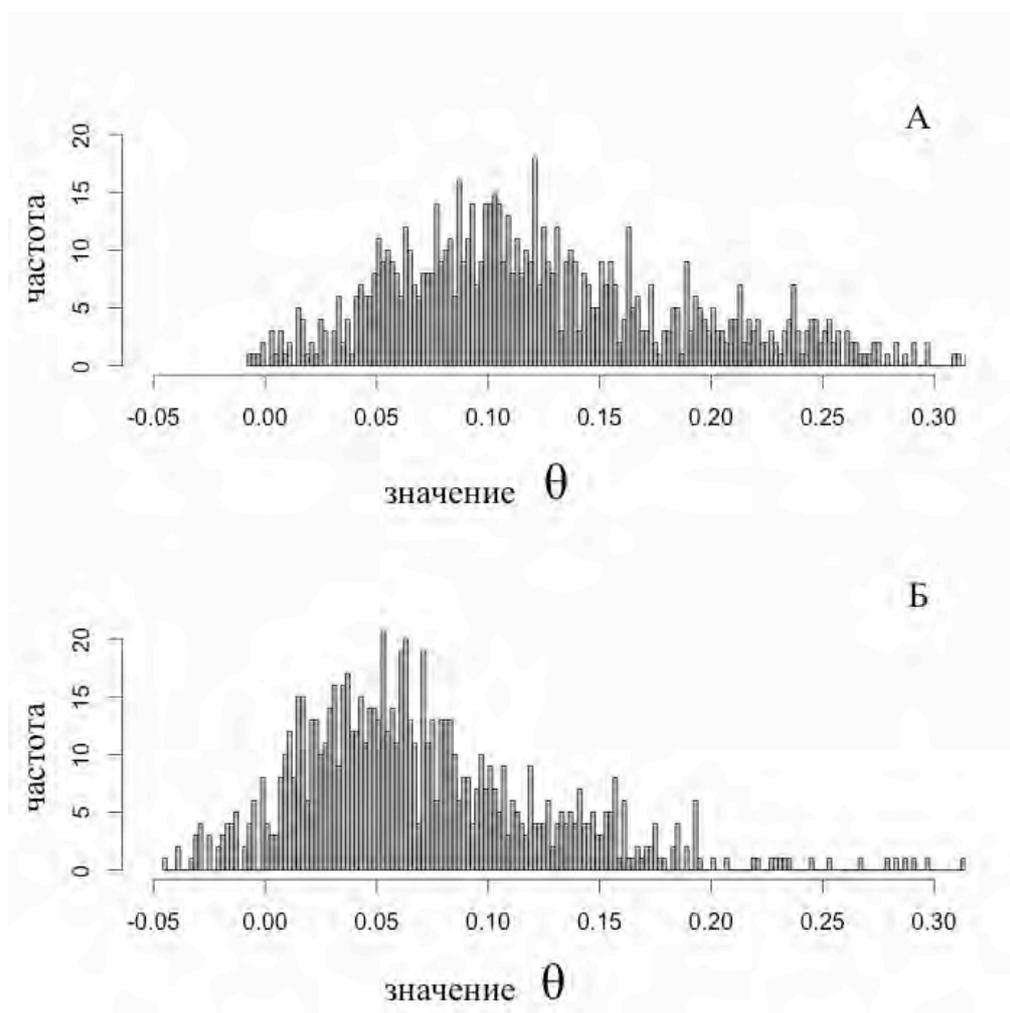


Рисунок 3.1.1 Гистограммы распределений попарных значений θ для всех выборок: А) средние значения по результатам бутстреп-теста Б) минимальные значения по результатам бутстрепа-теста.

3.2. Кластеризация особей на основе попарных индивидуальных расстояний и методом анализа в пространстве главных компонент

Анализ в пространстве главных компонент на основе частот аллелей внутри и между популяциями позволяет одновременно охарактеризовать размах вариабельности, выявить основные аллели, вносящие вклад в дифференциацию групп особей, увидеть основные паттерны популяционно-генетической дифференциации и выявить их связь с экологическими и географическими данными.

По результатам анализа в пространстве главных компонент отчетливо выделяются в отдельные группы особи из бассейна реки Поронай, с юга Хабаровского и Приморского краев, а также с Сахалина вместе с Курильскими островами и островом Хоккайдо (Рисунок 3.2.1).

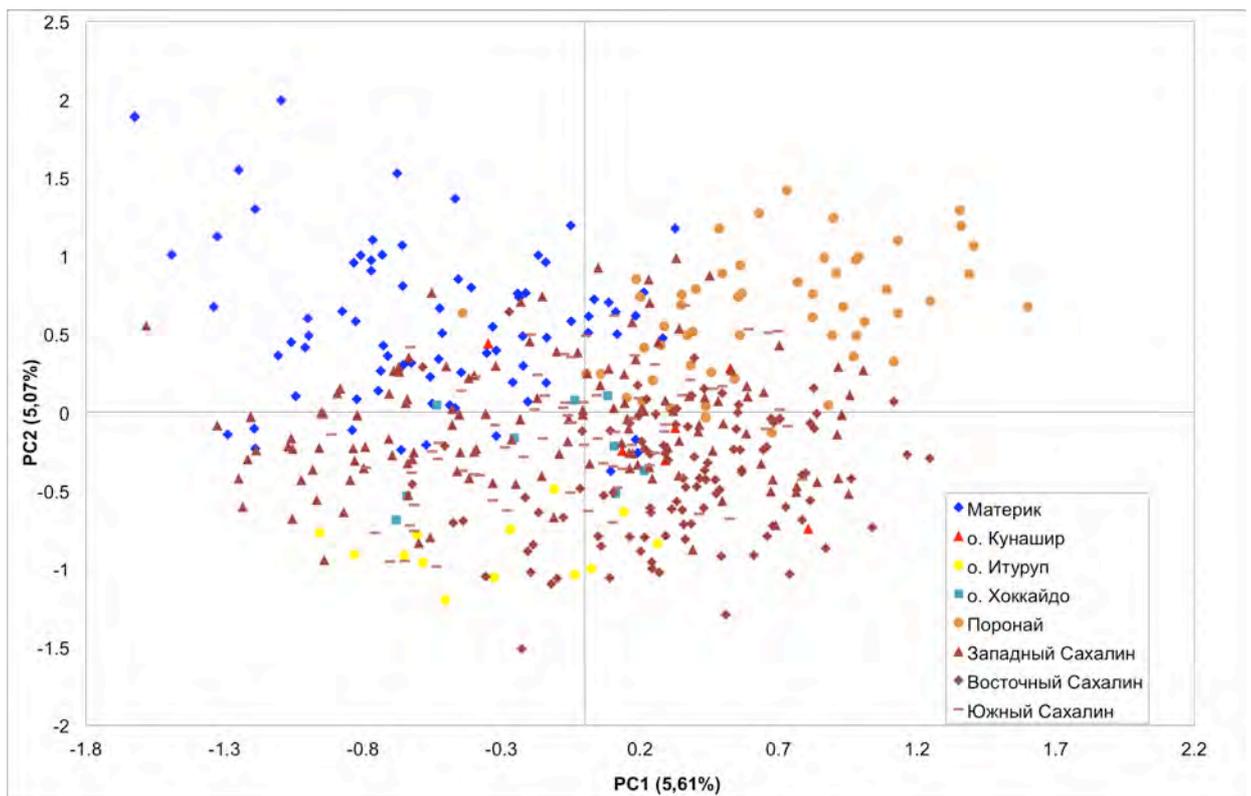


Рисунок 3.2.1. Анализ в пространстве главных компонент для всех особей сахалинского тайменя в выборках. Коричневым цветом обозначен Сахалин, оранжевым – бассейн р. Поронай (Сахалин), синим – особи с материковой части ареала сахалинского тайменя.

Известно, что анализ в пространстве главных компонент позволяет четко выделять наиболее яркие паттерны пространственно-временной дифференциации популяций, нивелируя различия на низших иерархических уровнях. Результаты анализа в пространстве главных компонент для отдельной группы особей с Сахалина, Курильских островов и Хоккайдо демонстрируют дальнейшее разделение географических групп (Рисунок 3.2.2). Четко выделяются из общей группы особи рыбы из рек северо-западного Сахалина и, вновь, бассейна реки

Поронай. Мультилокусные генотипы особей тайменя отдельно с материковой части ареала также образуют географически скоррелированную пространственную структуру (Рисунок 3.2.3). Примечательна ориентация групп особей вдоль 1 главной компоненты, повторяя расположение выборок на физической карте региона с юга на север.

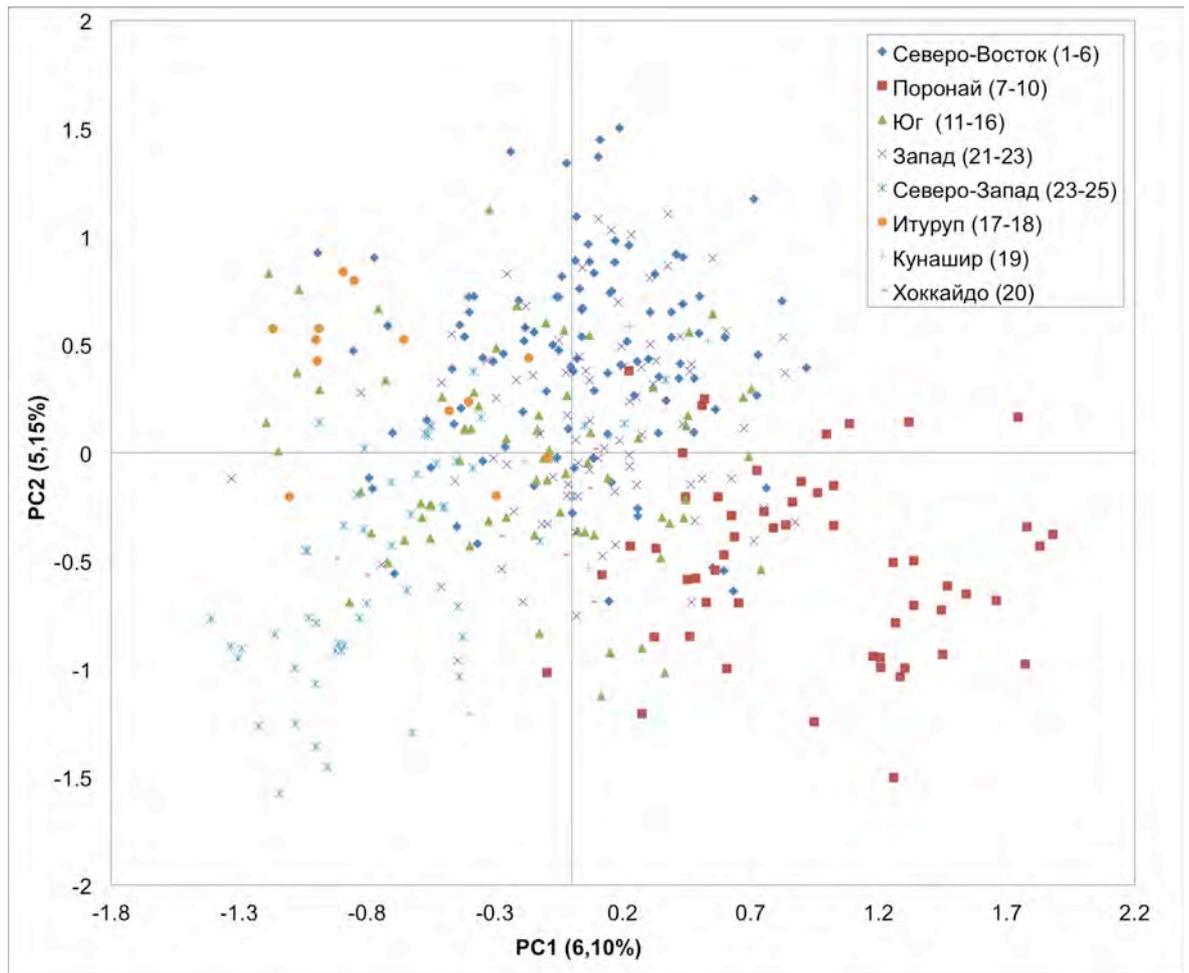


Рисунок 3.2.2 Результаты анализа в пространстве главных компонент для выборок Сахалина, Итурупа, Кунашира и Хоккайдо. Группы особей подразделены согласно географической близости, номера водоемов, указанные рядом с обозначениями из рисунка 3.1.1.

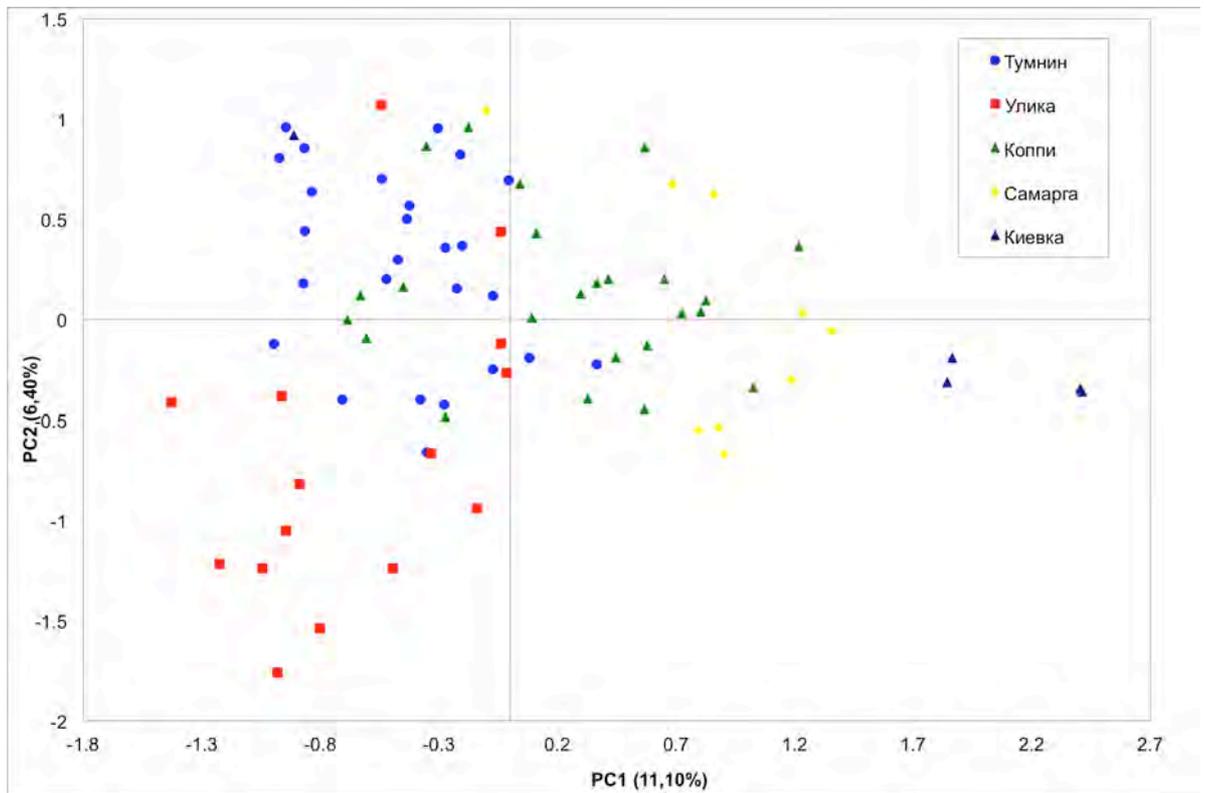


Рисунок 3.2.3. Расположение в пространстве главных компонент выборок с материкового побережья Японского моря. Выборки группируются в соответствии с географическим расположением на карте (Рисунок 3.1.1).

Сходная с уже озвученными результатами картина наблюдается при кластеризации мультилокусных генотипов особей методом ближайшего соседства на основе матрицы расстояний *Dps* (Рисунок 3.2.4). Выборки с материковой части, бассейна реки Поронай, Восточного Сахалина, Южного Сахалина, острова Хоккайдо, Кунашира и двух водоемов Итурупа формируют хорошо различимые кластеры индивидов. В то же время, следует отметить, что выборки с Западного Сахалина не образуют единого кластера, кроме того, немало особей отнесены к «неродным» группам водоемов.

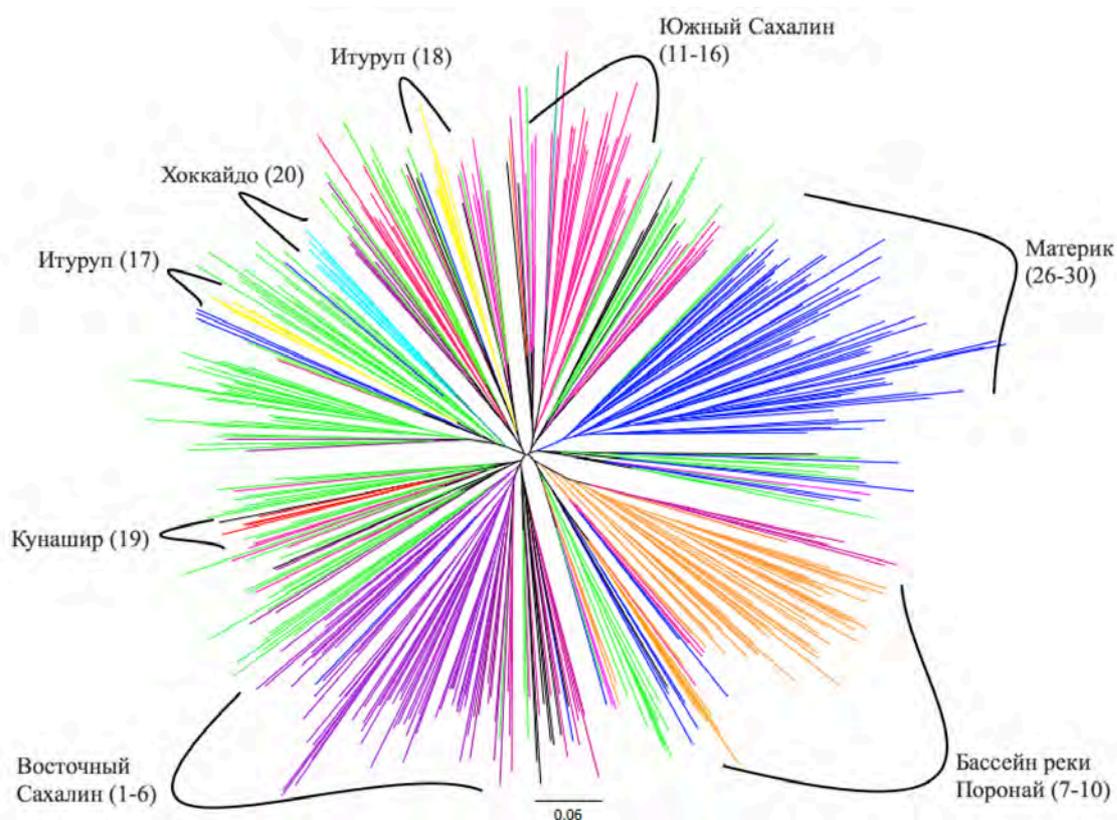
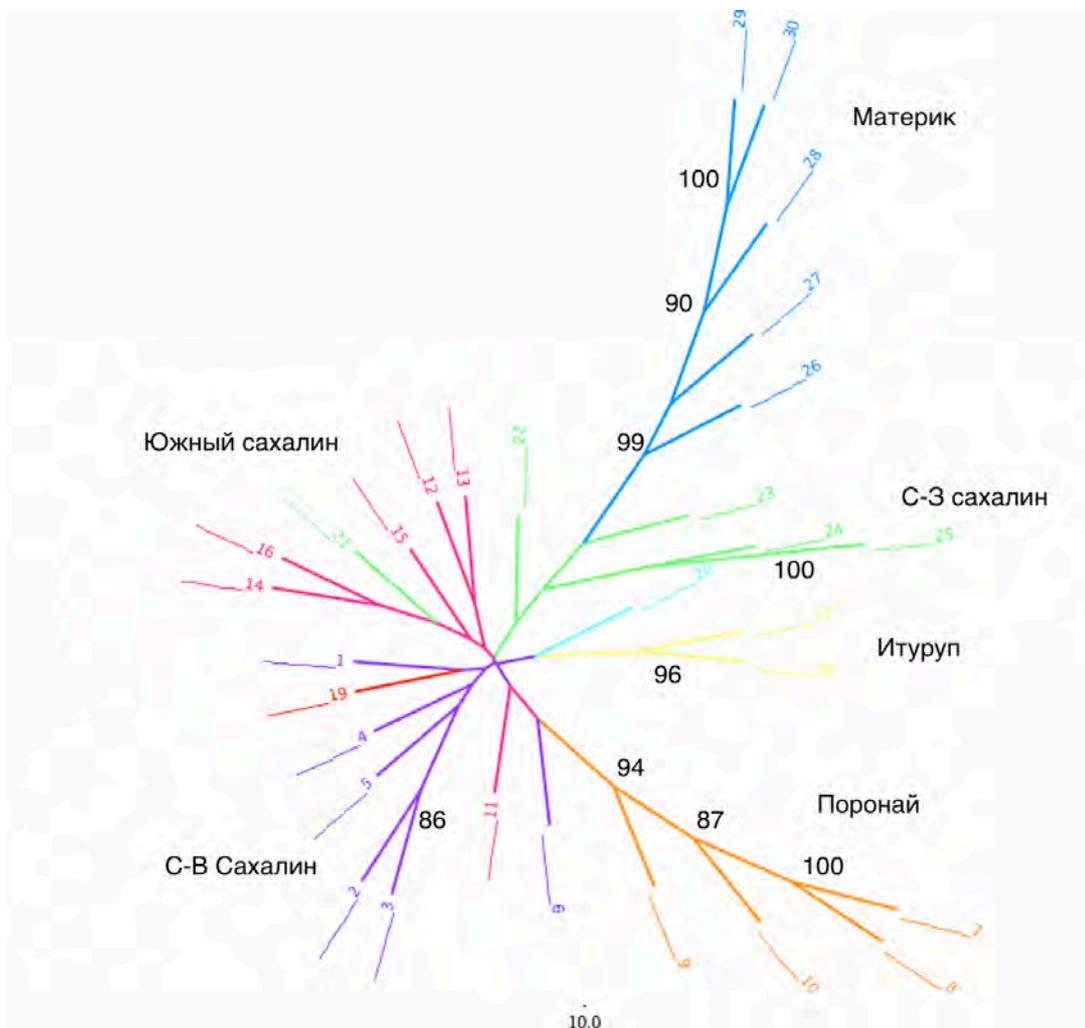


Рисунок 3.2.4. Неукоренённое дерево, построенное методом ближайшего соседства (*Neighbour Joining*) на основе матрицы расстояний D_{ps} (пропорция одинаковых аллелей) между мультилокусными генотипами особей сахалинского тайменя. Цифры в скобках – номера водоемов (Рисунок 3.1.1). Подписаны наиболее плотные группы. Зеленый цвет - выборки с западного Сахалина (водоемы №21-25).

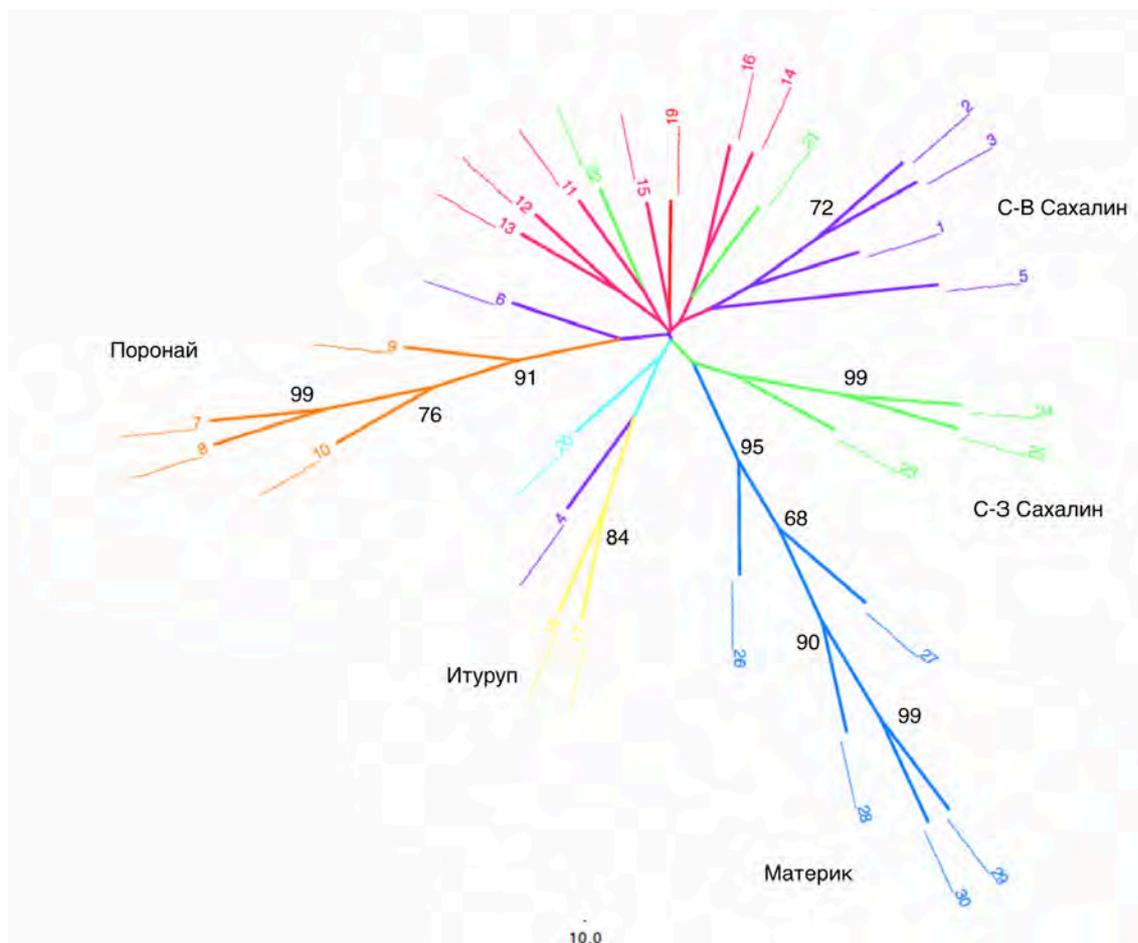
3.3. Кластеризация выборок в пространстве главных компонент и на основе попарных генетических расстояний

По результатам популяционно-генетического анализа на основе дистанций между популяционными выборками формируются отдельные группы на дереве расстояний с достаточно высокими значениями бутстреп-поддержки для материковой клады, бассейна реки Поронай, острова Итуруп (Рисунок 3.3.1). Популяции юга Сахалина, Северо-Востока, Северо-Запада формируют также отдельные клады, но с меньшей поддержкой, что, вероятно, вызвано не столь

высокой дифференциацией от других групп либо большим внутригрупповым разнообразием. Обращает на себя внимание та же схема групповой дифференциации, что и при применении анализа на основе генетических расстояний между особями: наибольшую статистическую поддержку и уникальность демонстрируют группы популяций бассейна реки Поронай, материкового побережья, а также удаленные популяции острова Итуруп. Материковые популяции формируют клинальное построение с северными популяциями ближе к корню дерева и южными ближе к листьям.



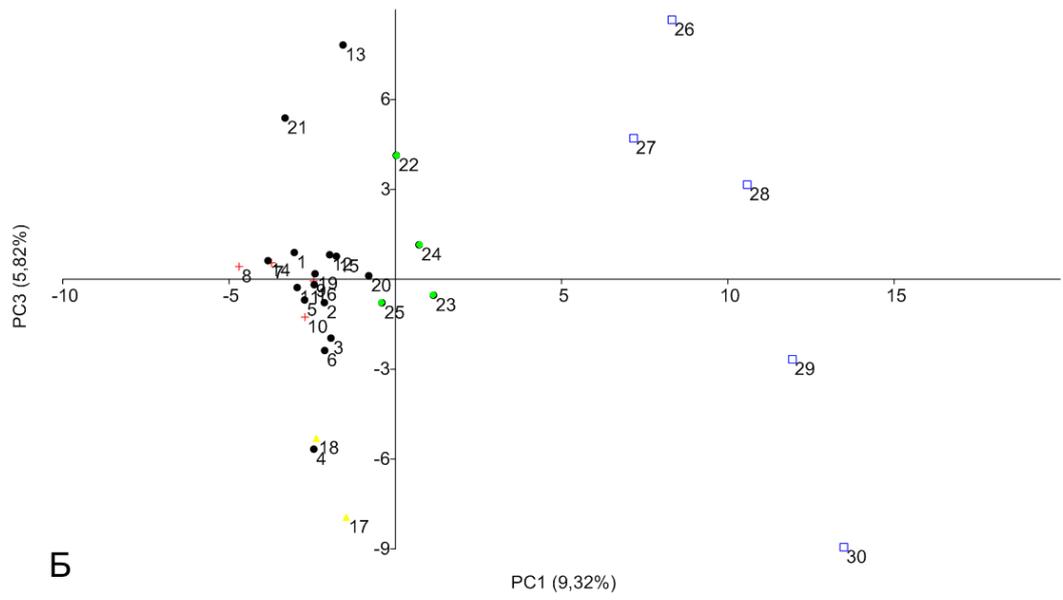
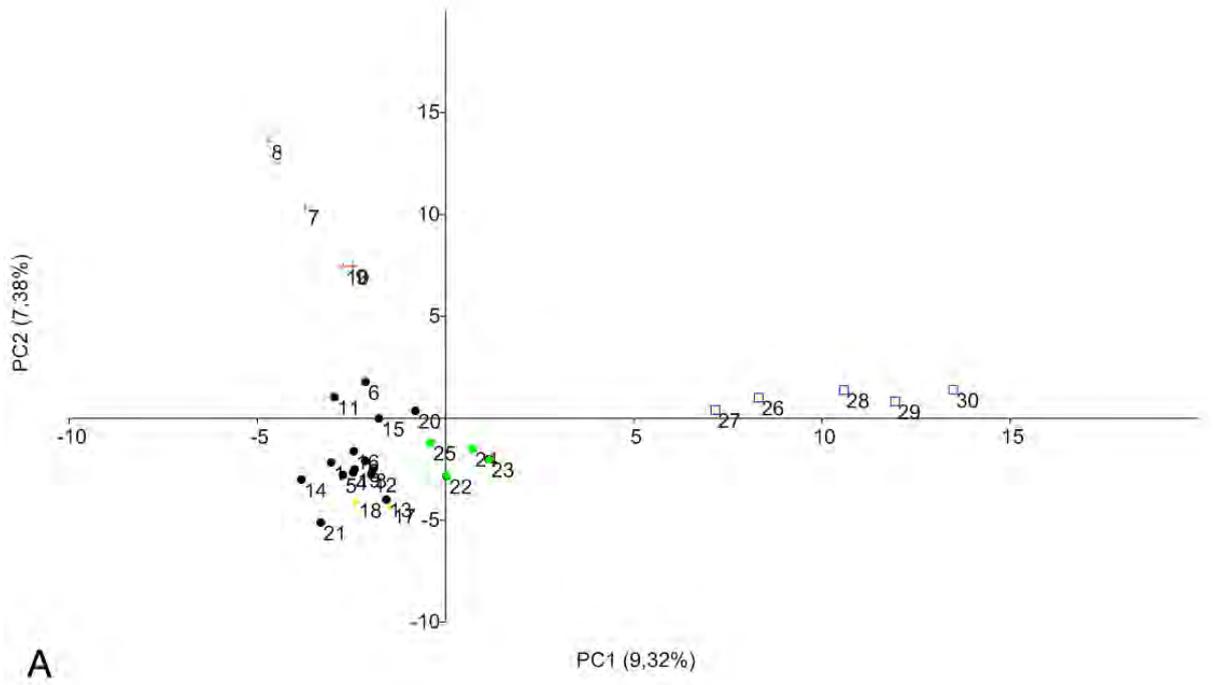
А



Б

Рисунок 3.3.1. Популяционные дендрограммы, реконструированные методом ближайшего соседства для популяций сахалинского тайменя на основе расстояния Da (А) и Dps (В). Указаны номера водоемов, в узлах ветвления – процент бутстреп-репликаций поддерживающих данную топологию (показано для более чем 60%).

По результатам анализа популяционных выборок в пространстве главных компонент, вновь обособляются группы популяций бассейна реки Поронай, острова Итуруп, материковой части ареала (Рисунок 3.3.2). Остальные популяции группируются вместе, что является скорее издержкой особенностей анализа в пространстве главных компонент: максимизацией различий вдоль лишь двух осей трудно продемонстрировать иерархическую систему популяционной дифференциации, а сильно дивергированные группы популяций забирают на себя большую часть вариабельности, объясняемой в рамках первых трех компонент.



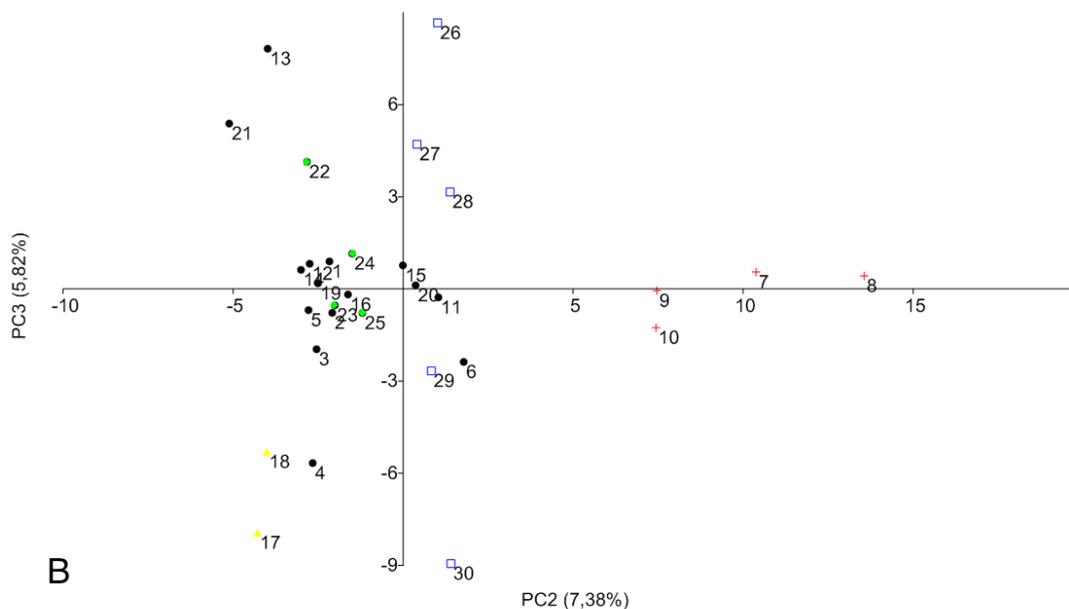


Рисунок 3.3.2. Кластеризация популяционных выборок в пространстве главных компонент. Синий цвет - материковые популяции, красный цвет – бассейн р. Поронай, желтый – о. Итуруп. А: PC1-2, Б: PC1-3, В: PC2-3.

Таким образом, по результатам анализа в пространстве главных компонент, а также на основе генетических расстояний *Dps* и *Da*, можно заключить, что группы популяций сахалинского тайменя материкового побережья, бассейна реки Поронай, северо-востока Сахалина, северо-запада Сахалина и острова Итуруп демонстрируют сходство в частотах общих аллелей внутри групп. Группируемость демонстрируется не только на уровне популяций, но и на уровне отдельных особей. Наибольшую дивергенцию от общего генетического пула популяций сахалинского тайменя проявляют популяции бассейна реки Поронай, материковой части ареала и острова Итуруп. К сожалению, трудно сказать уверенно о популяциях острова Хоккайдо и острова Кунашир - из этих мест имеется лишь по одной выборке, которые тяготеют скорее к гетерогенной группе южного Сахалина, что вполне вероятно, учитывая их географическую близость.

3.4. Выявление иерархической популяционной структуры с использованием алгоритма программы *STRUCTURE*

Средние значения логарифма функции правдоподобия при оптимизации модели в программе *STRUCTURE* демонстрировали быстрый рост до достижения значения $K=6$, затем рост замедлялся, а стандартные отклонения каждой из 10 репликаций с одним и тем же значением числа предковых популяций (K) начинали возрастать (Рисунок 3.4.1). Из этого можно заключить, что наиболее вероятное число возможных популяций высшей иерархии находится в районе 5-11.

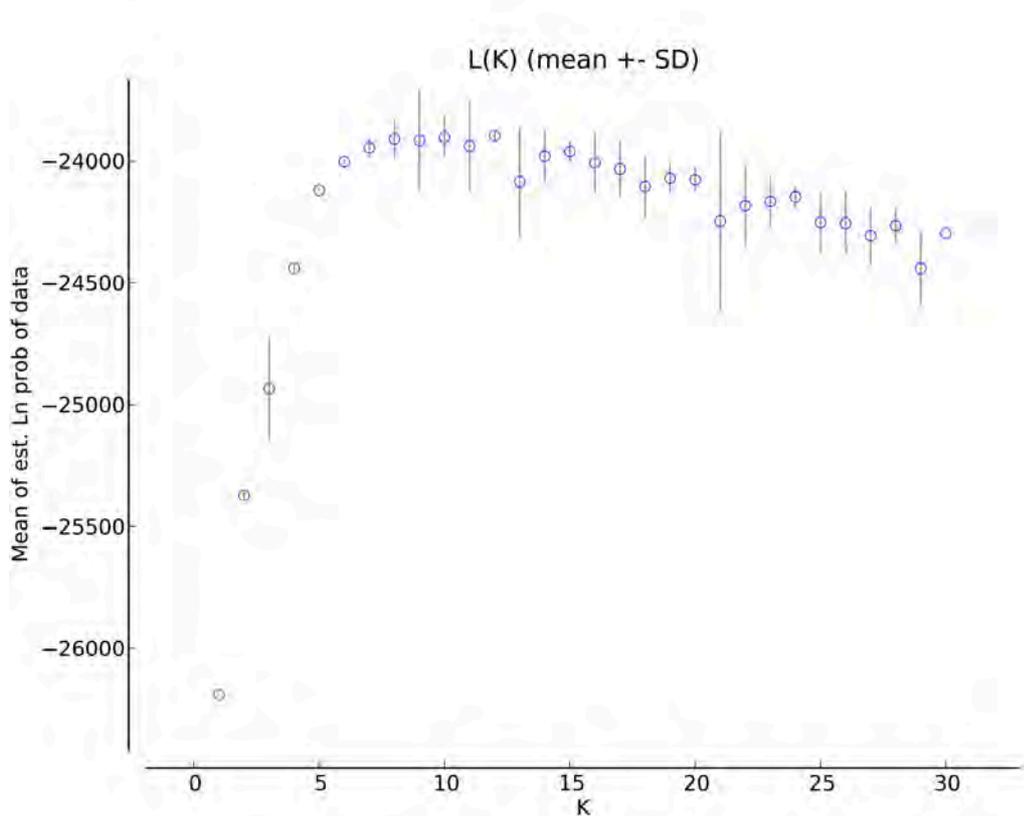


Рисунок 3.4.1. Значения функции правдоподобия для 30 значений K . Показаны стандартные отклонения на основе 10 репликаций для каждого K .

При одновременном учете разности значений логарифма функции правдоподобия модели для каждого предыдущего и последующего шага и стандартного отклонения функции правдоподобия для 10 репликаций (статистика

delta-K, по Evanno et al., 2005), наибольшую (и очень значительную) поддержку получает число возможных популяций $K=5$ (Рисунок 3.4.2).

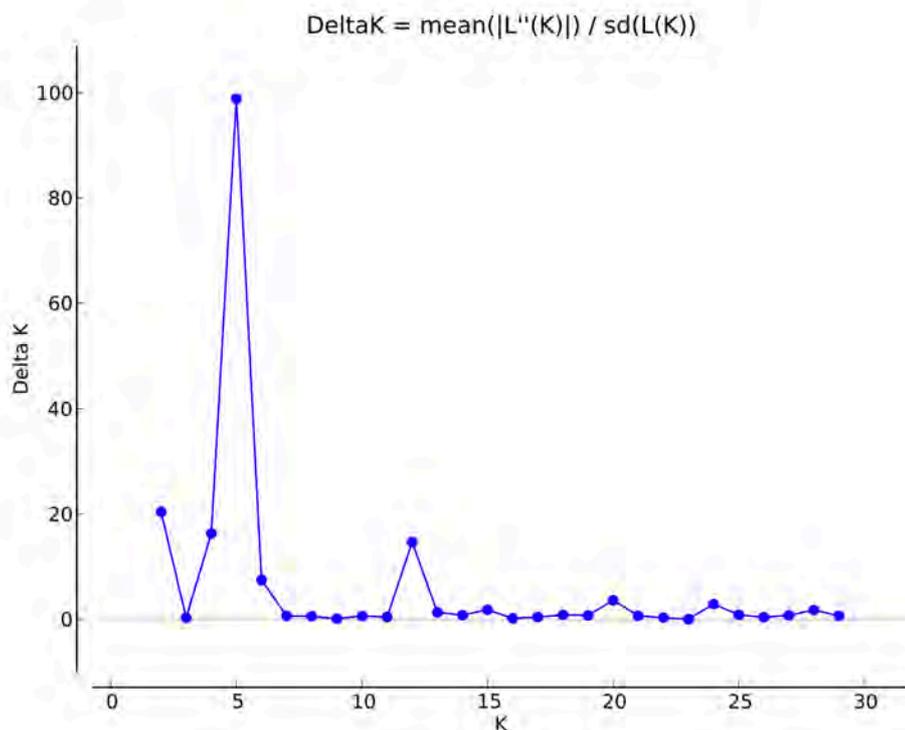


Рисунок 3.4.2. График изменения статистики delta-K для для функции правдоподобия.

Число выявленных популяционных кластеров, к которым относится большинство особей постепенно увеличивается от $K=2$ до $K=12$. Начиная с $K=12$ добавочные кластеры поглощают крайне незначительную долю генетической изменчивости, а большинство особей по прежнему относится к 12 популяционным кластерам (Рисунок 3.4.3). При простейшей модели ($K=2$) группы популяций подразделяются на две основных части: сахалинские (северо-восток и юг острова), курильские, японские с одной стороны и материковые, северо-запада Сахалина, а также бассейна реки Поронай с другой. Примечательно, что сахалинская группа популяций реки Поронай кластеризуется совместно с материковыми популяциями. С усложнением модели (увеличением числа вероятных популяций, K) бассейн реки Поронай выделяется в отдельную независимую группу (начиная с $K=2$), а вскоре обособляется и северо-западный

Сахалин (с $K=5$), озеро Вавайское (с $K=6$), курильские популяции (с $K=7$) и полностью изолированное после возведения плотины озеро Тайное (с $K=12$).

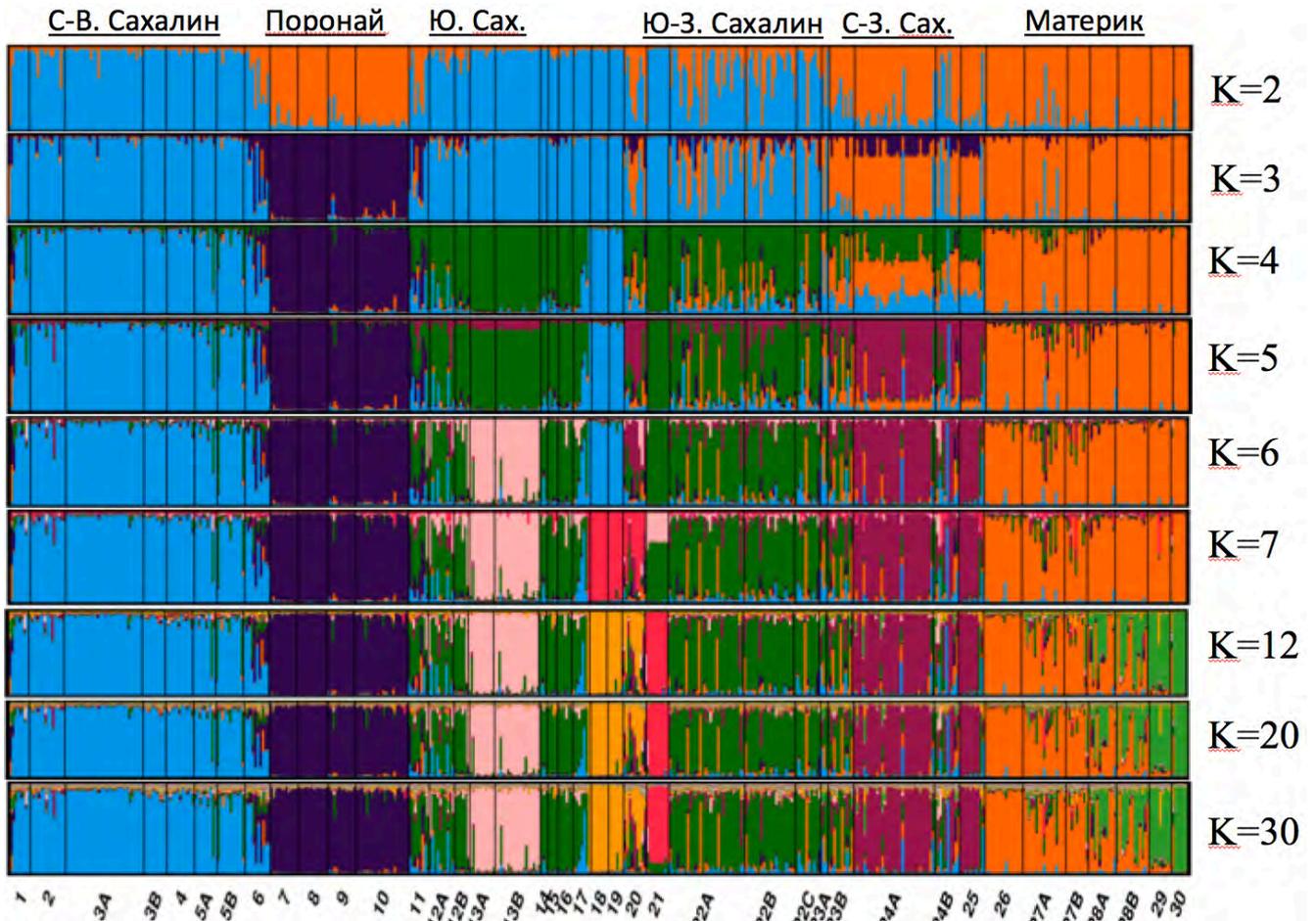


Рисунок 3.4.3. Апостериорные вероятности принадлежности особей сахалинского тайменя к выявленным популяционным кластерам для различного числа возможных популяций (K). Номера выборок указаны в соответствии с обозначениями на Рисунке 2.1.1. В большем масштабе в Приложении 3.

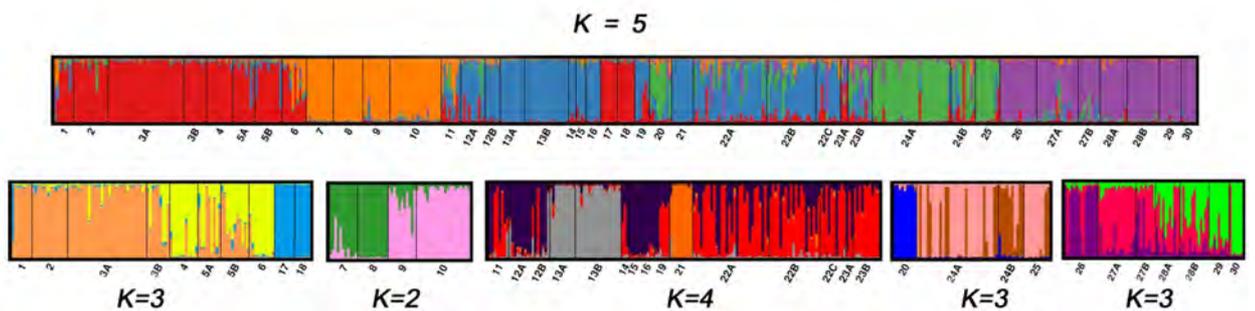


Рисунок 3.4.4. Апостериорные вероятности принадлежности каждой отдельной особи к выявленным популяционным кластерам. Номера выборок указаны в соответствии с обозначениями на Рисунке 2.1.1, приведено наиболее вероятное число выявленных субпопуляций для каждого набора данных.

При использовании иерархического подхода к алгоритму программы *STRUCTURE* (определение оптимального числа популяций по методу Evanno et al, 2005, а затем повторение анализа для каждого кластера в отдельности) высшая популяционная иерархия (Рисунок 3.4.4, верхний график), в значительной степени совпадает с выявленной другими методами – кластеризацией на основе меры *Dps* и анализом главных компонент. Вновь обособляются популяции северо-восточного Сахалина, бассейна реки Поронай, материковой части ареала и северо-западного Сахалина. В первом раунде анализа, популяции острова Итуруп не выделяются в отдельный кластер и группируются вместе с выборками с северо-восточного Сахалина, в то время как достаточно четко обособляется кластер популяций, протянувшийся от озера Невского (№11) у впадения реки Поронай до реки Агнево (№23) на западном побережье Сахалина (Рисунок 3.4.4, синий цвет).

Во втором раунде, при анализе каждого из 5 кластеров в отдельности, выявляется низкоуровневая популяционная структура. Первый кластер разделяется на три основные группы, соответствующие рекам севернее Тыми (№1, 2, 3), от Тыми до реки Лангери (№4, 5, 6) и четко обособленный кластер двух рек острова Итуруп (№17 и 18), поронайские выборки подразделяются на 2 кластера – верхнее и среднее течение реки Поронай. В самом протяженном кластере – южной части Сахалина: четко обособляются выборки с озера Вавайского, водоема (по сути своей - водная система, включающая в себя Чибисанские озера и малое и большое озера Буссе) с достаточно большой степенью изоляции от моря. Полностью изолированное озеро Тайное демонстрирует свою генетическую уникальность. Материковые выборки имеют достаточно смешанный состав с более определенными коэффициентами

принадлежности по краям кластера, что может говорить об интенсивных (вероятно, прошлых) миграциях между соседними популяциями, но, к сожалению, этот интересный вопрос трудно изучить детально на малых выборках.

3.5. Изоляция расстоянием

Тест Мэнтеля на эффект изоляции расстоянием демонстрирует достаточно высокую ($R^2=0,26$) и статистически значимую ($p=0,01$) корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций сахалинского тайменя (Рисунок 3.5.1). Эта зависимость наблюдается как для всех популяций вида вместе, так и для отдельных районов (популяции Татарского пролива, северо-восточного Сахалина).

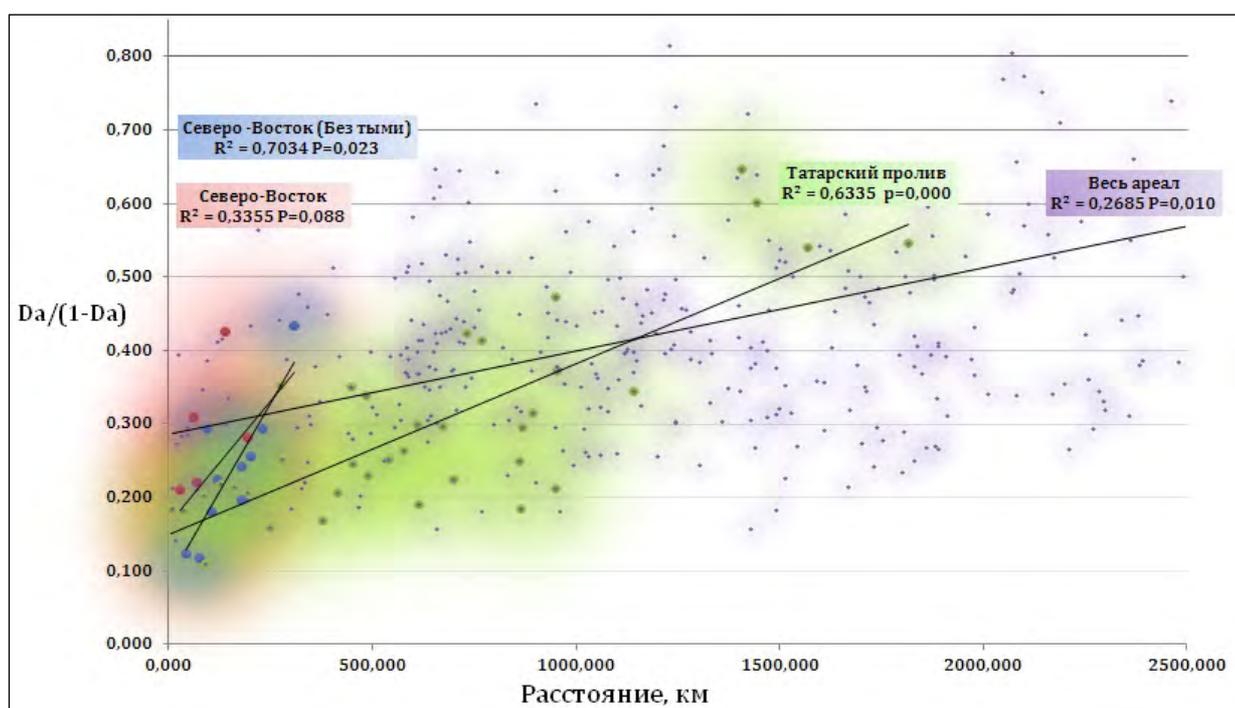


Рисунок 3.5.1. Результаты теста Мантеля на эффект изоляции расстоянием между популяциями сахалинского тайменя для всех выборок сразу, а также подвыборок для отдельных географических районов. Показаны уровни статистической значимости.

По результатам автокорреляционного анализа наиболее достоверная корреляция между генетическими и географическими расстояниями обнаруживается на дистанции до 200 км, то есть между соседними популяциями (Рисунок 3.5.2). Этот результат говорит в пользу гипотезы о том, что именно миграции, а не филогеографические процессы сформировали наблюдаемые паттерны изоляции расстоянием (Рисунок 3.5.1), потому что в противном случае ожидается устойчивая корреляция лишь на дальних расстояниях (как между отдельными островами, так и между островами и материком).

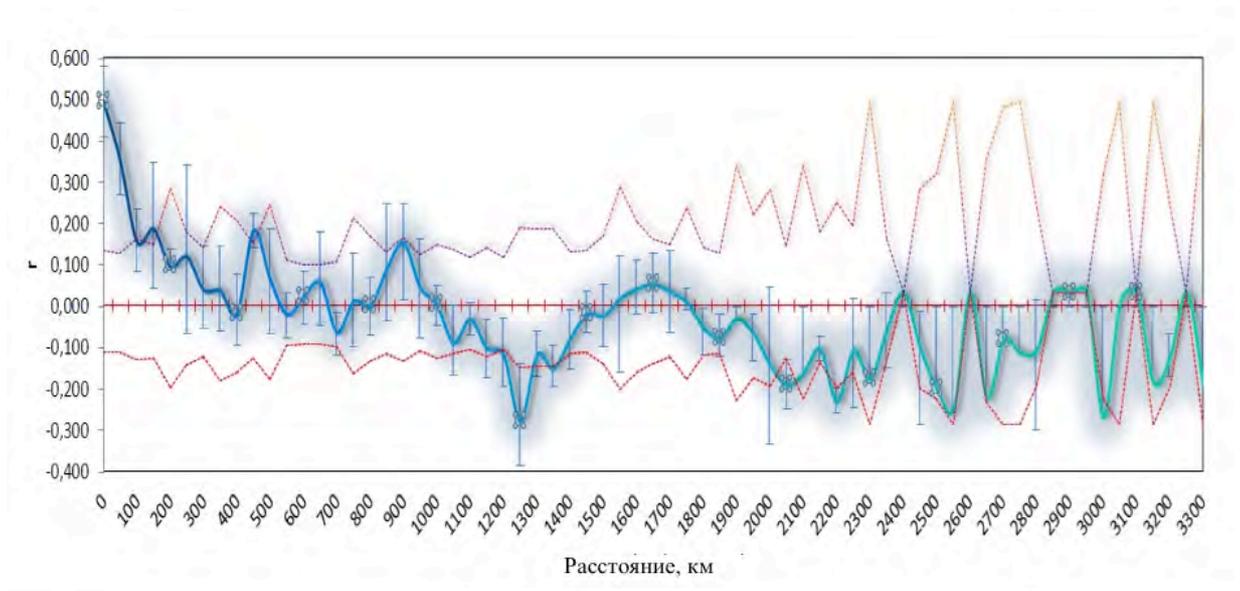


Рисунок 3.5.2. Результаты пространственного автокорреляционного анализа. Синяя линия – уровень корреляции между генетическими и географическими дистанциями. Показаны доверительные интервалы на основе 5000 бутстреп-репликаций.

3.6. Микросателлитное генетическое разнообразие и оценка эффективной численности популяций сахалинского тайменя

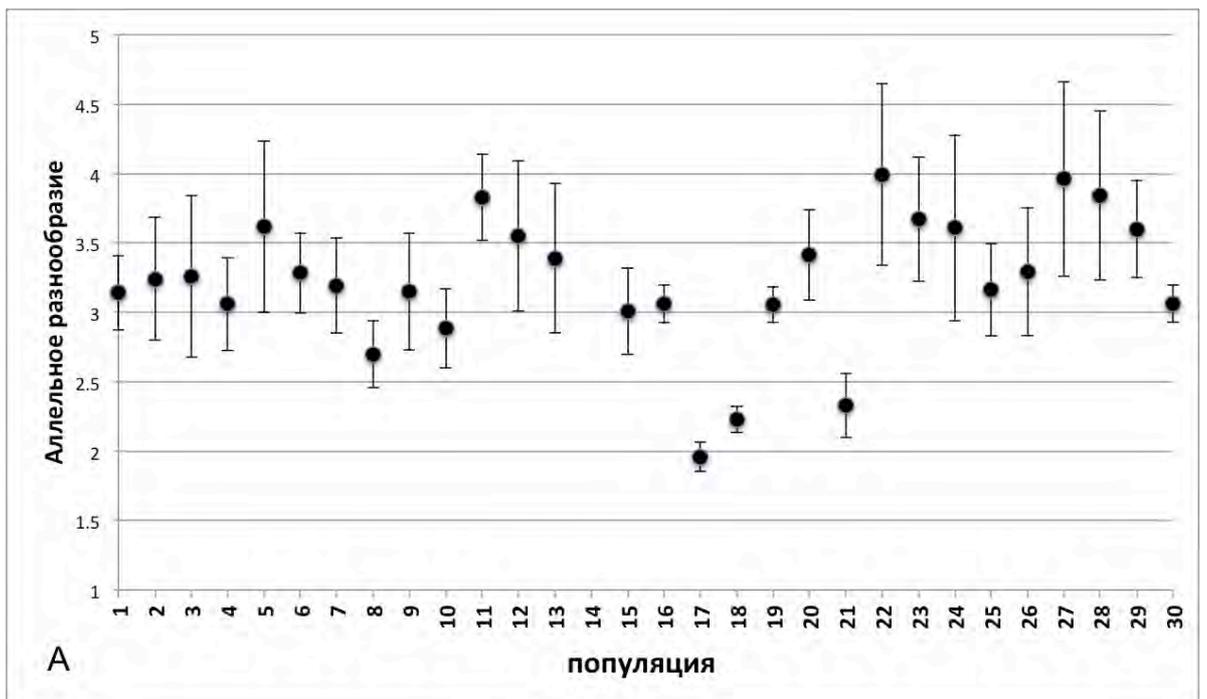
Усредненные по всем локусам значения ожидаемой гетерозиготности для изученных популяций на ареале сахалинского тайменя варьируют в пределах от 0,306 до 0,601 при среднем значении 0,514 (Таблица 3.6.1, Рисунок 3.6.1, Б, Приложение 2). Наиболее низкие значения средней ожидаемой гетерозиготности наблюдаются у выборок острова Итуруп (№ 17-18) и о. Тайного (№21).

Наибольшее среднее аллельное разнообразие (Таблица 3.6.1, Рисунок 3.6.1, А) демонстрируют популяции юга Хабаровского Края, населяющие крупные реки, впадающие в Татарский пролив – Тумнин и Коппи (№27,28), а также популяция озера Айнского (№22). Обедненным средним аллельным разнообразием обладают популяции острова Итуруп (№17,18), а также озера Тайного (№21), представляющего собой водохранилище, образованное на небольшой реке в 1960-х годах. Уровень аллельного разнообразия остальных популяций также варьирует, но остается сравнимым между собой.

Таблица 3.6.1 Основные популяционно-генетические статистики популяций сахалинского тайменя по микросателлитным данным.

Популяция	N среднее число аллелей	Ст.ошибка	Но (наблюдаемая гетерозиготность)	Ст.ошибка	Не (ожидаемая гетерозиготность)	Ст.ошибка	иНе несмещенная оценка гетерозиготности	Ст.ошибка	F индекс (фиксации)	Ст.ошибка	Среднее аллельное разнообразие	Ст. Ошибка
1	7,737	0,104	0,419	0,065	0,44	0,066	0,471	0,071	0,017	0,062	3,142	0,267
2	13,947	0,053	0,489	0,068	0,496	0,065	0,514	0,067	0,011	0,048	3,242	0,441
3	39,053	0,259	0,508	0,064	0,493	0,063	0,499	0,064	-0,038	0,025	3,260	0,582
4	10,737	0,214	0,497	0,071	0,482	0,061	0,506	0,064	-0,032	0,056	3,059	0,332
5	19,737	0,168	0,547	0,056	0,545	0,057	0,559	0,059	-0,02	0,034	3,617	0,617
6	9,947	0,053	0,624	0,057	0,544	0,048	0,572	0,051	-0,15	0,06	3,283	0,287
7	10,684	0,11	0,516	0,059	0,506	0,054	0,531	0,057	-0,028	0,051	3,194	0,344

8	12	0	0,478	0,085	0,42	0,073	0,439	0,076	-0,145	0,048	2,698	0,242
9	20,947	0,053	0,548	0,058	0,527	0,054	0,54	0,055	-0,047	0,033	3,149	0,421
10	10,737	0,168	0,43	0,048	0,466	0,051	0,489	0,054	0,048	0,059	2,885	0,287
11	7,737	0,168	0,472	0,053	0,557	0,057	0,597	0,062	0,131	0,045	3,831	0,311
12	15,684	0,134	0,462	0,063	0,519	0,069	0,536	0,071	0,094	0,062	3,550	0,540
13	27,526	0,14	0,542	0,063	0,54	0,062	0,55	0,063	-0,015	0,042	3,391	0,538
14	3	0	0,509	0,082	0,404	0,062	0,484	0,074	-0,259	0,056	0,000	0,000
15	10,211	0,387	0,405	0,063	0,469	0,062	0,497	0,066	0,103	0,077	3,010	0,312
16	6	0	0,509	0,06	0,493	0,054	0,538	0,059	-0,044	0,053	3,062	0,135
17	6,947	0,053	0,372	0,07	0,284	0,049	0,306	0,053	-0,255	0,052	1,959	0,104
18	6,947	0,053	0,388	0,074	0,355	0,06	0,383	0,064	-0,105	0,087	2,229	0,093
19	5,947	0,053	0,567	0,07	0,481	0,057	0,525	0,062	-0,186	0,053	3,056	0,127
20	8,895	0,072	0,556	0,074	0,506	0,064	0,537	0,068	-0,106	0,058	3,415	0,328
21	9	0	0,316	0,067	0,319	0,06	0,338	0,064	0,012	0,063	2,328	0,231
22	58,895	0,285	0,572	0,06	0,589	0,063	0,594	0,064	0,019	0,016	3,992	0,653
23	12,316	0,203	0,577	0,068	0,563	0,061	0,587	0,064	-0,026	0,06	3,672	0,450
24	41	0,433	0,508	0,061	0,549	0,063	0,555	0,064	0,111	0,054	3,609	0,670
25	10	0	0,479	0,073	0,463	0,068	0,487	0,071	-0,034	0,029	3,162	0,333
26	14,737	0,129	0,518	0,059	0,527	0,058	0,545	0,06	0,012	0,043	3,294	0,461
27	25,842	0,086	0,58	0,064	0,584	0,06	0,595	0,061	0,02	0,027	3,962	0,701
28	23,684	0,172	0,602	0,061	0,588	0,059	0,601	0,06	-0,026	0,023	3,842	0,609
29	8,895	0,072	0,596	0,07	0,547	0,058	0,58	0,061	-0,08	0,06	3,599	0,348
30	5,947	0,053	0,391	0,073	0,423	0,059	0,462	0,065	0,111	0,081	3,063	0,133



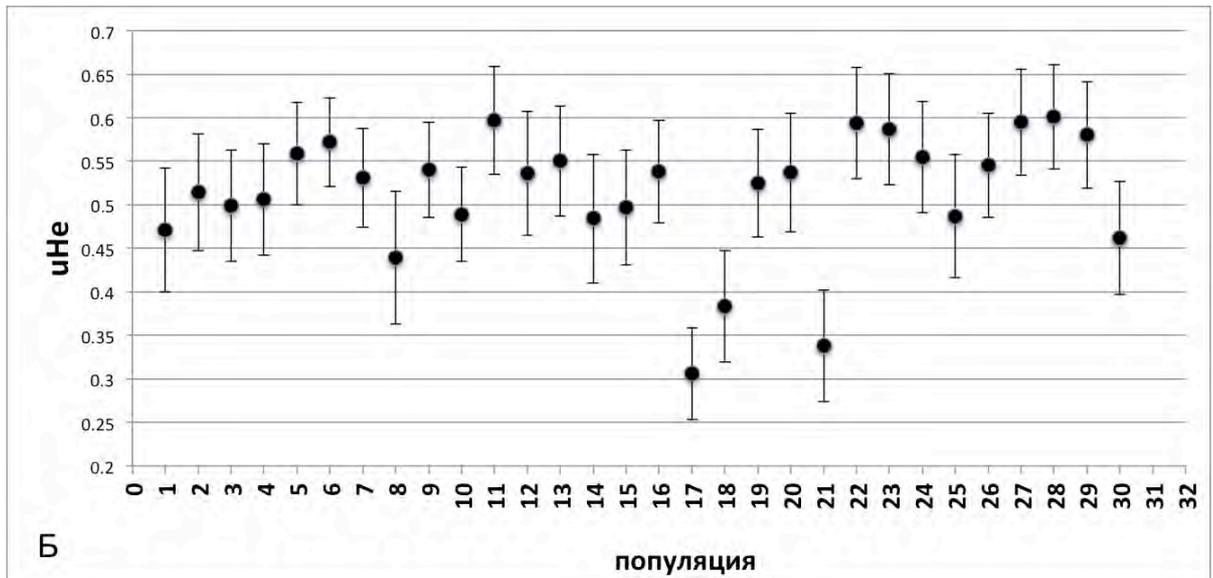


Рисунок 3.6.1. А) Среднее аллельное разнообразие \pm дисперсия. Б) Несмещенная оценка ожидаемой гетерозиготности \pm стандартная ошибка.

Оценки эффективной численности популяции (N_e), полученные методом неравновесия по сцеплению могут, быть достаточно сильно смещены из-за широкого ряда факторов, включая перекрывающиеся поколения (оценка смещается вниз), миграции между популяциями (возможно завышение оценки), возрастной состав выборки (занижение сильнее при более гомогенном составе), поэтому в данной работе основные результаты базируются на минимальных оценках эффективной численности, наиболее важной также при преосторожном подходе, широко распространенном в теории и практике природоохранной биологии. Для большинства исследованных популяций, эффективная численность не превышает 50 особей (Таблица 3.6.1, Рисунок 3.6.2). Лишь для пяти популяций из крупных водоемов Сахалина (реки Даги, Вал, озеро Айнское) и Хабаровского Края (реки Тумнин и Коппи) минимальная эффективная численность колеблется на уровне 78-230 особей, что также является небольшими показателями, учитывая масштабы и уникальность этих водоемов на ареале вида.

Таблица 3.6.2. Оценка эффективной численности популяций сахалинского тайменя методом неравновесия по сцеплению.

Популяция	Размер выборки	P_{crit}	r^2	$Exp(r^2)$	Средняя оценка N_e	Минимальная оценка N_e (бутстреп)	Максимальная оценка N_e (бутстреп)	Минимальная оценка N_e (jackknife)	Максимальная оценка N_e (jackknife)
1	8	0,07	0,205	0,210	н.д.	18,8	н.д.	31,4	н.д.
2	14	0,03	0,095	0,089	50,1	23,6	913,6	26,9	203
3	40	0,01	0,030	0,028	183,2	105	585,6	78,5	н.д.
4	11	0,05	0,152	0,127	10,4	5,4	23	4,9	26,5
5	20	0,02	0,059	0,059	н.д.	117,6	н.д.	100,6	н.д.
6	10	0,05	0,147	0,138	30,2	12,7	н.д.	16,5	101,7
7	11	0,05	0,138	0,132	49,9	15,9	н.д.	20,3	н.д.
8	12	0,05	0,167	0,108	2,6	2	4,7	2	3,9
9	21	0,02	0,068	0,056	23,1	16,6	35,1	17,1	33,4
10	11	0,05	0,159	0,140	14,7	6,5	70,6	7,1	51,7
11	8	0,05	0,200	0,205	н.д.	32,4	н.д.	60,9	н.д.
12	16	0,05	0,083	0,081	139,3	36,5	н.д.	39,5	н.д.
13	28	0,02	0,054	0,042	24	18,8	31,9	18,7	32
14	3	0,05	0,679	0,797	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
15	11	0,05	0,179	0,155	10,7	4,9	30,9	5,3	26,5
16	6	0,08	0,276	0,276	н.д.	8,9	н.д.	18,5	н.д.
17	7	0,08	0,305	0,228	2	0,9	26,7	0,9	20,3
18	7	0,08	0,229	0,233	н.д.	4,1	н.д.	6	н.д.
19	6	0,08	0,295	0,279	17,6	3,3	н.д.	6,5	н.д.
20	9	0,08	0,172	0,165	44,4	11,2	н.д.	12,5	н.д.
21	9	0,08	0,202	0,157	3,8	2	15,1	1,9	17,9
22	60	0	0,019	0,018	361,4	223,6	873,1	173,2	95441,6
23	13	0,05	0,111	0,113	н.д.	45,4	н.д.	39,7	н.д.
24	42	0,01	0,034	0,028	51,9	42,2	65,9	40,7	69,3
25	10	0,05	0,144	0,137	43,2	15,2	н.д.	18,7	н.д.
26	15	0,03	0,096	0,085	25,1	16,1	47,8	16,7	44
27	26	0,02	0,044	0,044	639,9	128,4	н.д.	126,5	н.д.
28	24	0,02	0,050	0,050	н.д.	231,1	н.д.	195,2	н.д.
29	9	0,1	0,161	0,163	н.д.	18,8	н.д.	25,2	н.д.
30	6	0,1	0,435	0,306	1,2	0,8	2,1	0,9	1,6

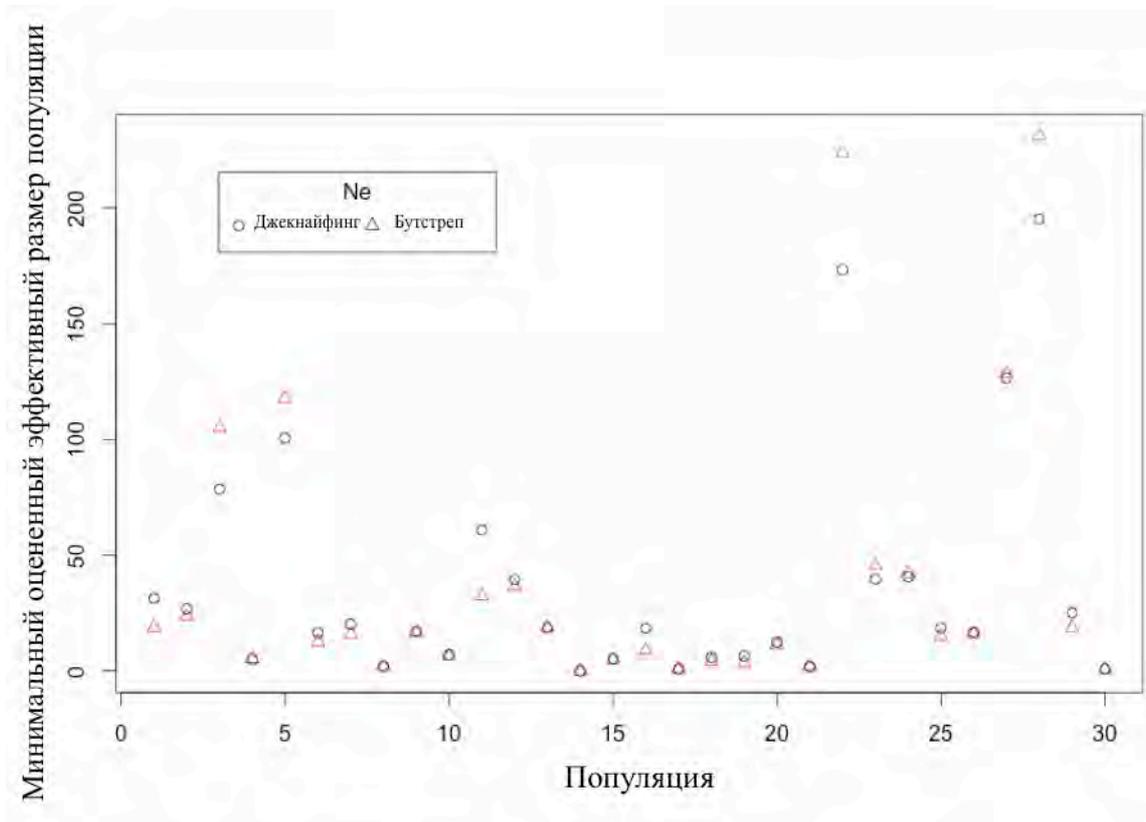


Рисунок 3.6.2. Минимальные оценки N_e , полученные методом неравновесия по сцеплению для популяций сахалинского тайменя.

3.7. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA)

По результатам анализа молекулярной дисперсии (AMOVA), разделение на контрастирующие типы популяционной иерархии статистически значимо (Таблица 3.7.1), как с предположением об уникальности всех популяций (1), так и с разбиением популяций по иерархическому признаку (2-4). Доля межгрупповой компоненты варьирует от 9.59% до 17.48% для разных разбиений. Наибольшая межгрупповая компонента проявляется при разбиении групп популяций по простому географическому признаку – каждый остров в отдельности и материк. Почти при всех типах разбиения на группы доля межгрупповой изменчивости в 1,5-2 раза превосходит уровень внутригрупповой межпопуляционной изменчивости, являясь статистически значимой, что подтверждает иерархическое устройство популяционно-генетической структуры сахалинского тайменя.

Таблица 3.7.1. Результаты анализа молекулярной дисперсии AMOVA для различных разбиений на группы популяций.

Тип анализа	% изменчивости между группами	% изменчивости между популяциями внутри групп	% изменчивости между особями в пределах популяций	% изменчивости в пределах особей	FIS	FSC	FCT	FIT
1. Все популяции в одной группе, без иерархической подразделенности	16.94 (между популяциями)	-	4,37	78.69	0.052	0.169	-	0.213
2. Подразделение по географическому признаку (Сахалин, материк, Итуруп, Кунашир, Хоккайдо)	17.48	8,18	3,91	70,43	0.052	0.099	0.174	0.296
3. Разделение на основе результатов <i>STRUCTURE</i> (северо-восточный Сахалин, бассейн реки Поронай, Южный Сахалин, Северо-Западный Сахалин, Материк)	9,59	8,84	4,29	77,28	0.052	0.097	0.095	0.227
4. Разделение по географическому признаку с выделением групп внутри острова Сахалин на основе меры <i>Dps</i> (бассейн реки Поронай, северо-восточный Сахалин, северо-западный Сахалин)	10,24	8	4,3	77,46	0.052	0.089	0.102	0.225
4. Разделение на основе зоогеографических регионов (по Мартыненко, 2007).	12,12	6,1	4,3	77,48	0.052	0.069	0.121	0.225

3.8. Филогенетический анализ фрагментов митохондриальной ДНК сахалинского тайменя

Секвенированные фрагменты двух митохондриальных генов были сконкатенированы в один фрагмент длиной 1029 пар нуклеотидов, так как митохондриальная ДНК преимущественно не подвержена рекомбинации и представляет собой один сцепленный локус. Всего было обнаружено 22

полиморфных сайта (5 из них вызваны несинонимичными заменами) в исследованных фрагментах и 14 гаплотипов. Среднее гаплотипическое разнообразие (H_d) составило $0,833 \pm 0,023$ для всей выборки, а нуклеотидное разнообразие (P_i) $0,0039 \pm 0,00024$. Ввиду того, что выборки из отдельных водоемов были крайне малы для полноценного анализа, а среднее расстояние между соседними выборками не превышало 20-30 км, рассмотрение филогеографической структуры проводилось на основе экорегинальных групп выделенных для Дальнего Востока (Мартыненко, 2007). Зоогеографические группы сахалинского тайменя демонстрируют близкий к среднему уровень гаплотипического и нуклеотидного разнообразия (Таблица 3.8.1), за исключением выборок Курильских островов (средние значения H_d $0-0,286 \pm 0,196$) и единственной выборки с острова Хоккайдо ($H_d = 0,5 \pm 0,256$), показывающих пониженный уровень гаплотипического разнообразия.

Таблица 3.8.1. Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие выборок сахалинского тайменя, объединенных по географическому признаку для конкатенированного фрагмента митохондриальной ДНК длиной 1029 пн.

Группа популяций	Полиморфных сайтов	Гаплотипов	Гаплотипическое разнообразие, H_d ($\pm SD$)	Нуклеотидное разнообразие P_i , ($\pm SD$)	Размер выборки
51 (северо-восточный Сахалин)	13	6	$0,8 \pm 0,049$	$0,00403 \pm 0,00055$	21
73 (бассейн р.Поронай)	7	5	$0,833 \pm 0,06$	$0,00309 \pm 0,00039$	13
84 (южный Сахалин)	15	6	$0,787 \pm 0,075$	$0,00384 \pm 0,00083$	17
74 (о.Итуруп)	5	2	$0,286 \pm 0,196$	$0,00139 \pm 0,00095$	7
94 (о. Кунашир)	0	1	0	0	5
86 (о.Хоккайдо)	1	2	$0,5 \pm 0,256$	$0,00049 \pm 0,00053$	4
72 (западный Сахалин)	13	6	$0,831 \pm 0,056$	$0,00472 \pm 0,00054$	17

71 (вместе с "82", материковые популяции)	11	4	$0,66 \pm 0,078$	$0,00367 \pm 0,00059$	18
---	----	---	------------------	-----------------------	----

Построенная байесовская дендрограмма вместе с генеалогической сетью гаплотипов позволяет выделить 4 крупных гаплогруппы, на основе постериорных вероятностей в узлах дендрограммы (Рисунок 3.8.1, 4.8.3). Гаплотипы, по большей части, не демонстрируют монофилетической обособленности для отдельных географических регионов за исключением некоторых выборок: о. Хоккайдо (серый цвет, _86, Рисунок 3.8.1), о. Итуруп (оранжевый цвет, _74, Рисунок 3.8.1). Большая часть гаплотипов представлена на всем ареале сахалинского тайменя.

При анализе более крупных географических регионов (каждый из островов отдельно и материковая часть), наблюдается схожая картина распределения гаплотипов (Рисунок 3.8.2), но материковые популяции преимущественно представлены часто встречающимися гаплотипами, в то время как сахалинские обогащены достаточно редкими вариантами.

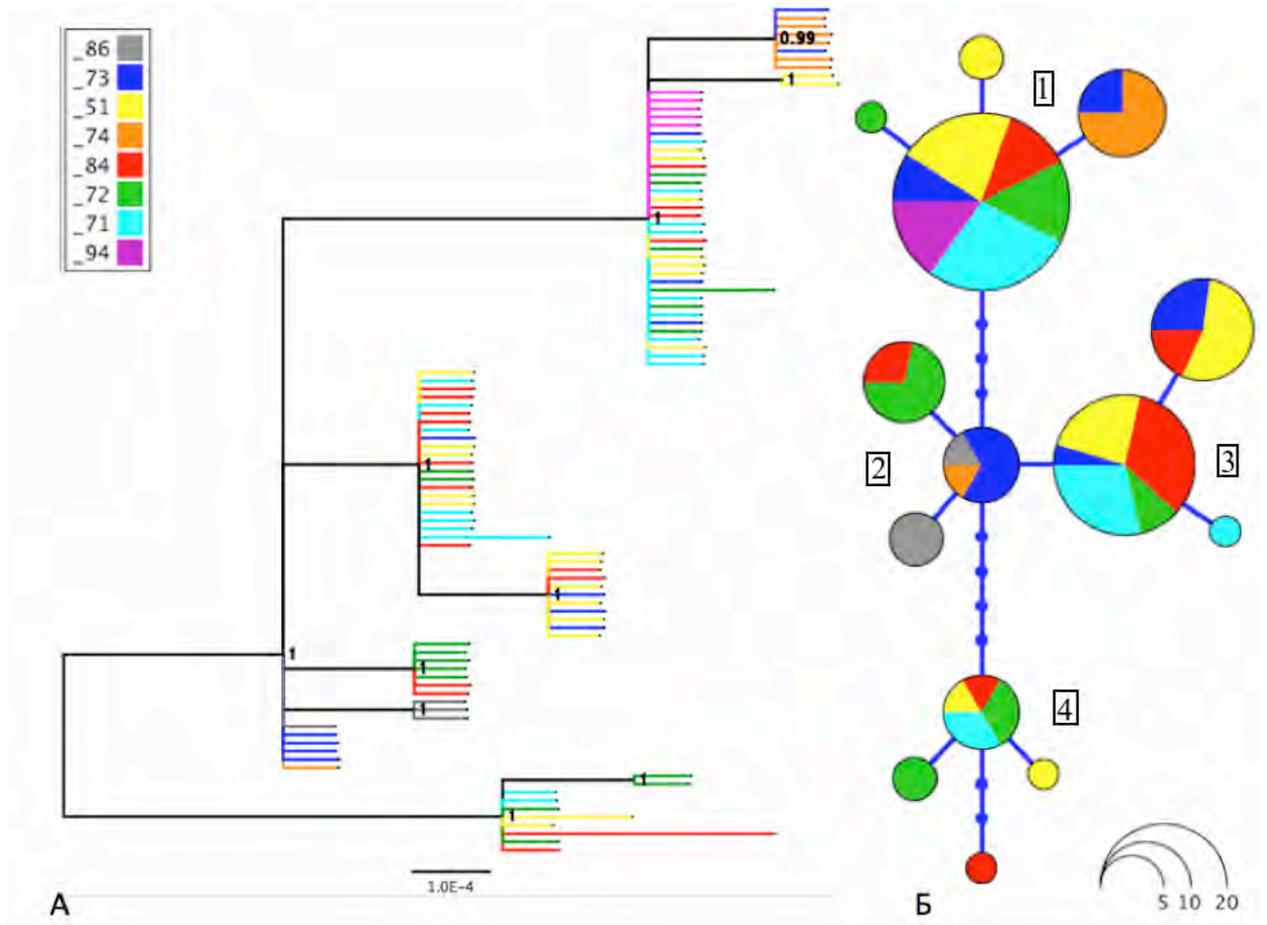


Рисунок 3.8.1. А) Байесовская дендрограмма, визуализирующая филогенетические взаимоотношения сахалинского тайменя из разных частей ареала по результатам анализа митохондриальных фрагментов генов *CO1* и *CytB*. В узлах указаны апостериорные вероятности (только для значений более 0.95, меньшие коллапсированны). Б) Генеалогическая сеть гаплотипов для изученного фрагмента митохондриальной ДНК сахалинского тайменя. Показан масштаб и число замен между гаплотипами. Цветами обозначены группы выборок из разных зоогеографических регионов (ключ в левом верхнем углу рисунка). Цифры в квадратах - используемые номера гаплогрупп. В приложении 5 показана дендрограмма реконструированная методом ближайшего соседства.

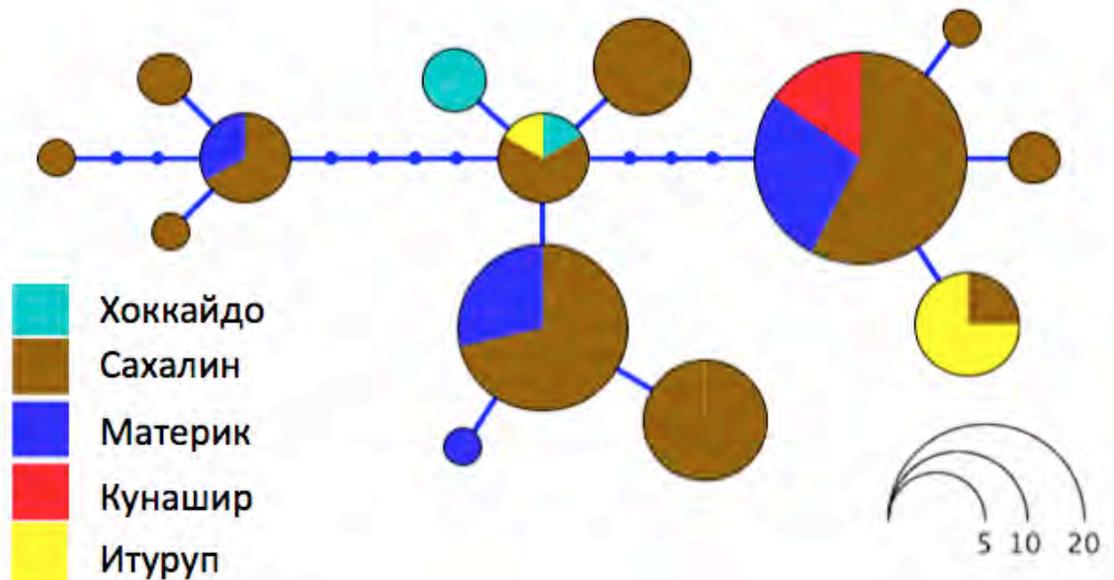


Рисунок 3.8.2. Генеалогическая сеть гаплотипов для изученного фрагмента митохондриальной ДНК сахалинского тайменя. Различными цветами обозначены наиболее крупные отдельные регионы на ареале вида. Показан масштаб и число нуклеотидных замен между гаплотипами.

Основные гаплогруппы распространены по сахалинским и материковым популяциям (Рисунок 3.8.3). Одна из наиболее дивергированных гаплогрупп (№4) отсутствует в бассейне реки Поронай, а также на Хоккайдо и Курильских островах. Центральная гаплогруппа (№2) не представлена в материковых выборках и на северо-востоке Сахалина, но достигает высокой частоты в бассейне реки Поронай. Выявленные другими методами группы близкорасположенных популяций не обнаруживают значительной нуклеотидной дивергенции при использовании фрагментов митохондриальной ДНК. Отсутствуют монофилетические клады, ассоциированные с какой-либо отдельной популяцией, или группой популяций, за исключением выборок с острова Итуруп.

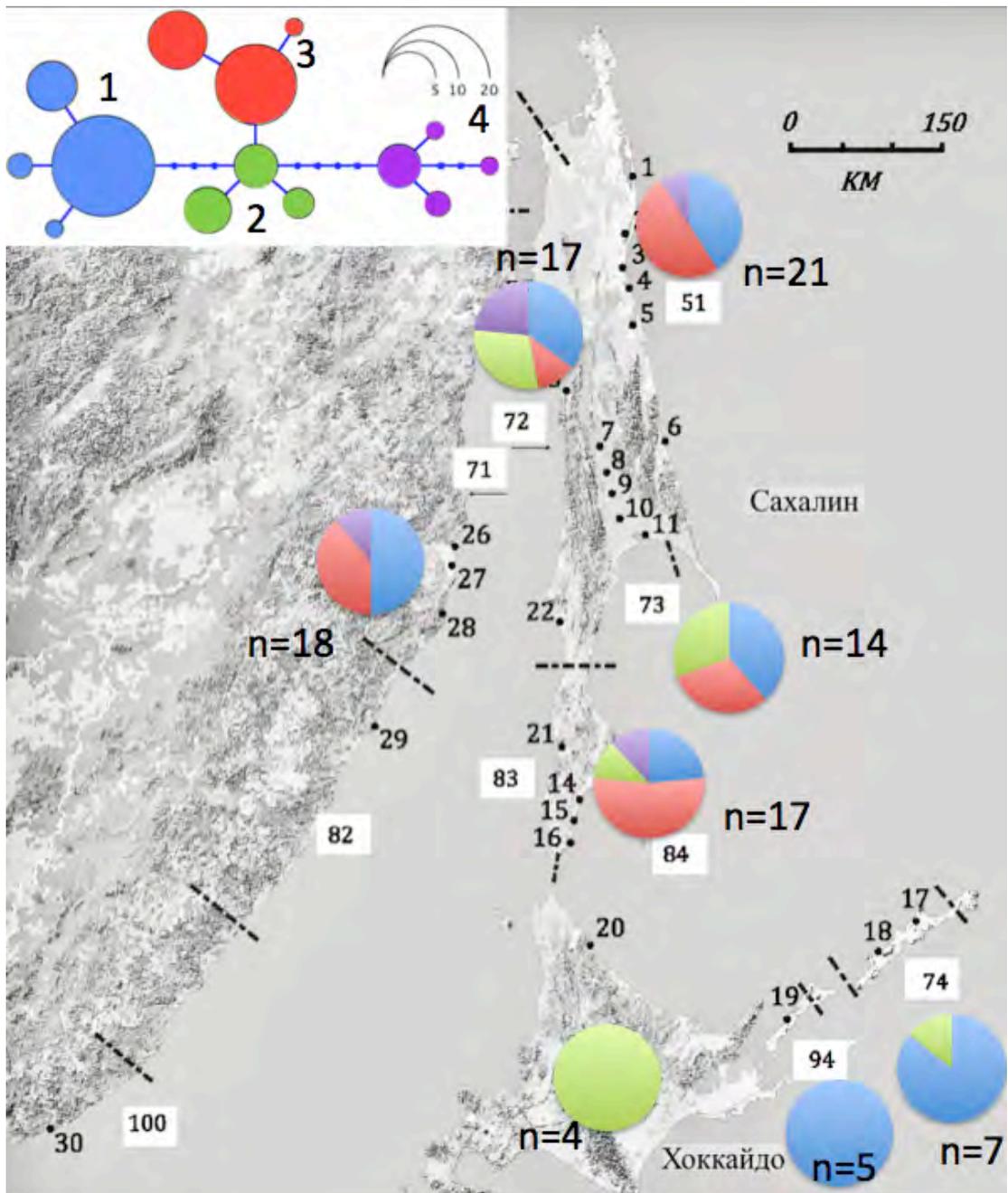


Рисунок 3.8.3. Распределение основных гаплогрупп (1-4) в крупных зоогеографических регионах обитания сахалинского сахалинского тайменя (показаны в белых квадратах).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Популяционно-генетическая дифференциация популяций сахалинского тайменя

Полученные в ходе настоящего исследования результаты указывают на наличие ярко выраженной популяционно-генетической структуры сахалинского тайменя с высокими уровнями популяционно-генетической дифференциации, что подтверждается высокими значениями параметра θ (аналог F_{st}) между большинством исследованных популяций (Рисунок 3.1.1, Приложение 4). Среднее значение θ между парами популяций составило 12, при размахе от -0,02 до 0,34. Средние значения межпопуляционной дифференциации для других лососевых видов из исследованного региона находятся на уровне 0,199 (F_{st} , без камчатских и магаданских выборок) для кунджи *Salvelinus leucomaenis* (Salmenkova et al., 2014), 0,088 для кеты *Oncorhynchus keta* (Afanas'ev et al., 2011) и 0,058 (F_{st}) для симы *Oncorhynchus masou* (Yu et al., 2010). Эти данные не до конца сопоставимы с полученными в ходе настоящего исследования, так как уровень полиморфизма отдельных микросателлитных маркеров и их количество значительно влияют на абсолютную амплитуду значений популяционно-генетической дифференциации, но позволяют сравнить порядок величин. Отсутствие значительных отклонений от равновесия Харди-Вайнберга для большинства популяций сахалинского тайменя (Таблица 3.1.1), вместе с данными по популяционно-генетической дифференциации подтверждает, что локальные популяции сахалинского тайменя представлены на уровне максимум отдельных водоемов. В то же время, отклонения от равновесия Харди-Вайнберга (недостаток гетерозигот) в некоторых озерно-лагунных системах (озера Невское, Тунайча, Айнское) свидетельствуют о возможных микрогеографических особенностях популяционной структуры вида на уровне отдельных нерестовых рек и ручьев. Значительная, статистически значимая генетическая дифференциация выборок

сахалинского тайменя между притоками крупнейшей реки Сахалина - Поронай ($\theta=0,056-0,0126$), а также двумя выборками разных лет из самой крупной реки бассейна Японского моря – Тумнина ($\theta=0,017$) подтверждает наличие микрогеографической составляющей в генетической структуре популяций сахалинского тайменя, по крайней мере, для крупных водоемов.

4.2 Иерархическая структура популяций сахалинского тайменя на ареале вида

С использованием различных методов кластеризации популяций, в ходе настоящего исследования показано, что отдельные близкорасположенные популяции сахалинского тайменя группируются в четко выделенные группы, создавая второй, более высокий уровень популяционно-генетической иерархии после локальных популяций. Наличие групп популяций подтверждается анализом мультилокусных генотипов в пространстве главных компонент (Разделы 4.2, 4.3), популяционными дендрограммами на основе матриц генетических расстояний (Разделы 4.2, 4.3), анализом в программе *STRUCTURE* (Раздел 4.4). Не все методы кластеризации дают одни и те же результаты (Рисунок 4.2.1) при выделении групп популяций, но уверенно выделяются следующие популяционные группы: северо-восточный Сахалин, бассейн реки Поронай, остров Итуруп, северо-западный Сахалин, материковая часть ареала вида. Достаточно дивергированными предстают и популяции острова Хоккайдо и острова Кунашир, но наличие лишь одной выборки с каждого из островов не позволяет говорить уверенно о их группируемости с соседними популяциями. Популяции юга острова Сахалин кластеризуются лишь по результатам программы *STRUCTURE*, причем совместно с озером Айнское (Рисунок 3.4.3, $K=4-30$) на юге западной части Сахалина.

По результатам анализа молекулярной дисперсии (*AMOVA*), уровень межгрупповой популяционной дифференциации выделенных группировок в 1,5-2 раза превосходит внутригрупповой (Таблица 3.7.1). Эти оценки являются очень

усредненными, так как территория обитания сахалинского тайменя представляет собой ряд островов и материковое побережье с различным уровнем изоляции этих географических компонент друг от друга, но позволяют сделать вывод о наличии ярко выраженной иерархической популяционной структуры сахалинского тайменя состоящей из локальных популяций на уровне отдельных водоёмов и групп популяций на уровне крупных географических регионов.

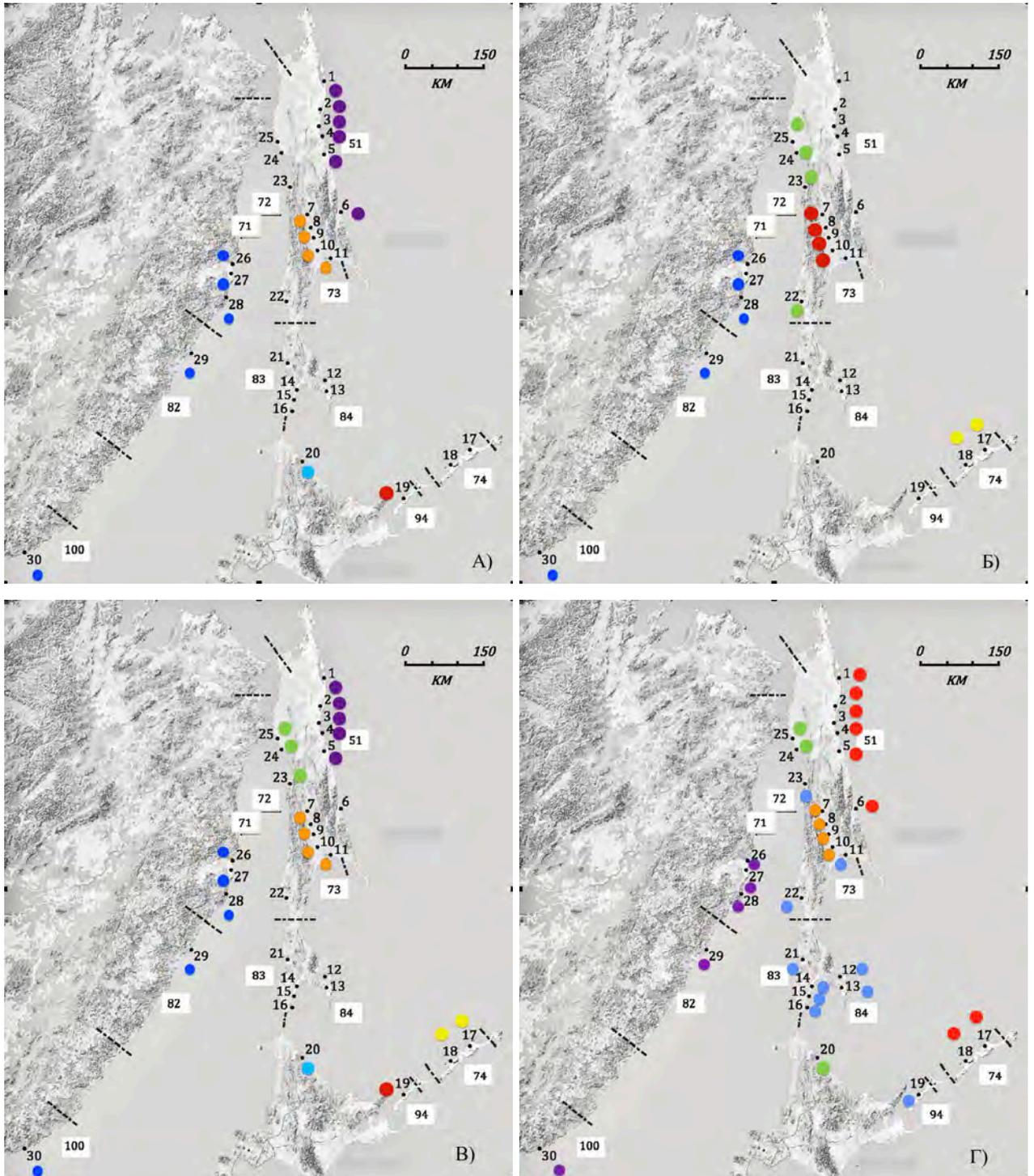


Рисунок 4.2.1. Группы популяций сахалинского тайменя и схема провизорного зоогеографического районирования Дальнего Востока (по Мартыненко, 2007). Цифры в белых квадратах – номера зоогеографических районов, пунктирная линия – границы районов по морскому побережью. А) На основе индивидуальных *Dps* – расстояний (Рисунок 3.2.4). Б) На основе анализа

популяционных выборок в пространстве главных компонент (Рисунок 3.3.2). В) На основе популяционных *Dps* – расстояний (Рисунок 3.3.1, Б). Г) На основе иерархической кластеризации в программе *STRUCTURE* (Рисунок 3.4.4). Популяции, которые выделяются в определенные группы с высокой долей уверенности, обозначены одним цветом.

4.3. Зоогеографические регионы Дальнего Востока и группы популяций сахалинского тайменя

Сахалинский таймень обитает в очень гетерогенных природных условиях Дальнего Востока России. Один лишь остров Сахалин имеет ряд ярко выраженных природных зон с широколиственными лесами и горными реками с галечным грунтом на юге острова и низменными лиственничными лесами с тундровыми реками с песчаным ложем на его севере. Наиболее полная и современная работа, изучающая особенности зоогеографического устройства Дальнего Востока России была, проведена Алексеем Борисовичем Мартыненко (Мартыненко, 2007) на основе данных по климату, флоре, направлению стока рек, распределению фаунистических групп. По данным провизорного зоогеографического районирования для Российского Дальнего Востока регион разбивается на множество отдельных зон, отличающихся уникальностью ландшафтов и фауны (Рисунок 4.3.1). Российская часть современного ареала обитания сахалинского тайменя разбивается на 11 таких районов (Рисунок 3.1.1).

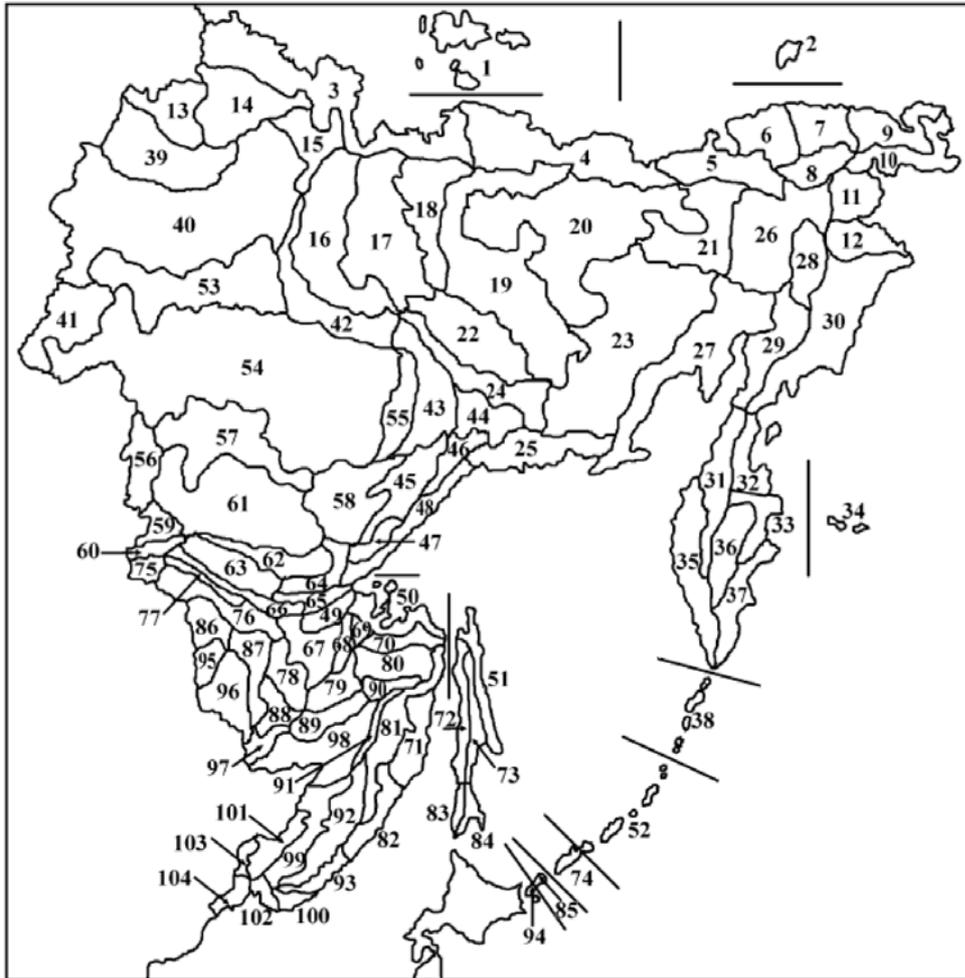


Рисунок 4.3.1. Провизорное зоогеографическое районирование Дальневосточного Федерального Округа РФ (Из Мартыненко, 2007).

С использованием 4 методов кластеризации, для групп популяций острова Сахалин наблюдается соответствие между зоогеографическим районированием по Мартыненко и кластеризацией с использованием различных популяционно-генетических алгоритмов (Рисунок 4.2.1). Именно, группа популяций региона #51 (северо-восточный Сахалин) поддерживается тремя методами, отчетливо выделяется регион #73 (бассейн реки Поронай), двумя методами поддерживается западный Сахалин, регион #72 (за исключением озера Айнского), популяции острова Итуруп (#74). На всех рисунках популяции материкового побережья объединены в единую группу по причине малого числа выборок оттуда, при этом, по результатам кластеризации (Рисунок 3.3.1, 4.4.3), отчетлива видна клинальная изменчивость, поддерживаемая высокими значениями бутстрепа для этих

популяций, так что популяции 29 (р. Самарга) и 30 (р. Киевка) образуют, скорее, отдельную кладу. Этот же паттерн наблюдается даже для индивидуальных мультилокусных генотипов из обсуждаемых регионов (Рисунок 3.2.3). Попарные генетические расстояния Нея Da (Nei, 1983) между популяциями внутри зоогеографических регионов, в среднем, значительно меньше чем между ними (Рисунок 4.3.2).

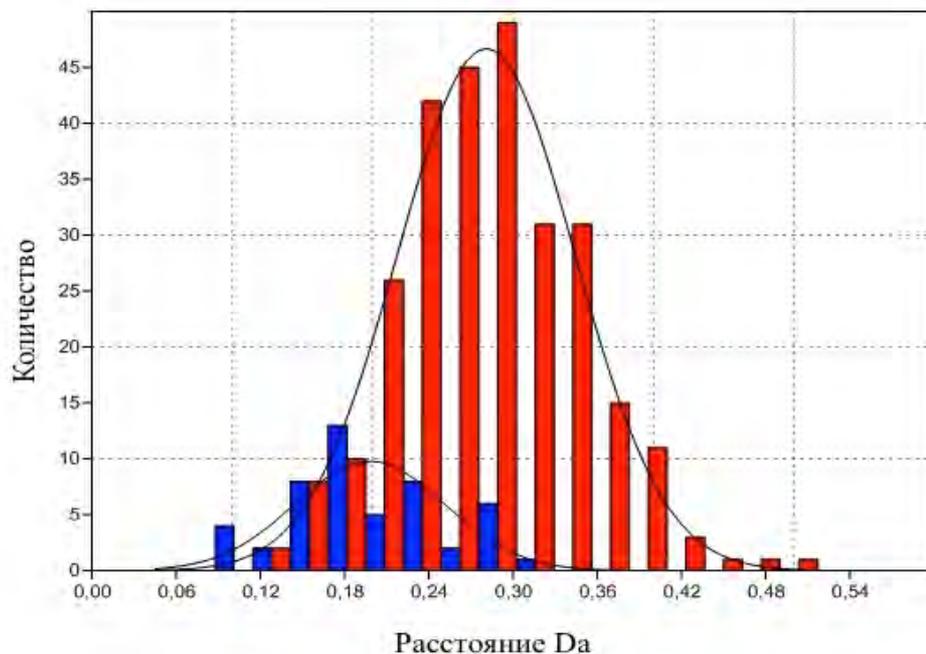


Рисунок 4.3.2 Распределение генетических расстояний Нея Da между парами популяций внутри (синий цвет) и вне зоогеографических регионов (красный цвет).

Наблюдаются и исключения из общей схемы, например, озеро Айнское и озеро Невское не попадают в генетические группы соответствующих им экорегiónов, слабо выраженную группировку демонстрируют популяции юга острова Сахалин (в том числе озерные системы Тунайча и Вавайское). Отклонение от общего тренда в популяциях озер Сахалина может объясняться изолированностью этих водоемов или особым характером миграций в- и из-. Юг

острова Сахалин является очень густонаселенным регионом и подвержен сильному антропогенному воздействию, что может объяснять распадение исторических популяционных группировок на отдельные более мелкие компоненты, ввиду ослабления миграций и усиления генетического дрейфа. Альтернативным объяснением может служить сложная зоогеографическая схема южного Сахалина, требующая более подробного деления.

Какую роль играют исторические факторы формирования популяционной структуры (расселение в постледниковый период, изоляция в рефугиумах) и современные популяционно-генетические процессы в формировании зоогеографических групп популяций? Данные по миграционному поведению сахалинского тайменя (Раздел 1.3), указывающие на выход особей в морское побережье, а также полученные в ходе настоящего исследования результаты по генетической изоляции расстоянием между популяциями сахалинского тайменя свидетельствуют о возможной роли миграций между соседними популяциями в создании иерархической популяционной структуры (Раздел 4.5).

В природоохранных проектах, при работе с редкими и исчезающими видами вопрос неравномерности и недостаточности выборок всегда стоит очень остро, в то время как является крайне важным для достоверного описания популяционно-генетической структуры. В данной работе удалось охватить выборками большую часть ареала вида, но отдельные районы представлены единичными популяциями (остров Кунашир, Хоккайдо, бассейн реки Тымь и др.). В этих условиях ожидается недооценка степени подразделенности и уровня сгруппированности популяций. В то же время, подход на основе аппроксимации популяционно-генетических паттернов известными зоогеографическими регионами при планировании транслокаций и интродукций генетического материала, а также искусственного разведения, может быть очень хорошей альтернативой, так как совокупность климата и географии играет определяющую роль в становлении локальных адаптаций лососевых рыб (Раздел 2.6). Группы популяций, соотносимые с зоогеографическим районированием могут быть использованы, как референсные точки относительно которых может быть

экстраполирована информация на соседние популяции при планировании природоохранных мероприятий вида.

В контексте природоохранной генетики, наибольшее значение для принятия решений по реинтродукции, искусственному разведению и поддерживающему скрещиванию, имеют не сами наблюдаемые паттерны популяционной структуры, а процессы, их продуцирующие (Разделы 2.8-2.10). Основываясь на знании особенностей популяционной структуры видов, можно избежать многих ошибок, спланировать сохранение и восстановление популяционных генофондов (Алтухов, 2004). Тема локальных адаптаций, создаваемых в ответ на гетерогенность в биотических и абиотических факторах среды лососевых рыб очень важна в природоохранном контексте (Раздел 2.6). Сказать что-то определенное про гетерогенность микробиоты и паразитофауны на ареале сахалинского тайменя весьма трудно – для создания полной картины в этом направлении требуются отдельные научные изыскания. В то же время, из исследований паразитофауны тихоокеанских лососей (Criscione, Blouine, 2007; Ferguson et al., 2011; Lester et al., 2014), а также данных по вариабельности их главного комплекса гистосовместимости (Miller, Withler, 1997; Dionne et al., 2007; Larson et al., 2014) известна высокая степень схожести филогеографических паттернов основных паразитов лососевых рыб и их хозяев, вплоть до локальных популяций, что требует принимать во внимание возможную (и очень вероятную) гетерогенность паразитофауны на ареале сахалинского тайменя при его искусственном разведении.

4.4 Формирование генетической структуры популяций сахалинского тайменя

Филогеографическая составляющая в формировании популяционной структуры видов, а также в контексте природоохранной генетики привлекла пристальное внимание после выхода книги Джона Эвиса «Филогеография, история

и формирование видов» (Avice, 2000). На большом материале по внутривидовой изменчивости, в основном митохондриальных фрагментов ДНК, автор показал, что многие вопросы популяционной структуры видов могут быть решены скорее с использованием филогенетического подхода, основанного на генных деревьях, чем классическим популяционно-генетическим анализом частот аллелей в популяциях. Особенно многообещающие результаты метод показал для выявления подвидов и криптического видового разнообразия (Tang et al., 2010; Shen et al., 2011), а также послеледниковой истории видов (Provan, Bennet, 2008)

В настоящей работе, с использованием 2 фрагментов генов митохондриальной ДНК показано, что несмотря на наличие генетически различающихся групп популяций, выделенных на основе микросателлитных локусов ДНК, на ареале сахалинского тайменя отсутствуют глубоко дивергированные митохондриальные клады приуроченные к определенным территориям, наблюдаемые для многих других видов с выраженной популяционно-генетической структурой. Наличие таких кладов могло бы свидетельствовать в пользу длительной изолированной эволюционной истории определенных групп популяций, но преобладание уникальных гаплотипов наблюдается лишь для исследованных популяций острова Итуруп и единственной выборки с острова Хоккайдо, что может свидетельствовать о длительной изоляции этих популяций в условиях низкой численности, что подтверждается и микросателлитными данными. Важно отметить, что данные гаплотипы отличаются лишь на одну замену от более распространенных на ареале (Рисунок 3.8.1).

При понижении уровня моря во время последнего ледникового максимума, Сахалин, Кунашир и Хоккайдо формировали единый полуостров, соединенный с материком в районе нынешнего лимана реки Амур (Рисунок 4.4.1), в то же время, Итуруп был отделен от других островов глубоким (более 400 метров) Екатерининским проливом (Величко, 2009). Очевидно, эта тенденция имела место и при более ранних понижениях уровня моря. Учитывая что таймень практически не встречается на большом удалении от берега, можно предположить

давнюю и отдельную историю итурупских популяций вида, получающую и генетическое подтверждение в данной работе.

Показательна и совместная кластеризация значительно дивергированных групп островов Итуруп, Кунашир и Хоккайдо совместно с сахалинскими выборками по результатам микросателлитного анализа (Рисунок 3.2.1). Вероятно, этот паттерн отражает прошлую связь Сахалина с Курилами и Японскими островами в период последнего оледенения, когда уровень моря значительно опускался, образуя лагуноподобный залив на месте современного Японского моря, окаймленный с востока группой соединенных островов, включающих острова японского архипелага, Сахалин и Южные Курильские острова (Величко, 2009).



Рисунок 4.4.1. Палеогеография островных территорий Дальнего Востока в период последнего ледникового максимума (около 15 000 лет назад). Красной

стрелкой показан пролив Екатерины между островами Итуруп и Кунашир, остававшийся действующим, в отличие от более мелких проливов региона при понижении уровня океана. Светло-серым цветом показаны области суши, которые сейчас затоплены водой (Из Lee et al., 2008).

Монофилетические клады митохондриальных маркеров, ассоциированные с тем или иным географическим регионом, чаще всего возникают при долговременной изоляции популяций на отдельных территориях или при снижении численности, сопровождающейся долговременной изоляцией в рефугиумах (Avice, 2000). Для локусов митохондриальной ДНК этот эффект обусловлен относительно высокой мутационной скоростью, продуцирующей новые варианты, и в два раза более сильным генетическим дрейфом, чем для ядерных локусов из-за меньшей эффективной численности митохондриального генома. В данном случае, отсутствие монофилетических кладов, приуроченных к каким-либо географическим территориям может объясняться разными причинами:

- 1) Недостаточность информации в исследуемых митохондриальных фрагментах ДНК для выявления филогеографической истории вида.
- 2) Регулярные миграции сильно гомогенизируют общий паттерн изменчивости, что вместе с невысоким гаплотипическим разнообразием (всего 14 гаплотипов) нивелирует действие генетического дрейфа в отдельных популяциях.
- 3) Относительно быстрое расселение сахалинского тайменя из рефугиумов, «перемешавшее» гаплотипы более или менее случайным образом.

Все выше обозначенные возможные объяснения имеют право на существование, но глубокой дивергенции для групп и популяций сахалинского тайменя не наблюдается. Размер использованных фрагментов ДНК представляется вполне информативным, учитывая, что множество работ по филогеографии видов,

включая лососевых рыб, были выполнены с использованием более коротких фрагментов митохондриальной ДНК (Waters et al., 2001; Froufe et al., 2005).

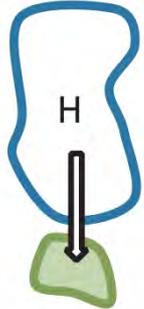
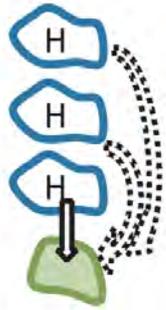
4.5. Генетическое разнообразие популяций сахалинского тайменя и избежание негативных последствий искусственного разведения вида

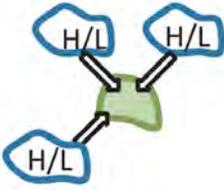
Генетическое разнообразие является одним из важнейших факторов для оценки истории популяций, их природоохранной ценности и эволюционного потенциала. В результате настоящей работы показано, что уровень внутривидового генетического разнообразия сахалинского тайменя не различается сильно на ареале вида как по микросателлитным маркерам ДНК (Рисунок 3.6.1, Таблица 3.6.1), так и фрагментам митохондриальной ДНК (Таблица 3.8.1). Заметно выделяется своим обедненным генетическим разнообразием по обоим маркерам лишь группа популяций острова Итуруп, что вероятно вызвано как сильной изоляцией острова, так и антропогенным воздействием. Относительно низким гаплотипическим разнообразием обладают выборки с материковой части ареала ($H_d=0,66\pm 0,078$), являясь при этом наиболее разнообразными по микросателлитным маркерам ДНК. Известно, что северные материковые популяции являются одними из наиболее многочисленных на ареале сахалинского тайменя и поддерживаются крупными водоемами, такими как реки Тумнин, Коппи, Самарга. Учитывая большую скорость мутирования в микросателлитных локусах ДНК, можно предположить, что эти популяции испытали долговременное сокращение численности и стали многочисленными весьма недавно (например после ледникового максимума) не успев накопить достаточного разнообразия в митохондриальных геномах, имеющих меньшую эффективную численность популяции и пониженную скорость мутирования.

Какова вероятность развития инбредной депрессии в популяциях сахалинского тайменя имеющих низкую эффективную численность популяции? В

недавней крупной работе по вопросам минимального жизнеспособного размера популяции (Frankham et al., 2014) было постулировано правило 100/1000, согласно которому N_e не менее 100 особей должна быть во избежание скорой инбредной депрессии (несколько поколений, около 50 лет для сахалинского тайменя) и N_e не менее 1000 особей для сохранения эволюционного потенциала популяций. Минимальные оценки эффективной численности согласно анализу, проведенному в настоящей работе, до 50 особей для большинства популяций (Таблица 3.6.1, Рисунок 3.6.2), при средних значениях около 80 особей. Эти данные вызывают большие опасения за судьбу популяций сахалинского тайменя, так как большая часть из них балансирует на грани критической кратковременной эффективной численности. Является ли столь низкая эффективная численность популяций свойством вида или скорее последствием резкого снижения численности в последние годы? Более всего вероятен промежуточный сценарий – численность сахалинского тайменя никогда не была очень высокой, а эффективная численность поддерживалась на низком, но достаточном уровне за счет потока генов из соседних популяций. Со снижением численности под действием антропогенных факторов упал и средний эффективный размер популяции сахалинского тайменя. На этом фоне, логичным решением видится увеличение численности популяций сахалинского тайменя путем искусственного разведения с забором производителей для данных целей из этих же, либо соседних популяций, как и интродукция мальков в водоемы, где сахалинский таймень исчез в последние годы. Исходя из предлагаемых решений по транслокации особей (Weeks et al., 2011), представленных в таблице 4.5.1, можно составить приемлемую схему восстановления популяций. Учитывая сохранившееся генетическое разнообразие в популяциях сахалинского тайменя при одновременной сильной их дифференциации наиболее оптимальной выглядит стратегия «генетической помощи» по второму варианту из Таблицы 4.5.1: использовать особей из экологически сходных, соседних популяций.

Таблица 4.5.1. Предлагаемые решения по транслокации особей, «генетической помощи» малым популяциям (По: Weeks et al., 2011).

	Генетическое разнообразие популяции-донора	Распределение в пространстве популяции-донора	Предлагаемое решение	Схема
1.	Высокое	Непрерывное	Брать особей либо со всего пространства распространения, либо с ближайших мест, если они соответствуют экологически.	
2.	Высокое	Фрагментированное вдоль клина	Использовать особей из фрагментов, соответствующих популяции-реципиенту экологически. Это может быть ближайшая популяция, особенно при наличии широтного градиента изменчивости.	

3.	Высокое или низкое	Более двух популяций, сильное разделение, нет адаптаций к местам обитаний.	Использовать в качестве популяции –донора большую часть соседних популяций.	
4.	Низкое	Фрагментированная вдоль клина	Использовать в качестве популяций-доноров разные субпопуляции, по возможности из сходных экологических условий. В случае широтной изменчивости – с одной широты.	

При искусственном разведении всегда возникает риск возникновения негативных последствий аутбридинга приводящих к эрозии популяционных генофондов. Обратимся к схеме на рисунке 1.10.2 и пройдем по ней с использованием полученных в работе данных (Таблица 4.5.2). Для уровня зоогеографических регионов ответ получается однозначным - высокая вероятность возникновения аутбредной депрессии при перемещении особей между зоогеографическими регионами. Для популяций внутри зоогеографических регионов возможны поддерживающие транслокации для восстановления генетического разнообразия популяций, что особенно актуально для популяций с низким уровнем генетического разнообразия (как, например, популяции острова Итуруп). В то же время нежелательно перевозить мальков от производителей, выловленных в озерных системах и наоборот, так как различия между ними очень

значительны на острове Сахалин: озера имеющие связь с морем часто солоноваты, что влечет за собой сильные отличия в биотических и абиотических факторах среды.

Таблица 4.5.2. Результат анализа возможности инбредной депрессии для популяций сахалинского тайменя по схеме из Frankham et al., 2011.

	Зоогеографические районы	Внутри зоогеографических районов
1. Таксономия разрешена?	Да	Да
2. Фиксированные хромосомные различия?	Нет информации	Нет информации
3. Генные потоки между популяциями в последние 500 лет?	Нет (уровень дивергенции между крупными регионами говорит, скорее, об их отсутствии)	Да (исходя из данных по изоляции расстоянием и анализа в программе <i>STRUCTURE</i>)
4. Значительные различия мест обитания?	Да	1. Нет 2. Да (для случаев река-озеро)
5. Популяции разделены более 20 поколений?	Да	Да
РЕЗУЛЬТАТ	Не смешивать популяции	1. Возобновить генные потоки. 2. Оценить вероятность аутбредной депрессии более детально.

4.6. Заключение

В ходе настоящей работы были собраны уникальные выборки, охватывающие большую часть ареала сахалинского тайменя *Parahucho perryi*. На основе разработанной панели из 19 микросателлитных локусов ДНК было генотипировано 473 особи сахалинского тайменя. Секвенированы два участка

митохондриальной ДНК (часть гена цитохромоксидазы-1 (*COI*) и цитохрома *b* (*CytB*), длиной 600 п.н. и 429 п.н. соответственно) у 103 особей.

В ходе работы показано, что генетическая структура сахалинского тайменя формируется высоко дифференцированными локальными популяциями на уровне отдельных водоемов с возможной микрогеографической дифференциацией на уровне отдельных нерестовых ручьев и притоков рек и озер. Несмотря на высокий уровень дифференциации между популяциями, они группируются на уровне отдельных географических экорегионов (северо-восточный Сахалин, бассейн реки Поронай, о. Итуруп, северо-западный Сахалин, материковая часть ареала вида) и возможно связаны миграциями внутри них. Гипотеза о длительной изоляции зоогеографических групп популяций не подтверждается филогеографическими данными.

Методом неравновесия по сцеплению оценена эффективная численность популяций сахалинского тайменя, показана критически низкая минимальная численность для большинства популяций, что отражает особенности биологии вида и, вероятно, последствия антропогенного воздействия в ходе последних десятилетий. В то же время, уровень генетического разнообразия сахалинского тайменя остается схожим для большинства популяций, что говорит в пользу версии об антропогенных причинах снижения численности, так как гетерозиготность скорее отражает эффективную численность популяций на больших исторических отрезках времени и быстро снижается лишь в очень маленьких популяциях (в нашем случае это обнаружено для водоемов острова Итуруп и озера Тайного).

На основе данных по выявленным особенностям популяционно-генетической дифференциации вида даны рекомендации по минимизации аутбредной и инбредной депрессий в популяциях сахалинского тайменя при искусственном разведении вида. Производители, в случае отсутствия их в водоеме, куда предполагается производить выпуск мальков, должны быть взяты только из соседних водоемов с сохранением их специфики (река – озеро) во избежание аутбредной депрессии. Необходим генетический мониторинг

популяций сахалинского тайменя, в том числе малых, искусственное разведение исчезающих популяций, охрана и восстановление мест обитания и воспроизводства сахалинского тайменя.

4.7. Перспективы дальнейшей разработки темы

1) Изучение геномных механизмов естественного отбора и локальных адаптаций вида в условиях активного генетического дрейфа.

Тема является крайне интересной и становится осуществимой практически в последние годы с появлением технологий секвенирования нового поколения и началом их активного использования в популяционной геномике (Stapley et al., 2010; Davey et al., 2011). Крайне интересными представляются будущие открытия геномных механизмов локальной адаптации лососевых рыб, описание геномных барьеров между популяциями, выявляемых условно нейтральными микросателлитными локусами. Сахалинский таймень представляет собой интересный объект для таких исследований, поскольку, как показано в данной работе, соседние группы популяций сильно дифференцированы генетически. Что скрывается за этим: геномные механизмы, обусловленные локальными генетическими адаптациями или исключительно физические барьеры для потока генов? Следует заметить, что лососевые рыбы являются не самым простым объектом исследования: множественные копии генов, в том числе с различной степенью псевдогенизации, оставшиеся в наследство от недавнего 4-го раунда полногеномной дупликации, очень осложняют работу с этими видами (Berthelot et al., 2014).

2) Геномный мониторинг популяционных генофондов сахалинского тайменя, усилий по искусственному разведению и реинтродукции вида. Настоящая работа может быть использована как задел для многолетней программы.

ВЫВОДЫ

1. Генетическая структура популяций сахалинского тайменя формируется на двух основных уровнях: (а) дифференцированных локальных популяций на уровне отдельных водоемов и (б) групп популяций из близких водоемов, вероятно, связанных потоком генов. Средние генетические расстояния D_{st} между популяциями равняются 0,19 внутри зоогеографических регионов, и 0,29 между ними.

2. Выявлено значительное соответствие между генетической кластеризацией групп популяций и зоогеографическим районированием ареала вида, которое позволяет с большей надежностью относить популяции к ранее выявленным генетическими методами группам, что важно при планировании природоохранных мероприятий на ареале вида.

3. Согласно результатам анализа митохондриальных маркеров ДНК, наиболее вероятно, что дивергенция групп популяций сахалинского тайменя (выделенных на основе частот аллелей микросателлитных локусов ДНК) вызвана малой эффективной численностью и ограниченной частотой миграций между группами (обусловленными природно-географическими условиями мест обитания и пр. факторами), а не долговременной изоляцией в ледниковых рефугиумах или современных местах обитания.

4. Эффективная численность большинства исследованных популяций сахалинского тайменя находится на очень низком уровне (в среднем, $N_e \approx 80$). По уровню генетического разнообразия выделяются малые изолированные популяции, демонстрирующие следы деградации генофонда, в то время как большая часть исследованных популяций имеет средний уровень генетического разнообразия. Требуются интенсивная охрана вида и искусственное разведение для увеличения численности этого вида.

5. Работы по реинтродукции и искусственному разведению сахалинского тайменя должны учитывать особенности описанной генетической структуры популяций сахалинского тайменя во избежание деградации популяционных

генофондов вида. Производители должны отбираться из того водоема, в котором планируется выпуск молоди. При невозможности отбора производителей из этого водоёма, они должны быть взяты из популяций того же зоогеографического региона, принадлежащих к одной генетической группе популяций.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность своему научному руководителю, д.б.н. Льву Анатольевичу Животовскому за наставничество в работе, коллегам из лаборатории генетических проблем идентификации ИОГен РАН, особенно Татьяне Владимировне Малининой, Ракицкой Татьяне Алексеевне и Анастасии Тетериной за помощь в лабораторных методах и конструктивные обсуждения.

Отдельную благодарность хочется выразить Анатолию Юрьевичу Семенченко, положившему начало моему научному пути и познакомившему меня с объектом исследования.

Выражаю благодарность за организацию экспедиций Золотухину Сергею Федоровичу, Макееву Сергею Степановичу, Туранову Сергею за ценные замечания.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях / Ю. П. Алтухов // вестник вогис – 2004. – Т. 8 – № 2 – 40–59с.
2. Алтухов Ю.П. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Ю. П. Алтухов, Е. А. Салменкова, О. Л. Курбатова, Д. В. Политов, А. Н. Евсюков, О. В. Жукова, И. А. Захаров, И. Г. Моисеева, Ю. А. Столповский, В. А. Пухальский // Ю. П. Алтухова.-М. Наука – 2004.
3. Алтухов Ю.П. Популяционная генетика лососевых рыб // – 1997.
4. Алтухов Ю.П. Популяционная генетика рыб. / Ю. П. Алтухов – 1974.
5. Борзов С.И. Сахалинский таймень острова Итуруп, биология, проблемы сохранения вида / С.И. Борзов // Ихтиологический отчет – ВНИРО - 2004.
6. Брыков В.Л. сравнительный анализ изменчивости митохондриальной днк у четырех видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) / В. Л. Брыков, Н. Е. Полякова, А. В. Семина // Генетика – 2013. – Т. 49 – № 3 – 355с.
7. Величко А.А. Палеоклиматы и палеоландшафты внутропического пространства Северного полушария / А. А. Величко // GEOS, Москва.–2009.–С – 2009. – Т. 129.
8. Глубоковский М. К. Эволюционная биология лососевых рыб / М.К. Глубоковский // Автореф. дисс. Д-ра биол. наук. Владивосток. – 1990. - 48 с.
9. Гриценко О.Ф. Географическая и размерная изменчивость сахалинского тайменя *Hucho perryi* (Brevoort) / О.Ф. Гриценко, А. А. Чуриков // В кн.: «Лососевидные рыбы», Л., «Наука», 1980, С. 92-100.
10. Гриценко О.Ф. Исследования экологии тайменя *Hucho perryi* (Brevoort) Северного Сахалина / О. Ф. Гриценко, А.А. Чуриков // М. ОНТИ ВНИРО. – 1977. - 26 с.

11. Гриценко О.Ф. Сахалинский таймень *Hucho perryi* (Brevoort) реки Богатой (восточное побережье Сахалина) / О. Ф. Гриценко, Е. М. Малкин, А. А. Чуриков // Изв. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва – 1974. – Т. 93 – 91–101с.
12. Животовский Л.А. Генетические принципы экологической сертификации промысла тихоокеанских лососей / Л. А. Животовский, Г. А. Рубцова, М. В. Шитова, Т. В. Малинина, Т. А. Ракицкая, В. Д. Прохоровская, К. И. Афанасьев // Бюл – № 4 – 117–125с.
13. Животовский Л.А. О создании базы ДНК-данных для решения проблем воспроизводства, идентификации и сертификации популяций тихоокеанских лососей на примере кеты о. Итуруп / Л. А. Животовский, К. И. Афанасьев, Г. А. Рубцова, М. В. Шитова, Т. В. Малинина, Т. А. Ракицкая, В. Д. Прохоровская, Е. А. Салменкова, Л. К. Федорова, С. И. Борзов // Вопр. рыболовства – 2008. – Т. 9 – № 1 – 33с.
14. Золотухин С. Ф. Состояние популяции сахалинского тайменя в реках западного побережья Татарского пролива и перспективы его рационального использования / С.Ф. Золотухин, А.В. Шишаев // Особо охраняемые природные территории для защиты лосося и среды его обитания в северо-тихоокеанском регионе. Хабаровск: Изд-во ХГТУ. – 2004 - С. 42-51.
15. Золотухин С.Ф. Рост и распространение сахалинского тайменя *Hucho perryi* (Brevoort) в речных бассейнах / С. Ф. Золотухин, А. Ю. Семенченко // Чтения памяти ВЯ Леванидова.—Владивосток Дальнаука – 2008. – № 4 – 317–338с.
16. Золотухин С.Ф. Таймени и ленки дальнего востока России / С. Ф. Золотухин, А. Ю. Семенченко, В. А. Беляев // Хабаровск: Приамурское географическое общество – 2000.
17. Иванков В.Н. Биология проходных рыб южного Приморья / В. Н. Иванков, С. Н. Падецкий, С. Н. Карпенко, П. Е. Лукьянов // Биология проходных рыб Дальнего Востока. Владивосток ДВГУ – 1984. – 10–36с.

18. Красная книга Российской Федерации (животные) / РАН; Гл. редкол.: В. И. Данилов-Данильян и др. — М.: АСТ: Астрель, 2001. — С. 862. — ISBN 5-17-005792-X, 5-271-00651-4
19. Крюков Н.А. Некоторые данные о положении рыболовства в Приамурском крае / Н. А. Крюков // Записки Приамурского отдела Императорского рус. геогр. об-ва – 1894.
20. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // – 1984.
21. Мартыненко А.Б. Провизорное районирование Дальневосточного федерального округа Российской Федерации для зоогеографических целей / А. Б. Мартыненко // Чтения памяти АИ Куренцова – 2007. – № 18 – 29–47с.
22. Назаркин М.В. Миоценовые рыбы из агневской свиты острова Сахалин: фауна, систематика и происхождение // – 2000.
23. Никитин В.Д. Распределение, численность и проблемы охраны сахалинского тайменя о. Сахалин в современный период / В.Д. Никитин // 2013. <http://www.sakhniro.ru/t/taimen/taimen.html>
24. Олейник А.Г. Филогенетические связи сахалинского тайменя *Parahucho perryi* по данным PCR-RFLP анализа митохондриальной ДНК / А. Г. Олейник, Л. А. Скурихина // Генетика – 2008. – Т. 44 – № 7 – 885–895с.
25. Парпура И.З. Биология сахалинского тайменя *Parahucho Perryi* и гольцов рода *Salvelinus* в водах Северного Приморья / И. З. Парпура – 1991.
26. Ресурсы поверхностных вод СССР: Гидрологическая изученность. Т. 18. Дальний Восток. Вып. 2 [3]. Приморье/ Под ред. И. С. Быкадорова. — Л.: Гидрометеиздат, 1963. — С.83.
27. Салменкова Е.А. Основные результаты и задачи популяционно-генетических исследований лососевых рыб / Е. А. Салменкова // Генетика в аквакультуре/Ред. ВС Кирпичников, Л. Наука – 1989. – 7–29с.
28. Сафронов С.Н. *Salvelinus vasiljevae* sp. nova-новый вид пресноводных гольцов (*Salmonidae*, *Salmoniformes*) северо-западного Сахалина / С. Н. Сафронов, Т. В. Звездов // Вопросы ихтиологии – 2005. – Т. 45 – № 6 – 737–748с.

29. Сафронов С.Н., Морфологическая характеристика и состояние популяции сахалинского тайменя (*Parahucho perryi*) реки Даги (Ныйский залив, о. Сахалин) / С.Н. Сафронов, П.С. Сухонос // Межрегиональная научно-практическая конференция «Экономические, социальные, правовые и экологические проблемы Охотского моря и пути их решения». 17-19 мая 2006г., г. Петропавловск-Камчатский

30. Семенченко А. Ю. Рыбы р. Самарга (Приморский край) / А.Ю. Семенченко// Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 2. Владивосток: Дальнаука. – 2003 - С. 337-354

31. Семенченко А. Ю. Эффективность воспроизводства сахалинского тайменя *Parahucho perryi* в реках Сахалина и стратегия его охраны / А.Ю. Семенченко, С.Ф. Золотухин // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 5. Владивосток: Дальнаука. – 2011 - С. 471-481

32. Скурихина Л.А. Внутривидовой полиморфизм мтДНК сахалинского тайменя *parahucho perryi* / Л.А. Скурихина, А.Г. Олейник, А.Д. Кухлевский, В.В. Маляр // Генетика. – 2013. – Т. 49. - №9. - С. 1065-1078

33. Соков Д. В. Сахалинский таймень *Hucho perryi* (Brevoort) острова Кунашир / Д.В. Соков // В сб.: Вестник Сахалинского музея. № 5, Ю-Сахалинск. - 1998. - С. 333-336

34. Соловьев А.В. Уникальное местонахождение миоценовых рыб на Сахалине / А. В. Соловьев, М. В. Назаркин // Вестник Сахалинского музея. Южно-Сахалинск – 1996. – № 3 – 343–352с.

35. Сухонос П. С Современное распространение и численность сибирского (*Hucho taimen*) и сахалинского (*Parahucho perryi*) тайменей острова Сахалин / П.С. Сухонос, С.Н. Сафронов // Изучение природных катастроф на Сахалине и Курильских островах, посв. 60-летию ИМГиГ. I(XIX) Межд. конф. молодых ученых (15–20 июня 2006 г ., Южно-Сахалинск): Тезисы докл. Южно-Сахалинск. С. 184–185

36. Таранец А.Я. Пресноводные рыбы бассейна северо-западной части Японского моря / А. Я. Таранец // Тр. ЗИН АН СССР – 1936. – Т. 4 – № 2 – 483–540с.
37. Федорчук В.В. Зимнее речное рыболовство нивхов Сахалина / В.В. Федорчук // Вестник Сахалинского музея: Ежегодник Государственного бюджетного учреждения культуры «Сахалинский областной краеведческий музей». Южно-Сахалинск. – 1998 - № 5 - С. 187-189.
38. Шитова М.В. Панель микросателлитных локусов для популяционных исследований сахалинского тайменя *parahucho perryi* (Brevoort) / М.В. Шитова, А.А. Юрченко, Е.Г. Шайхаев, Л.А. Животовский // Генетика. - 2012. - Т. 48. - № 8. - С. 976.
39. Afanas'ev K.I. Population structure of chum salmon *Oncorhynchus keta* in the Russian Far East, as revealed by microsatellite markers / K. I. Afanas'ev, G. a. Rubtsova, M. V. Shitova, T. V. Malinina, T. a. Rakitskaya, V. D. Prokhorovskaya, E. a. Shevlyakov, L. O. Zavarina, L. T. Bachevskaya, I. a. Chereshev, V. a. Brykov, M. Y. Kovalev, V. a. Shevlyakov, S. V. Sidorova, S. I. Borzov, V. P. Pogodin, L. K. Fedorova, L. a. Zhivotovsky // Russ. J. Mar. Biol. – 2011. – Т. 37 – № 1 – 42–51с.
40. Allendorf F.W. Conservation and genetics of salmonid fishes. // Conserv. Genet. case Hist. from nature. – 1996. – 238–280с.
41. Allendorf F.W. Conservation and the Genetics of Populations / F. W. Allendorf, G. Luikart – John Wiley & Sons, 2007.– 642с.
42. Altschul S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs / S. F. Altschul, T. L. Madden, A. a. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman // Nucleic Acids Res. – 1997. – Т. 25 – № 17 – 3389–3402с.
43. Arai T. Effect of salinity on strontium: Calcium ratios in the otoliths of Sakhalin taimen, *Hucho perryi* / T. Arai // Fish. Sci. – 2010. – Т. 76 – № 3 – 451–455с.
44. Avise J.C. Molecular Markers, Natural History and Evolution // – 1994.
45. Avise J.C. Phylogeography: the history and formation of species / J. C. Avise – Harvard university press, 2000.

46. Berthelot C. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates / C. Berthelot, F. Brunet, D. Chalopin, A. Juanchich, M. Bernard, B. Noël, P. Bento, C. Da Silva, K. Labadie, A. Alberti // *Nat. Commun.* – 2014. – T. 5.
47. Bickford D. Cryptic species as a window on diversity and conservation / D. Bickford, D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. L. Ng, R. Meier, K. Winker, K. K. Ingram, I. Das // *Trends Ecol. Evol.* – 2007. – T. 22 – № 3 – 148–155c.
48. Bochkov N.P. Our Mutation Load // *Hum. Genet.* – 1987. – 14–23c.
49. Bowcock a M. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. / a M. Bowcock, a Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J. R. Kidd, L. L. Cavalli-Sforza // *Nature* – 1994. – T. 368 – № 6470 – 455–457c.
50. Bowen B.W. Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. / B. W. Bowen // *Mol. Ecol.* – 1999. – T. 8 – № 12 Suppl 1 – S5–S10c.
51. Brykov V. a Erratic divergent evolution in fish from the Northern Pacific / V. a Brykov, a G. Oleĭnik, N. E. Poliakova, L. a Skurikhina, a V Semina, a V Polesnykh, a D. Kukhlevskii // *Genetika* – 2010. – T. 46 – № 7 – 967–973c.
52. Buchholz W.G. Isolation and characterization of chum salmon microsatellite loci and use across species / W. G. Buchholz, S. J. Miller, W. J. Spearman // *Anim. Genet.* – 2001. – T. 32 – № 3 – 162–165c.
53. Center A.F. A Generalized Approach for Estimating Effective Population Size From Temporal Changes in Allele Frequency / A. F. Center, N. M. F. Service, N. Oceanic // *Genetics* – 1989. – T. 121 – № 2 – 379–391c.
54. Cockerham C.C. Covariances of relatives stemming from a population undergoing mixed self and random mating. / C. C. Cockerham, B. S. Weir // *Biometrics* – 1984. – T. 40 – № 1 – 157–164c.
55. Coyne J.A. Speciation / J. A. Coyne, H. A. Orr – Sinauer Associates Sunderland, MA, 2004.
56. Craig J.L. Viable populations for conservation / J. L. Craig – Cambridge university press, 1990.– 310-312c.

57. Crane P. a. Characterization and inheritance of seven microsatellite loci from Dolly Varden, *Salvelinus malma*, and cross-species amplification in Arctic char, *S. alpinus* / P. a. Crane, C. J. Lewis, E. J. Kretschmer, S. J. Miller, W. J. Spearman, A. L. DeCicco, M. J. Lisac, J. K. Wenburg // *Conserv. Genet.* – 2004. – T. 5 – № 5 – 737–741c.
58. Crête-Lafrenière A. Framing the Salmonidae Family Phylogenetic Portrait: A More Complete Picture from Increased Taxon Sampling / A. Crête-Lafrenière, L. K. Weir, L. Bernatchez // *PLoS One* – 2012. – T. 7 – № 10 – e46662c.
59. Criscione C.D. Parasite phylogeographical congruence with salmon host evolutionarily significant units: Implications for salmon conservation / C. D. Criscione, M. S. Blouin // *Mol. Ecol.* – 2007. – T. 16 – № 5 – 993–1005c.
60. Crow J.F. Mutation Load // *Brenner's Encycl. Genet. Second Ed.* – 2013. – T. 4. – 546c.
61. Crow J.F. Mutation, mean fitness, and genetic load / J. F. Crow // *Oxford Surv. Evol. Biol.* – 1993. – T. 9 – 3–42c.
62. Crow J.F. The Rise and Fall of Overdominance // *Plant Breed. Rev.* – 1999. – 225–257c.
63. Culling M. Signatures of Selection on Growth, Shape, Parr Marks, and SNPs Among Seven Canadian Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Populations / M. Culling, H. Freamo, K. Patterson, P. R. Berg, S. Lien, E. G. Boulding // *Open Evol. J.* – 2013. – T. 7 – № 1 – 1–16c.
64. Culver M. Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). / M. Culver, W. E. Johnson, J. Pecon-Slattery, S. J. O'Brien // *J. Hered.* – 2000. – T. 91 – № 3 – 186–197c.
65. Cummings M.P. *PHYLIP (PHYLogeny Inference Package)* Wiley-Blackwell, 2004.
66. Dakin E.E. Microsatellite null alleles in parentage analysis. / E. E. Dakin, J. C. Avise // *Heredity (Edinb.)*. – 2004. – T. 93 – № 5 – 504–509c.

67. Dann T.H. Outbreeding Depression after Two Generations of Hybridizing Southeast Alaska Coho Salmon Populations? / T. H. Dann, W. W. Smoker, J. J. Hard, A. J. Gharrett // *Trans. Am. Fish. Soc.* – 2010. – T. 139 – № 5 – 1292–1305c.
68. Darriba D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing / D. Darriba, G. L. Taboada, R. Doallo, D. Posada // *Nat. Methods* – 2012. – T. 9 – № 8 – 772–772c.
69. Davey J.W. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. / J. W. Davey, P. a Hohenlohe, P. D. Etter, J. Q. Boone, J. M. Catchen, M. L. Blaxter // *Nat. Rev. Genet.* – 2011. – T. 12 – № 7 – 499–510c.
70. Dieringer D. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): A platform independent analysis tool for large microsatellite data sets / D. Dieringer, C. Schlötterer // *Mol. Ecol. Notes* – 2003. – T. 3 – № 1 – 167–169c.
71. Dionne M. Clinal variation in MHC diversity with temperature: Evidence for the role of host-pathogen interaction on local adaptation in Atlantic salmon / M. Dionne, K. M. Miller, J. J. Dodson, F. Caron, L. Bernatchez // *Evolution (N. Y.)*. – 2007. – T. 61 – № 9 – 2154–2164c.
72. Distance I.B.Y. Isolation by distance* / I. B. Y. Distance // *Genetics* – 1943. – T. 28 – № March – 114c.
73. Dizon A.E. Rethinking the Stock Concept: A Phylogeographic Approach / A. E. Dizon, C. Lockyer, W. F. Perrin, D. P. Demaster, J. Sisson // *Conserv. Biol.* – 1992. – T. 6 – № 1 – 24–36c.
74. Do C. NeEstimator v2: Re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data / C. Do, R. S. Waples, D. Peel, G. M. Macbeth, B. J. Tillett, J. R. Ovenden // *Mol. Ecol. Resour.* – 2014. – T. 14 – № 1 – 209–214c.
75. Dobson A. Ecology. Metalife! / A. Dobson // *Science* – 2003. – T. 301 – № 5639 – 1488–1490c.
76. Drummond A.J. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 / A. J. Drummond, M. a. Suchard, D. Xie, A. Rambaut // *Mol. Biol. Evol.* – 2012. – T. 29 – № 8 – 1969–1973c.

77. Dudash M. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations // *Genet. Demogr. Viability Fragm. Popul.* – 2000. – 35–53c.
78. Earl D. a. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D. a. Earl, B. M. vonHoldt // *Conserv. Genet. Resour.* – 2012. – T. 4 – № 2 – 359–361c.
79. Edo K. Morphology, stomach contents and growth of the endangered salmonid, Sakhalin taimen *Hucho perryi*, captured in the Sea of Okhotsk, northern Japan: Evidence of an anadromous form / K. Edo, Y. Kawaguchi, M. Nunokawa, H. Kawamura, S. Higashi // *Environ. Biol. Fishes* – 2005. – T. 74 – № 1 – 1–7c.
80. Eizirik E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae) / E. Eizirik, J. H. Kim, M. Menotti-Raymond, P. G. Crawshaw, S. J. O'Brien, W. E. Johnson // *Mol. Ecol.* – 2001. – T. 10 – № 1 – 65–79c.
81. Excoffier L. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data / L. Excoffier, P. Smouse, J. Quattro // *Genetics* – 1992. – T. 131 – № 2 – 479–491c.
82. Excoffier L. Arlequin 3.5: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis / L. Excoffier, H. Lischer // *Evol. Bioinform. Online* – 2011. – T. 1 – 47c.
83. Ferguson J. a. Mortality of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) associated with burdens of multiple parasite species / J. a. Ferguson, W. Koketsu, I. Ninomiya, P. a. Rossignol, K. C. Jacobson, M. L. Kent // *Int. J. Parasitol.* – 2011. – T. 41 – № 11 – 1197–1205c.
84. Forster P. Network 4.2. 0.1 / P. Forster, H. J. Bandelt, A. Röhl // *Softw. available Free* www.fluxus-engineering.com. Fluxus Technol. Ltda – 2004.
85. Fox C.W. Inbreeding depression increases with environmental stress: An experimental study and meta-analysis / C. W. Fox, D. H. Reed // *Evolution* (N. Y.). – 2011. – T. 65 – № 1 – 246–258c.

86. Frankham R. 50/500 rule and minimum viable populations: Response to Jamieson and Allendorf / R. Frankham, B. W. Brook, C. J. a Bradshaw, L. W. Traill, D. Spielman // *Trends Ecol. Evol.* – 2013. – T. 28 – № 4 – 187–188c.
87. Frankham R. Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses / R. Frankham, C. J. a Bradshaw, B. W. Brook // *Biol. Conserv.* – 2014. – T. 170 – 56–63c.
88. Frankham R. Inbreeding and extinction: A threshold effect / R. Frankham // *Conserv. Biol.* – 1995. – T. 9 – № 4 – 792–799c.
89. Frankham R. Predicci??n de la Depresi??n por Exog??mica / R. Frankham, J. D. Ballou, M. D. B. Eldridge, R. C. Lacy, K. Ralls, M. R. Dudash, C. B. Fenster // *Conserv. Biol.* – 2011. – T. 25 – № 3 – 465–475c.
90. Franklin I.R. Evolutionary change in small populations / I. R. Franklin, M. E. Soulé, B. a. Wilcox // *Conserv. Biol. an Evol. Perspect.* – 1980. – 135–149c.
91. Fraser D.J. Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units / D. J. Fraser, L. Bernatchez // *Mol. Ecol.* – 2001. – T. 10 – № 12 – 2741–2752c.
92. Fraser D.J. Extent and scale of local adaptation in salmonid fishes: review and meta-analysis. / D. J. Fraser, L. K. Weir, L. Bernatchez, M. M. Hansen, E. B. Taylor // *Heredity (Edinb).* – 2011. – T. 106 – № 3 – 404–420c.
93. Frazer K.K. Lack of parallel genetic patterns underlying the repeated ecological divergence of beach and stream-spawning kokanee salmon / K. K. Frazer, M. a. Russello // *J. Evol. Biol.* – 2013. – T. 26 – № 12 – 2606–2621c.
94. Froufe E. Phylogenetic analysis of the genus *Thymallus* (grayling) based on mtDNA control region and ATPase 6 genes, with inferences on control region constraints and broad-scale Eurasian phylogeography / E. Froufe, I. Knizhin, S. Weiss // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2005. – T. 34 – № 1 – 106–117c.
95. Fukushima M. Spawning migration and redd construction of Sakhalin taimen, *Huch perryi* (Salmonidae) on northern Hokkaido Island, Japan / M. Fukushima // *J. Fish Biol.* – 1994. – T. 44 – № 5 – 877–888c.

96. Funk D.J. Ecological divergence exhibits consistently positive associations with reproductive isolation across disparate taxa. / D. J. Funk, P. Nosil, W. J. Etges // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – T. 103 – № 9 – 3209–3213c.
97. Gavrilets S. *Fitness Landscapes and the Origin of Species* / S. Gavrilets – Princeton University Press Princeton, NJ, 2004.– 476c.
98. Gharrett A.J. Outbreeding depression in hybrids between odd- and even-broodyear pink salmon / A. J. Gharrett, W. W. Smoker, R. R. Reisenbichler, S. G. Taylor // *Aquaculture* – 1999. – T. 173 – № 1-4 – 117–129c.
99. Gilk S.E. Outbreeding depression in hybrids between spatially separated pink salmon, *Oncorhynchus gorbusha*, populations: Marine survival, homing ability, and variability in family size // *Environ. Biol. Fishes.* – 2004. – T. 69. – № 1-4. – 287–297c.
100. Goudet J. Testing differentiation in diploid populations / J. Goudet, M. Raymond, T. de Meeüs, F. Rousset // *Genetics* – 1996. – T. 144 – № 4 – 1933–1940c.
101. Griffiths A.M. Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturus batis*). / A. M. Griffiths, D. W. Sims, S. P. Cotterell, A. El Nagar, J. R. Ellis, A. Lynghammar, M. McHugh, F. C. Neat, N. G. Pade, N. Queiroz, B. Serra-Pereira, T. Rapp, V. J. Wearmouth, M. J. Genner // *Proc. Biol. Sci.* – 2010. – T. 277 – № 1687 – 1497–1503c.
102. Hammer Ø. *PAST-PAlaeontological STatistics*, ver. 1.89 / Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // Univ. Oslo, Oslo – 2009.
103. Hanski I. *Metapopulation Biology: Ecology, Genetics & Evolution* / I. Hanski, M. E. Gilpin – Academic Press, 1997.– 1-512c.
104. Harrison S. Empirical evidence for metapopulation dynamics // *Metapopulation Dyn. Empir. Theor. Investig.* – 1997. – 27–42c.
105. Hasegawa M. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA / M. Hasegawa, H. Kishino, T. A. Yano // *J. Mol. Evol.* – 1985. – T. 22 – № 2 – 160–174c.
106. Hatakeyama M. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci for endangered fish, Japanese huchen (*Hucho perryi*) / M. Hatakeyama, T. Watanabe,

M. Ikeda, M. Nakajima, H. Kawamura, N. Taniguchi // *Mol. Ecol. Notes* – 2005. – T. 5 – № 4 – 893–895c.

107. Hendry A.P. The speed of ecological speciation / A. P. Hendry, P. Nosil, L. H. Rieseberg // *Funct. Ecol.* – 2007. – T. 21 – № 3 – 455–464c.

108. Hilborn R. State of the world's fisheries / R. Hilborn, T. A. Branch, B. Ernst, A. Magnusson, C. V. Minte-Vera, M. D. Scheuerell, J. L. Valero // *Annu. Rev. Environ. Resour.* – 2003. – T. 28 – № 1 – 359c.

109. Hill W.G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium / W. G. Hill // *Genet. Res.* – 1981. – T. 38 – № 03 – 209c.

110. Hobbs R.J. Broadening the Extinction Debate: Population Deletions and Additions in California and Western Australia / R. J. Hobbs, H. a. Mooney // *Conserv. Biol.* – 2008. – T. 12 – № 2 – 271–283c.

111. Hocking M.D. Impacts of salmon on riparian plant diversity. / M. D. Hocking, J. D. Reynolds // *Science* – 2011. – T. 331 – № 6024 – 1609–1612c.

112. Hocking M.D. Spp.) Nutrients and Energy By Terrestrial Flies / M. D. Hocking, T. E. Reimchen // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 2006. – T. 63 – № 9 – 2076–2086c.

113. Holt R.D. How Does Immigration Influence Local Adaptation? A Reexamination of a Familiar Paradigm / R. D. Holt, R. Gomulkiewicz // *Am. Nat.* – 1997. – T. 149 – № 3 – 563c.

114. Honda K. Life history and migration of Sakhalin taimen, *Hucho perryi*, caught from Lake Akkeshi in eastern Hokkaido, Japan, as revealed by Sr:Ca ratios of otoliths / K. Honda, T. Arai, N. Takahashi, K. Miyashita // *Ichthyol. Res.* – 2010. – T. 57 – № 4 – 416–421c.

115. Honda K. Movement patterns of adult Sakhalin taimen, *Parahucho perryi*, between stream habitats of the Bekanbeushi River system, eastern Hokkaido, Japan / K. Honda, H. Kagiwada, N. Takahashi, K. Miyashita // *Ichthyol. Res.* – 2014. – T. 21 – № 4 – 1–10c.

116. Houde a. L.S. Reduced anti-predator responses in multi-generational hybrids of farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) / a. L. S. Houde, D. J. Fraser, J. a. Hutchings // *Conserv. Genet.* – 2010. – T. 11 – № 3 – 785–794c.
117. Hughes J.B. Population diversity: its extent and extinction. / J. B. Hughes, G. C. Daily, P. R. Ehrlich // *Science* – 1997. – T. 278 – № 5338 – 689–692c.
118. Huxley J. Systematics and the origin of Species: from the Viewpoint of a Zoologist / J. Huxley – Harvard University Press, 1943. – 347–348c.
119. Jackson T.R. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families / T. R. Jackson, M. M. Ferguson, R. G. Danzmann, A. G. Fishback, P. E. Ihssen, M. O’Connell, T. J. Crease // *Heredity (Edinb.)*. – 1998. – T. 80 – № 2 – 143–151c.
120. Jamieson I.G. A school of red herring: Reply to Frankham et al. / I. G. Jamieson, F. W. Allendorf // *Trends Ecol. Evol.* – 2013. – T. 28 – № 4 – 188–189c.
121. Jamieson I.G. How does the 50/500 rule apply to MVPs? / I. G. Jamieson, F. W. Allendorf // *Trends Ecol. Evol.* – 2012. – T. 27 – № 10 – 580–584c.
122. Johnson N. a The genetics of sex chromosomes: evolution and implications for hybrid incompatibility. / N. a Johnson, J. Lachance // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2012. – T. 1256 – № 1 – E1–22c.
123. Johnson W.E. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. / W. E. Johnson, E. Eizirik, J. Pecon-Slattery, W. J. Murphy, A. Antunes, E. Teeling, S. J. O’Brien // *Science* – 2006. – T. 311 – № 5757 – 73–77c.
124. Kalinowski S.T. Relationship of effective to census size in fluctuating populations / S. T. Kalinowski, R. S. Waples // *Conserv. Biol.* – 2002. – T. 16 – № 1 – 129–136c.
125. Karl S. a. Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: Molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*) / S. a. Karl, B. W. Bowen // *Conserv. Biol.* – 1999. – T. 13 – № 5 – 990–999c.
126. Kawamura H. The Japanese huchen, *Hucho perryi* (BREVOORT), collected in brackish water Lake Akkeshi, eastern Hokkaido, Japan / H. Kawamura, T. Yonekawa, M. Mabuchi // *Sci. Reports Hokkaido Fish Hatch.* – 1983.

127. Keefer M.L. Homing and straying by anadromous salmonids: A review of mechanisms and rates / M. L. Keefer, C. C. Caudill // *Rev. Fish Biol. Fish.* – 2014. – T. 24 – № 1 – 333–368c.

128. Kingman J.F.C. The coalescent / J. F. C. Kingman // *Stoch. Process. their Appl.* – 1982. – T. 13 – № 3 – 235–248c.

129. Kopun T. Eight new polymorphic microsatellite DNA markers for Sakhalin taimen *Parahucho perryi* / T. Kopun, K. a. Winkler, S. Weiss // *Conserv. Genet.* – 2009. – T. 10 – № 4 – 1089–1091c.

130. Lacy R.C. Effectiveness of selection in reducing the genetic load in populations of *Peromyscus polionotus* during generations of inbreeding / R. C. Lacy, J. D. Ballou // *Evolution (N. Y.)*. – 1998. – T. 52 – № 3 – 900–909c.

131. Larson W. a. Genotyping by sequencing resolves shallow population structure to inform conservation of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) / W. a. Larson, L. W. Seeb, M. V. Everett, R. K. Waples, W. D. Templin, J. E. Seeb // *Evol. Appl.* – 2014. – T. 7 – № 3 – 355–369c.

132. Larson W. a. Signals of heterogeneous selection at an MHC locus in geographically proximate ecotypes of sockeye salmon / W. a. Larson, J. E. Seeb, T. H. Dann, D. E. Schindler, L. W. Seeb // *Mol. Ecol.* – 2014. – T. 23 – № 22 – 5448–5461c.

133. Lee E. Paleo-Tsushima Water and its effect on surface water properties in the East Sea during the last glacial maximum: Revisited / E. Lee, S. Kim, S. Nam // *Quat. Int.* – 2008. – T. 176-177 – № C – 3–12c.

134. Lesica P. When are peripheral populations valuable for conservation? / P. Lesica, F. W. Allendorf // *Conserv. Biol.* – 1995. – T. 9 – № 4 – 753–760c.

135. Lester R.J.G. Parasites as valuable stock markers for fisheries in Australasia, East Asia and the Pacific Islands / R. J. G. Lester, B. R. Moore // *Parasitology* – 2015. – T. 142 – № 01 – 36–53c.

136. Levins R. Some Demographic and Gentic Consequences of Environmental Heterogeneity for Biological Control / R. Levins, R. Levins // *Bull. Entomol. Soc. Am.* – 1969. – T. 15 – № 3 – 237–240c.

137. Lewis P.O. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data // – 2001.
138. List W. IUCN Red List // – 2008. – T. 125. – № 4. – 980–983c.
139. Liu J.X. Effects of Pleistocene climatic fluctuations on the phylogeographic and demographic histories of Pacific herring (*Clupea pallasii*) / J. X. Liu, A. Tatarenkov, T. D. Beacham, V. Gorbachev, S. Wildes, J. C. Avise // *Mol. Ecol.* – 2011. – T. 20 – № 18 – 3879–3893c.
140. Luck G.W. Population diversity and ecosystem services / G. W. Luck, G. C. Daily, P. R. Ehrlich // *Trends Ecol. Evol.* – 2003. – T. 18 – № 7 – 331–336c.
141. Luikart G. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. / G. Luikart, P. R. England, D. Tallmon, S. Jordan, P. Taberlet // *Nat. Rev. Genet.* – 2003. – T. 4 – № 12 – 981–994c.
142. Marr A.B. Heterosis and Outbreeding Depression in Descendants of Natural Immigrants To an Inbred Population of Song Sparrows (*Melospiza Melodia*) / A. B. Marr, L. F. Keller, P. Arcese // *Evolution* (N. Y). – 2002. – T. 56 – № 1 – 131–142c.
143. Mattila a. L.K. PNAS Plus: High genetic load in an old isolated butterfly population / a. L. K. Mattila, a. Duplouy, M. Kirjokangas, R. Lehtonen, P. Rastas, I. Hanski // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2012. – T. 109 – № 37 – E2496–E2505c.
144. Matveev V. Novel SINE families from salmon validate Parahucho (*Salmonidae*) as a distinct genus and give evidence that SINEs can incorporate LINE-related 3' -tails of other SINEs / V. Matveev, H. Nishihara, N. Okada // *Mol. Biol. Evol.* - 2007. - T. 24 - № 8 – 1656–1666c.
145. Mayr E. Principles of Systematic Zoology / E. Mayr // *Syst. Zool.* – 1969. – T. 18 – № 2 – 428c.
146. Mayr E. Isolating mechanisms BT - Animal Species and Evolution / E. Mayr – Harvard University Press, 1963.
147. McGinnity P. Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. / P. McGinnity, P. Prodöhl, A. Ferguson, R. Hynes, N. O. Maoiléidigh, N.

Baker, D. Cotter, B. O’Hea, D. Cooke, G. Rogan, J. Taggart, T. Cross // *Proc. Biol. Sci.* – 2003. – T. 270 – № 1532 – 2443–2450c.

148. Menozzi P. Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans / P. Menozzi, a Piazza, L. Cavalli-Sforza // *Science* (80-). – 1978. – T. 201 – № 4358 – 786–792c.

149. Miller K.M. Mhc Diversity in Pacific Salmon: Population Structure and Trans-Species Allelism / K. M. Miller, R. E. Withler // *Hereditas* – 2004. – T. 127 – № 1-2 – 83–95c.

150. Miller M.R. A conserved haplotype controls parallel adaptation in geographically distant salmonid populations / M. R. Miller, J. P. Brunelli, P. a. Wheeler, S. Liu, C. E. Rexroad, Y. Palti, C. Q. Doe, G. H. Thorgaard // *Mol. Ecol.* – 2012. – T. 21 – № 2 – 237–249c.

151. Moritz C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. / C. Moritz // *Syst. Biol.* – 2002. – T. 51 – № 2 – 238–254c.

152. Morton N.E. Genetic Data Analysis. Methods for Discrete Population Genetic Data / N. E. Morton – Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1992.– 216c.

153. Nei M. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data - II. Gene frequency data / M. Nei, F. Tajima, Y. Tateno // *J. Mol. Evol.* – 1983. – T. 19 – № 2 – 153–170c.

154. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample of individuals / M. Nei // *Genetics* – 1978. – T. 89 – № 3 – 583–590c.

155. Nei M. Genetic Drift and Estimation of Effective Population Size / M. Nei, F. Tajima // *Genetics* – 1981. – T. 98 – № 3 – 625–640c.

156. Nelson R.J. Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon. / R. J. Nelson, T. D. Beacham // *Anim. Genet.* – 1999. – T. 30 – № 3 – 228–229c.

157. Novembre J. Genes mirror geography within Europe. / J. Novembre, T. Johnson, K. Bryc, Z. Kutalik, A. R. Boyko, A. Auton, A. Indap, K. S. King, S. Bergmann, M. R. Nelson, M. Stephens, C. D. Bustamante // *Nature* – 2008. – T. 456 – № 7218 – 98–101c.

158. Nuismer S.L. Gene flow and geographically structured coevolution / S. L. Nuismer, J. N. Thompson, R. Gomulkiewicz // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* – 1999. – T. 266 – № 1419 – 605c.

159. Nunney L. The effective size of annual plant populations: the interaction of a seed bank with fluctuating population size in maintaining genetic variation. / L. Nunney // *Am. Nat.* – 2002. – T. 160 – № 2 – 195–204c.

160. O’Grady J.J. Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations / J. J. O’Grady, B. W. Brook, D. H. Reed, J. D. Ballou, D. W. Tonkyn, R. Frankham // *Biol. Conserv.* – 2006. – T. 133 – № 1 – 42–51c.

161. Ohdachi S.D. Small mammals and a frog found in the stomach of a Sakhalin Taimen *Hucho perryi* (Brevoort) in Hokkaido / S. D. Ohdachi, Y. Seo // *Mammal Study* – 2004. – T. 29 – № 1 – 85–87c.

162. Olsen J.B. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from Pacific herring / J. B. Olsen, C. J. Lewis, E. J. Kretschmer, S. L. Wilson, J. E. Seeb // *Mol. Ecol. Notes* – 2002. – T. 2 – № 2 – 101–103c.

163. Orr H.A. Fitness and its role in evolutionary genetics. / H. A. Orr // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – T. 10 – № 8 – 531–539c.

164. Palstra F.P. Genetic estimates of contemporary effective population size: What can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? / F. P. Palstra, D. E. Ruzzante // *Mol. Ecol.* – 2008. – T. 17 – № 15 – 3428–3447c.

165. Peakall R. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update / R. Peakall, P. E. Smouse // *Bioinformatics* – 2012. – T. 28 – № 19 – 2537–2539c.

166. Peischl S. On the accumulation of deleterious mutations during range expansions / S. Peischl, I. Dupanloup, M. Kirkpatrick, L. Excoffier // *Mol. Ecol.* – 2013. – T. 22 – № 24 – 5972–5982c.

167. Phillips R. Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update. / R. Phillips, P. Ráb // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 2001. – T. 76 – № 1 – 1–25c.

168. Phillips R.B. Evidence supporting the paraphyly of *Hucho* (Salmonidae) based on ribosomal DNA restriction maps / R. B. Phillips, T. H. Oakley, E. L. Davis // *J. Fish Biol.* – 1995. – T. 47 – № 6 – 956–961c.

169. Posada D. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. / D. Posada, T. R. Buckley // *Syst. Biol.* – 2004. – T. 53 – № 5 – 793–808c.

170. Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data. / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics* – 2000. – T. 155 – № 2 – 945–959c.

171. Provan J. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia / J. Provan, K. D. Bennett // *Trends Ecol. Evol.* – 2008. – T. 23 – № 10 – 564–571c.

172. Queiroz K. De Species concepts and species delimitation. / K. De Queiroz // *Syst. Biol.* – 2007. – T. 56 – № 6 – 879–886c.

173. Rambaut a Tracer: a program for analysing results from Bayesian MCMC programs such as BEAST \& MrBayes // Website <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html>. – 2005.

174. Rambaut A. FigTree v1.3.1, Tree Figure Drawing Tool / A. Rambaut // Website <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> – 2009. – T. 2013 – № 05/17.

175. Raymond M. An Exact Test for Population Differentiation / M. Raymond, F. Rousset // *Evolution* (N. Y). – 1995. – T. 49 – № 6 – 1280–1283c.

176. Reed D.H. Fitness and adaptation in a novel environment: effect of inbreeding, prior environment, and lineage. / D. H. Reed, E. H. Lowe, D. a Briscoe, R. Frankham // *Evolution* – 2003. – T. 57 – № 8 – 1822–1828c.

177. Rexroad C.E. Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries. / C. E. Rexroad, R. L. Coleman, a L. Gustafson, W. K. Hershberger, J. Killefer // *Mar. Biotechnol.* (NY). – 2002. – T. 4 – № 1 – 12–16c.

178. Rice W.R. Analyzing Tables of Statistical Tests. / W. R. Rice // *Evolution* (N. Y). – 1989. – T. 43 – № 1 – 223–225.c.

179. Rieseberg L.H. Chromosomal rearrangements and speciation / L. H. Rieseberg // *Trends Ecol. Evol.* – 2001. – T. 16 – № 7 – 351–358c.

180. Rocha-Olivares a. Cryptic species of rockfishes (Sebastes: Scorpaenidae) in the Southern Hemisphere inferred from mitochondrial lineages / a. Rocha-Olivares, R. H. Rosenblatt, R. D. Vetter // *J. Hered.* – 1999. – T. 90 – № 3 – 404–411c.

181. Ronquist F. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models / F. Ronquist, J. P. Huelsenbeck // *Bioinformatics* – 2003. – T. 19 – № 12 – 1572–1574c.

182. Rousset F. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux / F. Rousset // *Mol. Ecol. Resour.* – 2008. – T. 8 – № 1 – 103–106c.

183. Rozas J. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods / J. Rozas, J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, R. Rozas // *Bioinformatics* – 2003. – T. 19 – № 18 – 2496–2497c.

184. Rundle H.D. Natural selection and parallel speciation in sympatric sticklebacks. / H. D. Rundle, L. Nagel, J. Wenrick Boughman, D. Schluter // *Science* – 2000. – T. 287 – № 5451 – 306–308c.

185. Ryder O. a. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies / O. a. Ryder // *Trends Ecol. Evol.* – 1986. – T. 1 – № 1 – 9–10c.

186. Salmenkova E. a. Population genetic differentiation of white-spotted char *Salvelinus leucomaenis* (Pallas) in Russian Far East / E. a. Salmenkova, V. T. Omelchenko, G. a. Rubtsova, K. I. Afanas'ev, N. S. Romanov, M. Y. Kovalev // *Russ. J. Genet.* – 2014. – T. 50 – № 1 – 45–54c.

187. Schenekar T. Fine-scale phylogeographic contact zone in Austrian brown trout *Salmo trutta* reveals multiple waves of post-glacial colonization and a predominance of natural versus anthropogenic admixture / T. Schenekar, E. Lerceteau-Köhler, S. Weiss // *Conserv. Genet.* – 2014. – T. 15 – № 3 – 561–572c.

188. Schtickzelle N. A metapopulation perspective for salmon and other anadromous fish / N. Schtickzelle, T. P. Quinn // *Fish Fish.* – 2007. – T. 8 – № 4 – 297–314c.

189. Sexton J.P. Genetic isolation by environment or distance: Which pattern of gene flow is most common? / J. P. Sexton, S. B. Hangartner, A. a. Hoffmann // *Evolution* (N. Y). – 2014. – T. 68 – № 1 – 1–15c.

190. Shed'ko S. Evolutionary and taxonomic relationships among Far-Eastern salmonid fishes inferred from mitochondrial DNA divergence / S. Shed'ko, S. Shed'ko, L. Ginatulina, L. Ginatulina, I. Parpura, I. Parpura, a V Ermolenko, a V Ermolenko // *J. Fish Biol.* – 1996. – T. 49 – № 5 – 815–829c.

191. Shedko S. V Complete mitochondrial genome of the endangered Sakhalin taimen *Parahucho perryi* (Salmoniformes, Salmonidae). / S. V Shedko, I. L. Miroshnichenko, G. a Nemkova // *Mitochondrial DNA* – 2013. – T. 1736 – № 4 – 1–2c.

192. Shen K.-N. Plio-Pleistocene sea level and temperature fluctuations in the northwestern Pacific promoted speciation in the globally-distributed flathead mullet *Mugil cephalus*. / K.-N. Shen, B. W. Jamandre, C.-C. Hsu, W.-N. Tzeng, J.-D. Durand // *BMC Evol. Biol.* – 2011. – T. 11 – № 1 – 83c.

193. Small M.P. Discriminating coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations within the Fraser River, British Columbia, using microsatellite DNA markers / M. P. Small, T. D. Beacham, R. E. Withler, R. J. Nelson // *Mol. Ecol.* – 1998. – T. 7 – № 2 – 141–155c.

194. Smith C.T. Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. / C. T. Smith, B. F. Koop, R. J. Nelson // *Mol. Ecol.* – 1998. – T. 7 – № 11 – 1614–1616c.

195. Smouse P.E. Multiple Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence / P. E. Smouse, J. C. Long, R. R. Sokal // *Syst. Zool.* – 1986. – T. 35 – № 4 – 627c.

196. Smouse P.E. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. / P. E. Smouse, R. Peakall // *Heredity* (Edinb). – 1999. – T. 82 (Pt 5) – № 5 – 561–573c.

197. Soul M.E. POPULATION GENETICS:Enhanced: No Need to Isolate Genetics / M. E. Soul // *Science* (80-.). – 1998. – T. 282 – № 5394 – 1658–1659c.

198. Soule M.E. Conservation biology. An evolutionary-ecological perspective. / M. E. Soule, B. A. Wilcox – Sinauer Associates, Inc., 1980.

199. Stapley J. Adaptation genomics: The next generation / J. Stapley, J. Reger, P. G. D. Feulner, C. Smadja, J. Galindo, R. Ekblom, C. Bennison, A. D. Ball, A. P. Beckerman, J. Slate // Trends Ecol. Evol. – 2010. – T. 25 – № 12 – 705–712c.

200. Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology / P. Sunnucks // Trends Ecol. Evol. – 2000. – T. 15 – № 5 – 199–203c.

201. Suzuki K. Migration history of Sakhalin taimen *Hucho perryi* captured in the Sea of Okhotsk, northern Japan, using otolith Sr:Ca ratios / K. Suzuki, T. Yoshitomi, Y. Kawaguchi, M. Ichimura, K. Edo, T. Otake // Fish. Sci. – 2011. – T. 77 – № 3 – 313–320c.

202. Takezaki N. Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA / N. Takezaki, M. Nei // Genetics – 1996. – T. 144 – № 1 – 389–399c.

203. Tamura K. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipowski, S. Kumar // Mol. Biol. Evol. – 2013. – T. 30 – № 12 – 2725–2729c.

204. Tang W. Cryptic species and historical biogeography of eel gobies (*Gobioidei: Odontamblyopus*) along the northwestern Pacific coast. / W. Tang, A. Lshimatsu, C. Fu, W. Yin, G. Li, H. Chen, Q. Wu, B. Li // Zoolog. Sci. – 2010. – T. 27 – № 1 – 8–13c.

205. Taylor P. Access details : Access Details : [subscription number 929715718] Transactions of the American Fisheries Society Reconstructing Sakhalin Taimen *Parahucho perryi* Historical Distribution and Identifying Causes for Local Extinctions Reconstructing Sakhalin / P. Taylor, P. S. Rand // Trans. Am. Fish. Soc. – 2011. – T. 140 – № 929715718 – 1–13c.

206. Templeton a R. The meaning of species and speciation: a genetic perspective / a R. Templeton // units Evol. Essays Nat. species – 1989. – 159–183c.

207. Templeton A.R. The reality and importance of founder speciation in evolution / A. R. Templeton // BioEssays – 2008. – T. 30 – № 5 – 470–479c.

208. Verspoor E. The Atlantic Salmon: Genetics, Conservation and Management / E. Verspoor, L. Stradmeyer, J. L. Nielsen – John Wiley & Sons, 2007.– 520c.
209. Vogler a. P. Diagnosing units of conservation management / a. P. Vogler, R. Desalle // *Conserv. Biol.* – 1994. – T. 8 – № 2 – 354–363c.
210. Vucetich J. a . Fluctuating Population Size and the Ratio of Effective to Census Population Size / J. a . Vucetich, T. a . Waite, L. Nunney // *Evolution* (N. Y). – 1997. – T. 51 – № 6 – 2017–2021c.
211. Wang I. a. Outbreeding effect on embryo development in hybrids of allopatric pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) populations, a potential consequence of stock translocation / I. a. Wang, S. E. Gilk, W. W. Smoker, A. J. Gharrett // *Aquaculture* – 2007. – T. 272 – № SUPPL. 1 – S152–S160c.
212. Waples R.S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci / R. S. Waples // *Conserv. Genet.* – 2006. – T. 7 – № 2 – 167–184c.
213. Waples R.S. Definition of “ Species ” Under the Endangered Species Act : Application to Pacific Salmon / R. S. Waples – 2014. – 1–16c.
214. Waples R.S. Effects of overlapping generations on linkage disequilibrium estimates of effective population size / R. S. Waples, T. Antao, G. Luikart // *Genetics* – 2014. – T. 197 – № 2 – 769–780c.
215. Waples R.S. Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: A largely untapped resource for applied conservation and evolution / R. S. Waples, C. Do // *Evol. Appl.* – 2010. – T. 3 – № 3 – 244–262c.
216. Waters J.M. Genes Meet Geology: Fish Phylogeographic Pattern Reflects Ancient, Rather Than Modern, Drainage Connections / J. M. Waters, D. Craw, J. H. Youngson, G. P. Wallis // *Evolution* (N. Y). – 2001. – T. 55 – № 9 – 1844–1851c.
217. Weber K.E. Increased Selection Response in Larger Populations - .1. Selection for Wing-Tip Height in *Drosophila-Melanogaster* at 3 Population Sizes / K. E. Weber // *Genetics* – 1990. – T. 125 – № 3 – 579–584c.

218. Weeks A.R. Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: A genetic perspective / A. R. Weeks, C. M. Sgro, A. G. Young, R. Frankham, N. J. Mitchell, K. a. Miller, M. Byrne, D. J. Coates, M. D. B. Eldridge, P. Sunnucks, M. F. Breed, E. a. James, A. a. Hoffmann // *Evol. Appl.* – 2011. – T. 4 – № 6 – 709–725c.
219. Weir B.S. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. / B. S. Weir, A. D. Anderson, A. B. Hepler // *Nat. Rev. Genet.* – 2006. – T. 7 – № 10 – 771–780c.
220. Weiss G.H. A Mathematical Analysis of the Stepping Stone Model of Genetic Correlation / G. H. Weiss, M. Kimura // *J. Appl. Probab.* – 1965. – T. 2 – № 1 – 129–149c.
221. White M.J.D. Chain Processes in Chromosomal Speciation / M. J. D. White // *Syst. Zool.* – 1978. – T. 27 – № 3 – 285c.
222. Whitlock M.C. Multiple Fitness Peaks and Epistasis / M. C. Whitlock, P. C. Phillips, F. B. Moore, S. J. Tonsor // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* – 1995. – T. 26 – № 1 – 601–629c.
223. Wiley E.O. The Evolutionary Species Concept Reconsidered / E. O. Wiley // *Syst. Zool.* – 1978. – T. 27 – № 1 – 17–26c.
224. Willi Y. Limits to the Adaptive Potential of Small Populations / Y. Willi, J. Van Buskirk, A. a. Hoffmann // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* – 2006. – T. 37 – № 1 – 433–458c.
225. Wold, Svante; Esbensen, Kim; Geladi P. *Principal Component Analysis* Wiley-Blackwell, 1987. – 37–52c.
226. Wright S. Tempo and Mode in Evolution: A Critical Review / S. Wright // *Ecology* – 1945. – T. 26 – № 4 – 415–419c.
227. Wu C.I. The genic view of the process of speciation / C. I. Wu // *J. Evol. Biol.* – 2001. – T. 14 – № 6 – 851–865c.
228. Yamashiro S. Age_and Growth of the Ito (Hucho Perryi) in Northeastern Hokkaido / S. Yamashiro // *Nippon Suisan Gakkaishi* – 1965. – T. 31 – № 1 – 1–7c.

229. Yu J.-N. Population genetic structure and phylogeography of masu salmon (*Oncorhynchus masou masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. / J.-N. Yu, N. Azuma, M. Yoon, V. Brykov, S. Urawa, M. Nagata, D.-H. Jin, S. Abe // *Zoolog. Sci.* – 2010. – T. 27 – № 5 – 375–385c.

230. Zaykin D. Exact tests for association between alleles at arbitrary numbers of loci / D. Zaykin, L. Zhivotovsky, B. S. Weir // *Genetica* – 1995. – T. 96 – № 1-2 – 169–178c.

231. Zimmerman C.E. Migration of Sakhalin taimen (*Parahucho perryi*): Evidence of freshwater resident life history types / C. E. Zimmerman, P. S. Rand, M. Fukushima, S. F. Zolotukhin // *Environ. Biol. Fishes* – 2012. – T. 93 – № 2 – 223–232c.

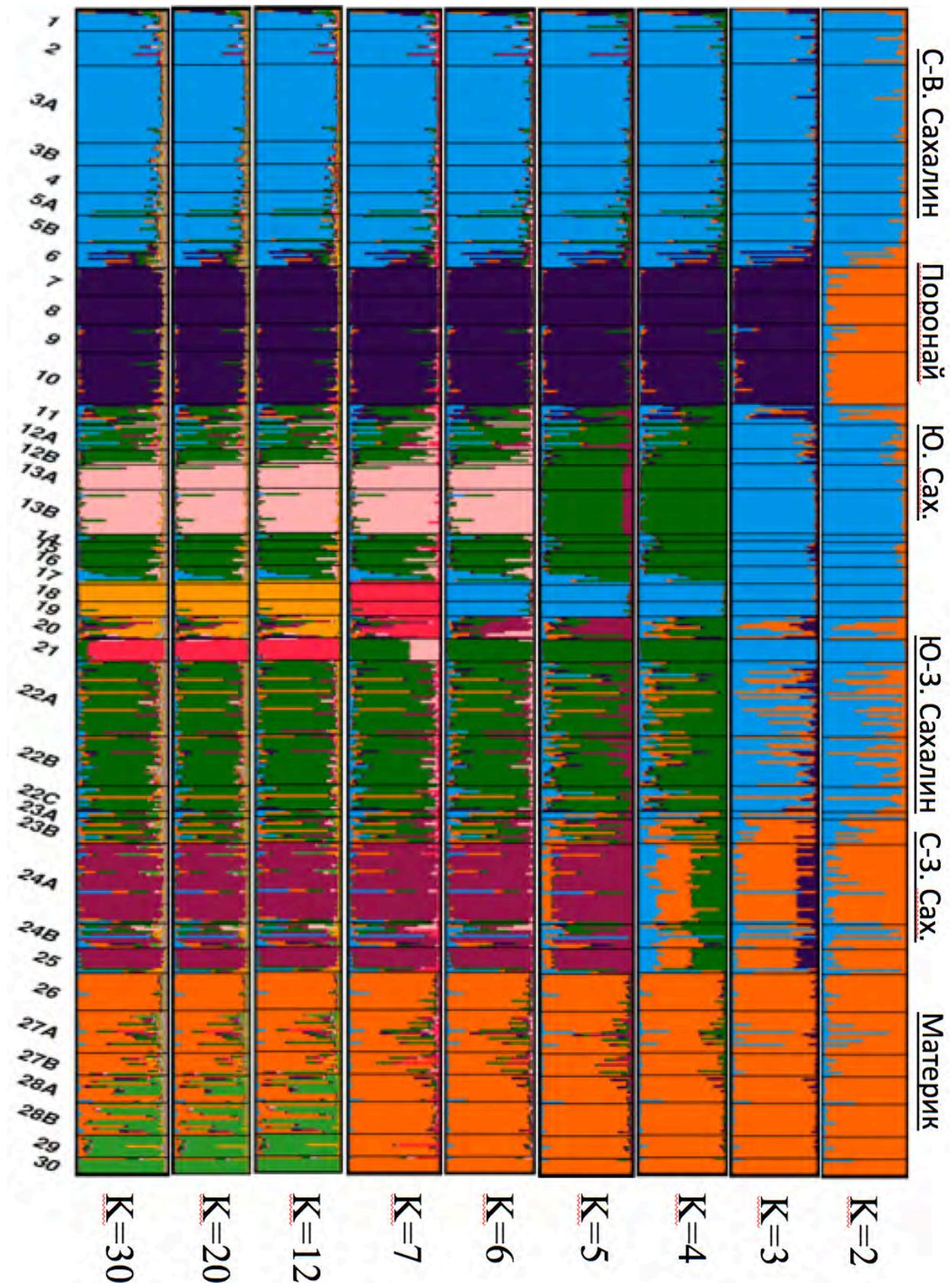
232. Zimmerman C.E. Relationship of otolith strontium-to-calcium ratios and salinity: experimental validation for juvenile salmonids / C. E. Zimmerman // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 2005. – T. 62 – № 1 – 88–97c.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Информация о выборках, положенных в основу работы.

Местоположение	Код выборки	Число проб	Дата	Ткань	Сборщик
Река Пильтун	1	8	1997-1999	чешуя	Сергей Сафронов
Река Вал	2	14	Август 3-4, 2011	плавник	Андрей Юрченко, Дмитрий Диденко
Река Даги	3А	31	Сентябрь. 13-21, 2009	плавник	Анатолий Семенченко, Дмитрий Диденко, Андрей Юрченко, Лев Животовский
Залив Даги	3В	9	Июнь, 2005	чешуя	Сергей Сафронов
Река Тымь	4	11	Июль 31, 2011	плавник	Андрей Юрченко, Дмитрий Диденко
Река Набиль	5А	9	Сентябрь 11, 1999	плавник	Бронов
	5В	11	Октябрь, 2009	плавник	Дмитрий Диденко
Река Лангери	6	10	Сентябрь 9-11, 2011	плавник	Дмитрий Диденко, Лев Животовский
Река Поронай	7	11	Июнь - Октябрь, 2008	плавник	Дмитрий Диденко
Река Онорка	8	12	Август, 2010	плавник	Андрей Юрченко, Анатолий Семенченко, С.Ф. Золотухин
Река Брусничная	9	11	Сентябрь 19, 2009	плавник	Сергей Сафронов
Река Ельная	10	21	Август, 2010	плавник	Андрей Юрченко, Анатолий Семенченко, С.Ф. Золотухин
Озеро Невское	11	8	Ноябрь 4, 2006	чешуя	Сергей Сафронов
Озеро Тунайча	12А	10	2006	чешуя	Сергей Сафронов
	12В	6	Май, 2012	плавник	Владимир Самарский
Озеро Вавайское	13А	10	2005	чешуя	Сергей Сафронов
	13В	18	Сентябрь, 1999	плавник	Сергей Сафронов
Река Урюм	14	3	Август, 2011	плавник	Сергей Макеев, Андрей Юрченко
Река Ульяновка	15А	4	Июль, 2011	плавник	Сергей Макеев, Андрей Юрченко
	15В	7	2001	чешуя	Сергей Сафронов
Река Могучи	16	6	Октябрь, 2011	плавник	Сергей Макеев
Озеро Лебединое	17	7	2011	плавник	Виктор погодин
Река Куйбышевка	18	7	Сентябрь 16-19, 2010	плавник	Сергей Борзов, Лев Животовский
Озеро Валентины	19	6	1998	чешуя	Дмитрий Соков
Река Сарафуцу	20	9	2006	плавник	Мишио Фукусима
Озеро Тайное	21	9	Октябрь, 2013	плавник	Алексей Гайбулатов, Сергей Макеев, Лев Животовский
Озеро Айнское	22А	30	Сентябрь, 2010	плавник	Анатолий Семенченко, Андрей Юрченко, Лев Животовский
	22В	20	2002	чешуя	Сергей Сафронов

Приложение 3. Апостериорные вероятности принадлежности особей сахалинского тайменя к выявленным популяционным кластерам для различного числа возможных популяций (K). Номера выборок указаны в соответствии с обозначениями на Рисунке 2.1.1.



Приложение 4. Попарный тест гетерогенности между выборками на основе 10000 бутстреп-репликаций.

Пары выборок		95% мин.	Среднее значение θ (аналог Fst)	95% макс.
1	2	0.016723	0.049411	0.085396
1	3A	0.013434	0.037222	0.063270
1	3B	0.022609	0.064595	0.119301
1	4	0.089692	0.181144	0.287234
1	5A	0.007811	0.060653	0.126867
1	5B	0.013300	0.054127	0.101031
1	6	0.084648	0.145480	0.217873
1	7	0.060312	0.131453	0.215838
1	8	0.166489	0.238244	0.320905
1	9	0.062387	0.105879	0.159174
1	10	0.067121	0.131883	0.204076
1	11	0.026663	0.082500	0.146672
1	12A	0.038958	0.087250	0.141941
1	12B	0.071102	0.131806	0.199124
1	13A	0.103145	0.165384	0.232349
1	13B	0.094572	0.136491	0.181860
1	14	0.015838	0.092648	0.191651
1	15A	0.061595	0.128524	0.206834
1	15B	0.050085	0.124999	0.205440
1	16	0.067812	0.125342	0.198381
1	17	0.184768	0.282400	0.388299
1	18	0.130540	0.211367	0.296768
1	19	0.047871	0.099690	0.156750
1	20	0.050460	0.113376	0.185465
1	21	0.096046	0.166502	0.244233
1	22A	0.030414	0.060403	0.093224
1	22B	0.019220	0.051029	0.085312
1	22C	0.036253	0.069898	0.105539
1	23A	0.047912	0.103487	0.161351
1	23B	0.062664	0.099749	0.138245
1	24A	0.087480	0.129737	0.175925
1	24B	0.014058	0.057876	0.108637
1	25	0.071988	0.129749	0.194132
1	26	0.066347	0.110603	0.155934
1	27A	0.056426	0.089101	0.121585
1	27B	0.056651	0.119137	0.198603
1	28A	0.060173	0.095063	0.128626
1	28B	0.071106	0.130602	0.192758
1	29	0.116875	0.192610	0.271100
1	30	0.206244	0.308212	0.412458
2	3A	0.017535	0.033422	0.049268
2	3B	0.019909	0.047539	0.082984
2	4	0.064408	0.129853	0.210503
2	5A	0.027596	0.059894	0.101561
2	5B	0.017466	0.044705	0.073624
2	6	0.039613	0.093321	0.154256
2	7	0.082930	0.152494	0.234462
2	8	0.144987	0.218979	0.305004
2	9	0.069256	0.110843	0.155554
2	10	0.085236	0.140529	0.202586
2	11	0.031476	0.063338	0.098018
2	12A	0.069836	0.115947	0.169742
2	12B	0.077886	0.138519	0.208046
2	13A	0.080915	0.129208	0.180367
2	13B	0.079504	0.116843	0.158372
2	14	-0.007909	0.059091	0.129670
2	15A	0.062934	0.120548	0.183613
2	15B	0.074326	0.136606	0.203474
2	16	0.064808	0.126309	0.191712
2	17	0.153268	0.243921	0.343760
2	18	0.097749	0.163090	0.235333
2	19	0.039108	0.089455	0.139097
2	20	0.036127	0.077033	0.126545
2	21	0.099718	0.163250	0.229991

2	22A	0.031442	0.052915	0.074458
2	22B	0.034872	0.060091	0.087446
2	22C	0.042282	0.076489	0.111363
2	23A	0.028367	0.076154	0.126949
2	23B	0.042128	0.076118	0.115828
2	24A	0.066183	0.102109	0.141831
2	24B	0.038421	0.073151	0.114873
2	25	0.071334	0.107329	0.144996
2	26	0.060158	0.097005	0.134793
2	27A	0.046454	0.081865	0.118755
2	27B	0.052674	0.095442	0.149581
2	28A	0.083245	0.112559	0.142055
2	28B	0.079357	0.137116	0.199997
2	29	0.121731	0.195474	0.276525
2	30	0.218811	0.311322	0.412472
3A	3B	-0.007099	0.011283	0.033074
3A	4	0.073610	0.141137	0.217477
3A	5A	0.025620	0.062199	0.108702
3A	5B	0.016284	0.044065	0.074970
3A	6	0.063930	0.114433	0.167463
3A	7	0.078834	0.153411	0.240093
3A	8	0.148144	0.213669	0.286872
3A	9	0.065996	0.119559	0.182901
3A	10	0.067621	0.135192	0.215524
3A	11	0.041378	0.099531	0.167136
3A	12A	0.060652	0.120162	0.189923
3A	12B	0.048347	0.126200	0.214338
3A	13A	0.097782	0.161813	0.235572
3A	13B	0.071189	0.127432	0.193195
3A	14	0.020771	0.097604	0.185583
3A	15A	0.073482	0.147020	0.235260
3A	15B	0.050814	0.131425	0.219619
3A	16	0.057626	0.121945	0.201936
3A	17	0.148354	0.227445	0.315144
3A	18	0.106255	0.174222	0.246495
3A	19	0.059593	0.123351	0.198538
3A	20	0.061781	0.119136	0.187041
3A	21	0.088776	0.152154	0.221655
3A	22A	0.035003	0.071909	0.113110
3A	22B	0.028896	0.063508	0.105892
3A	22C	0.031426	0.074973	0.123317
3A	23A	-0.001570	0.050033	0.105456
3A	23B	0.072875	0.111826	0.149926
3A	24A	0.090590	0.131746	0.176741
3A	24B	0.052556	0.096120	0.143270
3A	25	0.091954	0.153166	0.219416
3A	26	0.066438	0.125388	0.190771
3A	27A	0.057360	0.104190	0.155658
3A	27B	0.080797	0.145906	0.226045
3A	28A	0.056337	0.110892	0.171227
3A	28B	0.074342	0.149693	0.231420
3A	29	0.088351	0.188077	0.293803
3A	30	0.164532	0.282037	0.408153
3B	4	0.052436	0.096262	0.143193
3B	5A	-0.007574	0.014668	0.037630
3B	5B	-0.014376	0.003170	0.023908
3B	6	0.047218	0.083618	0.122831
3B	7	0.077339	0.135555	0.196504
3B	8	0.151583	0.214605	0.279422
3B	9	0.062187	0.101071	0.141133
3B	10	0.067532	0.118869	0.173820
3B	11	0.012019	0.048860	0.090265
3B	12A	0.040565	0.104013	0.182075
3B	12B	0.037826	0.088381	0.147436
3B	13A	0.064157	0.116881	0.174365
3B	13B	0.047303	0.091949	0.142001
3B	14	0.023727	0.089407	0.167022

3B	15A	0.075372	0.137290	0.205531	5A	12B	0.016632	0.072054	0.139063
3B	15B	0.036238	0.100318	0.167720	5A	13A	0.058074	0.109239	0.167453
3B	16	0.042333	0.079631	0.118613	5A	13B	0.056391	0.102112	0.152636
3B	17	0.147435	0.214413	0.291189	5A	14	-0.016667	0.043793	0.119254
3B	18	0.085496	0.157618	0.232446	5A	15A	0.049625	0.109525	0.181858
3B	19	0.044733	0.096300	0.153669	5A	15B	0.010537	0.077249	0.150029
3B	20	0.060758	0.108472	0.167625	5A	16	0.006216	0.054509	0.110768
3B	21	0.119160	0.177571	0.245064	5A	17	0.100915	0.188364	0.284199
3B	22A	0.017019	0.040629	0.066650	5A	18	0.072512	0.142625	0.219548
3B	22B	0.015348	0.048387	0.087644	5A	19	0.011937	0.070692	0.141629
3B	22C	0.014558	0.046659	0.082702	5A	20	0.032110	0.083503	0.144240
3B	23A	-0.031828	0.018074	0.069421	5A	21	0.096873	0.165290	0.240311
3B	23B	0.034374	0.087706	0.164702	5A	22A	0.011540	0.042316	0.077019
3B	24A	0.087062	0.143561	0.208812	5A	22B	0.023858	0.060688	0.105342
3B	24B	0.022260	0.074239	0.138765	5A	22C	0.024137	0.061121	0.105333
3B	25	0.089738	0.158800	0.238474	5A	23A	-0.029928	0.020055	0.077553
3B	26	0.063281	0.111678	0.164007	5A	23B	0.016769	0.081290	0.166462
3B	27A	0.043816	0.081116	0.124648	5A	24A	0.058785	0.116525	0.182163
3B	27B	0.079595	0.123529	0.172480	5A	24B	0.005784	0.071238	0.151669
3B	28A	0.039737	0.084209	0.134275	5A	25	0.056693	0.135253	0.230218
3B	28B	0.071095	0.121172	0.175350	5A	26	0.053234	0.105105	0.166088
3B	29	0.080146	0.156997	0.240783	5A	27A	0.031890	0.079942	0.136532
3B	30	0.157192	0.254425	0.355504	5A	27B	0.042237	0.091252	0.147538
4	5A	0.038476	0.086811	0.138755	5A	28A	0.039334	0.089149	0.150642
4	5B	0.048947	0.099493	0.153380	5A	28B	0.039835	0.097992	0.164974
4	6	0.073136	0.130625	0.200697	5A	29	0.080384	0.157936	0.245965
4	7	0.157736	0.236801	0.323677	5A	30	0.152889	0.261671	0.374308
4	8	0.193589	0.297437	0.401266	5B	6	0.014453	0.062689	0.117598
4	9	0.106628	0.172544	0.247741	5B	7	0.057141	0.114437	0.181012
4	10	0.123474	0.196958	0.275250	5B	8	0.122118	0.191979	0.270123
4	11	0.024216	0.088119	0.166806	5B	9	0.043454	0.071732	0.098864
4	12A	0.094444	0.173196	0.257882	5B	10	0.055827	0.100005	0.145859
4	12B	0.083372	0.162649	0.250876	5B	11	-0.005265	0.023662	0.059555
4	13A	0.062654	0.133099	0.219451	5B	12A	0.026223	0.072719	0.135369
4	13B	0.100400	0.157723	0.224620	5B	12B	0.010580	0.051660	0.101836
4	14	0.073648	0.181997	0.302331	5B	13A	0.041697	0.090125	0.140624
4	15A	0.105265	0.190654	0.286864	5B	13B	0.042468	0.075745	0.113534
4	15B	0.119547	0.209103	0.301038	5B	14	-0.016401	0.043078	0.120805
4	16	0.075540	0.154970	0.245360	5B	15A	0.061666	0.109052	0.158767
4	17	0.109884	0.196358	0.288461	5B	15B	0.015059	0.068843	0.128459
4	18	0.073089	0.157543	0.247458	5B	16	0.023762	0.056608	0.091144
4	19	0.067449	0.150552	0.248225	5B	17	0.141282	0.206935	0.277978
4	20	0.069809	0.135567	0.210847	5B	18	0.083857	0.153841	0.227330
4	21	0.230682	0.323370	0.414573	5B	19	0.021164	0.062621	0.107611
4	22A	0.058359	0.113511	0.178082	5B	20	0.033514	0.081387	0.134589
4	22B	0.076454	0.139294	0.209770	5B	21	0.096653	0.151128	0.220720
4	22C	0.064118	0.137467	0.224411	5B	22A	0.010970	0.026636	0.043667
4	23A	0.052149	0.109498	0.170842	5B	22B	0.010270	0.038052	0.070809
4	23B	0.045839	0.122288	0.233050	5B	22C	0.013011	0.036943	0.060901
4	24A	0.135262	0.183864	0.237282	5B	23A	-0.030492	0.015591	0.062341
4	24B	0.080706	0.155337	0.249057	5B	23B	0.016910	0.066413	0.134377
4	25	0.089190	0.169604	0.276129	5B	24A	0.081955	0.120419	0.161936
4	26	0.113633	0.192366	0.280524	5B	24B	0.017564	0.059275	0.112749
4	27A	0.080499	0.131959	0.196538	5B	25	0.082952	0.136600	0.199367
4	27B	0.085364	0.154184	0.235702	5B	26	0.029375	0.070325	0.114633
4	28A	0.104295	0.166142	0.234841	5B	27A	0.038063	0.070163	0.105461
4	28B	0.097086	0.167774	0.242402	5B	27B	0.047969	0.086893	0.130417
4	29	0.134131	0.220889	0.314220	5B	28A	0.040047	0.078422	0.119062
4	30	0.220335	0.321696	0.426666	5B	28B	0.055734	0.104407	0.158405
5A	5B	-0.018451	-0.006585	0.006460	5B	29	0.078615	0.144467	0.217786
5A	6	0.034763	0.081606	0.137729	5B	30	0.147645	0.239921	0.337773
5A	7	0.060739	0.129013	0.210840	6	7	0.058162	0.104203	0.154491
5A	8	0.112200	0.188750	0.272127	6	8	0.106224	0.165517	0.234377
5A	9	0.051747	0.088094	0.131576	6	9	0.049575	0.093044	0.145784
5A	10	0.064988	0.125372	0.192596	6	10	0.060607	0.100207	0.145641
5A	11	-0.000538	0.041841	0.091295	6	11	0.007719	0.049666	0.106414
5A	12A	0.013772	0.084541	0.173889	6	12A	0.072052	0.151301	0.241961

6	12B	0.054448	0.117693	0.193144
6	13A	0.097084	0.151378	0.214360
6	13B	0.089622	0.138121	0.193947
6	14	0.015031	0.088199	0.183970
6	15A	0.075698	0.134917	0.203669
6	15B	0.067648	0.124321	0.183217
6	16	0.018890	0.077657	0.161695
6	17	0.150310	0.236240	0.327183
6	18	0.147897	0.213276	0.281867
6	19	0.065736	0.119522	0.178477
6	20	0.067823	0.113484	0.164002
6	21	0.160578	0.244486	0.335315
6	22A	0.028782	0.068536	0.114696
6	22B	0.052016	0.092878	0.137048
6	22C	0.029775	0.074014	0.123472
6	23A	0.015367	0.062558	0.114023
6	23B	0.058689	0.100615	0.146683
6	24A	0.078257	0.151329	0.243094
6	24B	0.037402	0.100045	0.176788
6	25	0.084772	0.149851	0.225666
6	26	0.079141	0.120868	0.163155
6	27A	0.053821	0.092016	0.133647
6	27B	0.061418	0.119437	0.187798
6	28A	0.061097	0.104048	0.149470
6	28B	0.088975	0.142816	0.203404
6	29	0.100018	0.160182	0.224001
6	30	0.188514	0.256706	0.327300
7	8	0.031507	0.076787	0.132389
7	9	0.034198	0.067883	0.107720
7	10	0.020059	0.056199	0.094386
7	11	0.043599	0.091696	0.148415
7	12A	0.082044	0.165252	0.262597
7	12B	0.098589	0.157397	0.223903
7	13A	0.143807	0.210933	0.278511
7	13B	0.116135	0.175497	0.237562
7	14	0.048260	0.128269	0.214554
7	15A	0.077649	0.135154	0.192802
7	15B	0.030240	0.101747	0.179645
7	16	0.070968	0.108562	0.144156
7	17	0.235886	0.322274	0.412893
7	18	0.175417	0.252346	0.335542
7	19	0.058621	0.127233	0.204771
7	20	0.084722	0.139423	0.205193
7	21	0.175051	0.262824	0.353836
7	22A	0.052582	0.104196	0.168768
7	22B	0.051769	0.101540	0.160325
7	22C	0.037559	0.087631	0.144910
7	23A	0.048032	0.120426	0.198714
7	23B	0.093784	0.155630	0.224064
7	24A	0.102460	0.193696	0.302998
7	24B	0.056393	0.122348	0.203770
7	25	0.098883	0.181921	0.279416
7	26	0.091020	0.145345	0.206294
7	27A	0.081341	0.137928	0.203765
7	27B	0.091579	0.155895	0.232558
7	28A	0.081342	0.132073	0.186331
7	28B	0.099414	0.166411	0.240269
7	29	0.111275	0.183387	0.257718
7	30	0.156378	0.256503	0.362690
8	9	0.074446	0.126048	0.190572
8	10	0.052075	0.127619	0.223637
8	11	0.086816	0.163830	0.255866
8	12A	0.152068	0.254548	0.377297
8	12B	0.136570	0.235096	0.352914
8	13A	0.194766	0.286468	0.387695
8	13B	0.152303	0.236937	0.335932
8	14	0.189227	0.262009	0.337082

8	15A	0.110277	0.195825	0.301337
8	15B	0.087409	0.192072	0.318442
8	16	0.112583	0.192107	0.286556
8	17	0.290436	0.402723	0.522909
8	18	0.244129	0.335273	0.432219
8	19	0.138440	0.237098	0.335677
8	20	0.140246	0.219478	0.308350
8	21	0.253520	0.346478	0.445784
8	22A	0.100366	0.163773	0.234609
8	22B	0.104563	0.172043	0.250709
8	22C	0.101557	0.173175	0.255978
8	23A	0.132014	0.245291	0.372253
8	23B	0.141538	0.227628	0.320496
8	24A	0.143355	0.251446	0.377467
8	24B	0.098044	0.195014	0.317976
8	25	0.169852	0.270511	0.391318
8	26	0.120235	0.193506	0.282417
8	27A	0.115588	0.195136	0.291177
8	27B	0.132363	0.216056	0.314940
8	28A	0.130383	0.196140	0.267409
8	28B	0.140062	0.232029	0.330950
8	29	0.160411	0.256102	0.359449
8	30	0.193319	0.326037	0.472586
9	10	0.009344	0.040489	0.075849
9	11	0.010492	0.037725	0.068335
9	12A	0.060255	0.107750	0.156692
9	12B	0.029945	0.083402	0.156743
9	13A	0.104627	0.150756	0.205220
9	13B	0.081228	0.125885	0.176312
9	14	0.044882	0.109117	0.181884
9	15A	0.037573	0.076447	0.115429
9	15B	0.014455	0.066586	0.120412
9	16	0.030091	0.066877	0.104891
9	17	0.176654	0.253222	0.334766
9	18	0.142499	0.201010	0.268374
9	19	0.058191	0.092155	0.126273
9	20	0.071977	0.104321	0.136771
9	21	0.118083	0.182610	0.251466
9	22A	0.026929	0.052257	0.080460
9	22B	0.022231	0.044451	0.068866
9	22C	0.025045	0.056450	0.088856
9	23A	0.014863	0.086386	0.166271
9	23B	0.062395	0.106100	0.158708
9	24A	0.094322	0.143282	0.199533
9	24B	0.052290	0.086787	0.124488
9	25	0.094625	0.144244	0.202475
9	26	0.051010	0.085915	0.123135
9	27A	0.071563	0.091312	0.112728
9	27B	0.044438	0.077862	0.114718
9	28A	0.055350	0.092415	0.130023
9	28B	0.065171	0.120629	0.184902
9	29	0.076730	0.154536	0.239895
9	30	0.147384	0.242635	0.346594
10	11	0.029794	0.079390	0.132857
10	12A	0.079912	0.151649	0.231926
10	12B	0.037656	0.111293	0.203585
10	13A	0.131531	0.196888	0.260660
10	13B	0.111842	0.162108	0.212343
10	14	0.100698	0.166804	0.238980
10	15A	0.041773	0.099012	0.162397
10	15B	0.006877	0.083494	0.165482
10	16	0.035196	0.095455	0.160536
10	17	0.192430	0.290513	0.389444
10	18	0.155744	0.239280	0.333258
10	19	0.078404	0.143009	0.208908
10	20	0.074462	0.123959	0.175495
10	21	0.161041	0.243364	0.326438

10	22A	0.056127	0.097695	0.143548
10	22B	0.039424	0.081546	0.124923
10	22C	0.042516	0.092442	0.148521
10	23A	0.043275	0.119727	0.204284
10	23B	0.116187	0.162909	0.214071
10	24A	0.115412	0.182898	0.263607
10	24B	0.062212	0.109138	0.159454
10	25	0.122800	0.182561	0.245943
10	26	0.065576	0.117096	0.171313
10	27A	0.074784	0.115559	0.157131
10	27B	0.082079	0.127737	0.179083
10	28A	0.075715	0.120114	0.165379
10	28B	0.079955	0.149390	0.225835
10	29	0.084685	0.171015	0.262941
10	30	0.141813	0.250604	0.367247
11	12A	-0.001148	0.051124	0.115439
11	12B	-0.019782	0.011501	0.045733
11	13A	0.011513	0.051943	0.095576
11	13B	0.027290	0.058819	0.092759
11	14	-0.031893	0.006665	0.043108
11	15A	-0.005835	0.047752	0.108228
11	15B	-0.019053	0.051024	0.129453
11	16	-0.033217	-0.004199	0.024765
11	17	0.141430	0.212341	0.284358
11	18	0.082030	0.137334	0.203734
11	19	-0.008552	0.025647	0.059379
11	20	0.008146	0.043372	0.086342
11	21	0.093594	0.173778	0.263704
11	22A	-0.017501	-0.002318	0.015943
11	22B	-0.012112	0.017335	0.060099
11	22C	-0.020514	0.008952	0.055881
11	23A	-0.039918	0.016178	0.080015
11	23B	0.007900	0.043966	0.087470
11	24A	0.054347	0.112053	0.178749
11	24B	0.008748	0.051177	0.102249
11	25	0.029276	0.085781	0.152152
11	26	0.042278	0.080451	0.121772
11	27A	0.019397	0.049688	0.085576
11	27B	0.015903	0.034577	0.054843
11	28A	0.029815	0.072958	0.120634
11	28B	0.046308	0.099891	0.158366
11	29	0.071322	0.143113	0.218097
11	30	0.137948	0.234661	0.334524
12A	12B	0.008370	0.064305	0.145858
12A	13A	0.052094	0.099380	0.149370
12A	13B	0.040610	0.081224	0.126103
12A	14	0.046242	0.141896	0.256365
12A	15A	0.054135	0.094871	0.139648
12A	15B	0.020271	0.098758	0.186511
12A	16	0.010728	0.086669	0.179998
12A	17	0.136072	0.232764	0.340495
12A	18	0.137058	0.191301	0.246710
12A	19	0.027249	0.070745	0.117536
12A	20	0.084278	0.139222	0.213156
12A	21	0.105317	0.185106	0.277559
12A	22A	0.015245	0.050906	0.094068
12A	22B	0.023062	0.053248	0.087526
12A	22C	0.012129	0.068970	0.136529
12A	23A	0.031179	0.121521	0.222885
12A	23B	0.050933	0.106125	0.165987
12A	24A	0.052123	0.100680	0.156058
12A	24B	0.017096	0.052898	0.092287
12A	25	0.052495	0.116158	0.185872
12A	26	0.070549	0.108818	0.152680
12A	27A	0.045251	0.069755	0.096057
12A	27B	0.059585	0.098935	0.139726
12A	28A	0.046631	0.086756	0.127849

12A	28B	0.063473	0.112169	0.162873
12A	29	0.096106	0.163951	0.234951
12A	30	0.107722	0.221058	0.345558
12B	13A	0.033128	0.078114	0.124796
12B	13B	0.025252	0.062741	0.103355
12B	14	0.025295	0.104939	0.189313
12B	15A	0.035593	0.108843	0.192023
12B	15B	0.020813	0.078658	0.136388
12B	16	-0.029568	0.014907	0.071098
12B	17	0.160567	0.245555	0.337212
12B	18	0.139167	0.198091	0.261575
12B	19	0.045227	0.100414	0.160775
12B	20	0.061660	0.115634	0.173600
12B	21	0.134762	0.230932	0.338264
12B	22A	-0.001083	0.034918	0.079117
12B	22B	0.010834	0.054049	0.106317
12B	22C	0.023015	0.044753	0.068731
12B	23A	-0.001350	0.057004	0.120086
12B	23B	0.036064	0.087056	0.142435
12B	24A	0.078982	0.127676	0.183177
12B	24B	0.031184	0.064413	0.098135
12B	25	0.094239	0.150914	0.214696
12B	26	0.038062	0.102593	0.188038
12B	27A	0.010912	0.055196	0.103967
12B	27B	0.030883	0.076342	0.136150
12B	28A	0.032362	0.082764	0.142404
12B	28B	0.036788	0.099253	0.169217
12B	29	0.073339	0.154816	0.243037
12B	30	0.133550	0.237694	0.346025
13A	13B	-0.015396	-0.001223	0.015404
13A	14	0.030846	0.093702	0.163172
13A	15A	0.085897	0.153031	0.222177
13A	15B	0.093796	0.162912	0.238939
13A	16	0.047539	0.098978	0.155318
13A	17	0.174857	0.248662	0.320472
13A	18	0.121349	0.204818	0.295212
13A	19	0.053207	0.100142	0.153905
13A	20	0.055183	0.119302	0.192664
13A	21	0.183662	0.260371	0.345589
13A	22A	0.033274	0.064607	0.098290
13A	22B	0.040501	0.090226	0.147845
13A	22C	0.050316	0.103206	0.162582
13A	23A	0.054363	0.105175	0.157078
13A	23B	0.062933	0.117806	0.186198
13A	24A	0.098883	0.145119	0.192404
13A	24B	0.056044	0.108453	0.166929
13A	25	0.085862	0.160429	0.244089
13A	26	0.082275	0.135397	0.190334
13A	27A	0.044788	0.092011	0.142160
13A	27B	0.064264	0.103088	0.143940
13A	28A	0.090229	0.137690	0.187678
13A	28B	0.090853	0.145798	0.203629
13A	29	0.120732	0.188540	0.260031
13A	30	0.184731	0.279325	0.377270
13B	14	0.052355	0.116360	0.189537
13B	15A	0.083706	0.138335	0.195980
13B	15B	0.057033	0.125311	0.199197
13B	16	0.037945	0.079822	0.126147
13B	17	0.162864	0.229164	0.289058
13B	18	0.156132	0.212512	0.271635
13B	19	0.063463	0.108729	0.154964
13B	20	0.063425	0.113672	0.169081
13B	21	0.155212	0.212822	0.277662
13B	22A	0.029465	0.056750	0.088353
13B	22B	0.035610	0.069293	0.109200
13B	22C	0.036771	0.074851	0.117921
13B	23A	0.024633	0.080099	0.135317

13B	23B	0.062092	0.114284	0.170450
13B	24A	0.086180	0.131959	0.181149
13B	24B	0.055990	0.092477	0.133111
13B	25	0.096024	0.155201	0.220419
13B	26	0.068902	0.105143	0.143653
13B	27A	0.048737	0.088130	0.128988
13B	27B	0.071068	0.099746	0.129798
13B	28A	0.075196	0.117861	0.160786
13B	28B	0.086011	0.137831	0.192380
13B	29	0.103673	0.170671	0.248199
13B	30	0.157464	0.244417	0.340291
14	15A	0.043679	0.125034	0.212762
14	15B	0.020810	0.120718	0.238675
14	16	-0.021306	0.030422	0.082864
14	17	0.282131	0.380355	0.485845
14	18	0.128391	0.211641	0.300373
14	19	0.008461	0.073626	0.144993
14	20	0.063252	0.121727	0.179416
14	21	0.098264	0.213059	0.341052
14	22A	-0.025004	0.017059	0.074180
14	22B	0.000145	0.072334	0.160158
14	22C	-0.004990	0.055944	0.145587
14	23A	0.009411	0.113812	0.225207
14	23B	0.021385	0.087792	0.158678
14	24A	0.109486	0.189927	0.283684
14	24B	0.009589	0.102519	0.216647
14	25	0.106330	0.186845	0.281326
14	26	0.050998	0.118427	0.193855
14	27A	0.039317	0.094661	0.152983
14	27B	0.035064	0.102093	0.175454
14	28A	0.070005	0.134580	0.209896
14	28B	0.102506	0.168674	0.235652
14	29	0.136710	0.222925	0.315007
14	30	0.278617	0.372762	0.470684
15A	15B	0.024258	0.102368	0.188995
15A	16	0.000919	0.065755	0.138681
15A	17	0.200557	0.314904	0.431763
15A	18	0.144406	0.218729	0.298693
15A	19	0.036721	0.095563	0.160829
15A	20	0.049244	0.111939	0.188185
15A	21	0.124534	0.236101	0.353973
15A	22A	0.042576	0.079383	0.122912
15A	22B	0.031556	0.078014	0.129931
15A	22C	0.051349	0.101893	0.158687
15A	23A	0.035288	0.121899	0.214730
15A	23B	0.094722	0.148988	0.209299
15A	24A	0.094185	0.163484	0.244099
15A	24B	0.026343	0.065339	0.104771
15A	25	0.078681	0.148494	0.228452
15A	26	0.065694	0.112966	0.171526
15A	27A	0.023176	0.067408	0.120555
15A	27B	0.017946	0.064681	0.120007
15A	28A	0.054916	0.103476	0.157731
15A	28B	0.070611	0.135059	0.206383
15A	29	0.100587	0.184038	0.271893
15A	30	0.145841	0.261181	0.382888
15B	16	-0.015475	0.032029	0.080733
15B	17	0.226045	0.297432	0.371664
15B	18	0.172723	0.232117	0.294453
15B	19	0.028750	0.113882	0.205720
15B	20	0.052930	0.120890	0.193070
15B	21	0.127758	0.216532	0.317167
15B	22A	0.005074	0.067899	0.144823
15B	22B	0.003989	0.062703	0.129318
15B	22C	-0.001289	0.062998	0.138981
15B	23A	-0.005513	0.091522	0.196221
15B	23B	0.062192	0.131060	0.204413
15B	24A	0.075141	0.155792	0.250636
15B	24B	-0.000819	0.043127	0.091400
15B	25	0.083259	0.152205	0.225024
15B	26	0.056180	0.120749	0.188808
15B	27A	0.031428	0.075551	0.126930
15B	27B	0.057409	0.107394	0.158952
15B	28A	0.051731	0.111347	0.176653
15B	28B	0.076781	0.138689	0.199479
15B	29	0.091796	0.172958	0.252160
15B	30	0.130406	0.247358	0.358274
16	17	0.182411	0.273219	0.360472
16	18	0.143740	0.210881	0.279021
16	19	0.023788	0.074992	0.129442
16	20	0.050475	0.095972	0.142258
16	21	0.115541	0.200764	0.289380
16	22A	0.006212	0.027547	0.050355
16	22B	0.022985	0.054621	0.088247
16	22C	0.006286	0.041149	0.079534
16	23A	-0.015195	0.050635	0.132292
16	23B	0.055367	0.106010	0.163743
16	24A	0.070632	0.146561	0.243863
16	24B	0.052085	0.092703	0.136661
16	25	0.070777	0.147938	0.233325
16	26	0.081798	0.125776	0.171540
16	27A	0.032873	0.076284	0.123292
16	27B	0.021433	0.071301	0.127487
16	28A	0.054455	0.100103	0.150834
16	28B	0.067996	0.129822	0.194462
16	29	0.080664	0.160812	0.243311
16	30	0.126197	0.229381	0.341970
17	18	0.160481	0.252982	0.347427
17	19	0.192472	0.272514	0.360823
17	20	0.128843	0.208223	0.292050
17	21	0.313946	0.420313	0.526392
17	22A	0.119554	0.184508	0.249284
17	22B	0.138763	0.200838	0.265227
17	22C	0.167959	0.224959	0.290426
17	23A	0.171854	0.250058	0.337506
17	23B	0.144646	0.234173	0.342054
17	24A	0.127290	0.199779	0.270198
17	24B	0.118191	0.203318	0.300268
17	25	0.147153	0.246555	0.359314
17	26	0.175437	0.265245	0.364309
17	27A	0.106829	0.178521	0.258494
17	27B	0.156025	0.241795	0.332345
17	28A	0.151564	0.225829	0.304198
17	28B	0.141182	0.216481	0.295034
17	29	0.192153	0.269716	0.352533
17	30	0.266818	0.374386	0.479916
18	19	0.134169	0.208823	0.289180
18	20	0.125860	0.188023	0.251488
18	21	0.229082	0.340835	0.462361
18	22A	0.092969	0.142823	0.195728
18	22B	0.096504	0.164166	0.238656
18	22C	0.106519	0.173419	0.251072
18	23A	0.112945	0.202613	0.296569
18	23B	0.114751	0.189411	0.275302
18	24A	0.154873	0.206264	0.265564
18	24B	0.102660	0.166324	0.237089
18	25	0.118327	0.201433	0.297157
18	26	0.170866	0.237779	0.317807
18	27A	0.106457	0.147454	0.187976
18	27B	0.127317	0.189477	0.256886
18	28A	0.127090	0.184913	0.245198
18	28B	0.119461	0.184688	0.252295
18	29	0.158575	0.248945	0.338997
18	30	0.287146	0.389880	0.499195

19	20	0.064461	0.114274	0.164107	22B	25	0.049993	0.099862	0.155533
19	21	0.156872	0.247429	0.338049	22B	26	0.035635	0.062322	0.091999
19	22A	0.001232	0.025677	0.050820	22B	27A	0.027628	0.054878	0.085300
19	22B	0.014867	0.043758	0.078458	22B	27B	0.021211	0.059551	0.111261
19	22C	0.009637	0.041398	0.073134	22B	28A	0.019992	0.049605	0.080254
19	23A	0.033750	0.107335	0.188506	22B	28B	0.036243	0.085539	0.142846
19	23B	0.040426	0.084428	0.135329	22B	29	0.048258	0.116995	0.193397
19	24A	0.107022	0.163566	0.224749	22B	30	0.111402	0.205951	0.306183
19	24B	0.026771	0.082078	0.145593	22C	23A	-0.028601	0.032168	0.104134
19	25	0.101444	0.157727	0.225325	22C	23B	0.011918	0.051991	0.102907
19	26	0.061777	0.107304	0.154860	22C	24A	0.070214	0.139782	0.218713
19	27A	0.040705	0.082952	0.128435	22C	24B	0.016894	0.062432	0.119362
19	27B	0.060571	0.103051	0.148873	22C	25	0.075741	0.142149	0.216032
19	28A	0.061597	0.104137	0.146724	22C	26	0.042806	0.073929	0.114017
19	28B	0.071195	0.133769	0.197502	22C	27A	0.029125	0.064182	0.104911
19	29	0.103000	0.171758	0.244942	22C	27B	0.051094	0.096619	0.149198
19	30	0.192380	0.291082	0.395494	22C	28A	0.020386	0.061637	0.106936
20	21	0.160425	0.246749	0.336487	22C	28B	0.048483	0.102010	0.161291
20	22A	0.030022	0.058356	0.089795	22C	29	0.053419	0.126967	0.205430
20	22B	0.017676	0.057094	0.106799	22C	30	0.133869	0.227450	0.325175
20	22C	0.045182	0.087999	0.138621	23A	23B	-0.038151	0.026672	0.119431
20	23A	0.031126	0.072501	0.113851	23A	24A	0.037210	0.114039	0.215328
20	23B	0.052363	0.092031	0.137669	23A	24B	-0.045243	0.033551	0.141363
20	24A	0.065163	0.098154	0.132128	23A	25	0.079449	0.158667	0.252749
20	24B	0.034388	0.076026	0.122271	23A	26	0.053106	0.112668	0.180433
20	25	0.062172	0.105927	0.152617	23A	27A	-0.005850	0.031915	0.070045
20	26	0.074190	0.123762	0.176659	23A	27B	0.040595	0.087509	0.136249
20	27A	0.025351	0.064522	0.109734	23A	28A	-0.024438	0.024429	0.074100
20	27B	0.034310	0.064353	0.094195	23A	28B	-0.007155	0.036579	0.078253
20	28A	0.047552	0.096600	0.155441	23A	29	-0.012236	0.053765	0.120652
20	28B	0.049241	0.103584	0.163976	23A	30	0.103324	0.179507	0.257567
20	29	0.091766	0.162514	0.238907	23B	24A	0.047481	0.100112	0.162738
20	30	0.179011	0.275277	0.375380	23B	24B	0.009664	0.055007	0.118890
21	22A	0.080268	0.131466	0.192399	23B	25	0.046418	0.091888	0.145519
21	22B	0.070698	0.124474	0.186453	23B	26	0.053287	0.092105	0.142039
21	22C	0.089270	0.151997	0.219954	23B	27A	0.020850	0.056186	0.093544
21	23A	0.185870	0.275535	0.370725	23B	27B	0.041115	0.083905	0.129649
21	23B	0.156143	0.220891	0.288270	23B	28A	0.026635	0.059001	0.095879
21	24A	0.153124	0.222419	0.298324	23B	28B	0.037838	0.090882	0.157461
21	24B	0.112363	0.178120	0.254492	23B	29	0.060693	0.124290	0.200243
21	25	0.185796	0.266754	0.352504	23B	30	0.149972	0.234532	0.331788
21	26	0.139564	0.202693	0.271184	24A	24B	0.023977	0.057143	0.091485
21	27A	0.123313	0.189688	0.261561	24A	25	-0.012844	0.006240	0.033229
21	27B	0.133989	0.220896	0.314297	24A	26	0.100352	0.125866	0.151836
21	28A	0.154880	0.216359	0.285072	24A	27A	0.041220	0.066697	0.093669
21	28B	0.173522	0.253482	0.337835	24A	27B	0.047600	0.080195	0.120867
21	29	0.232358	0.317143	0.405177	24A	28A	0.062305	0.102148	0.150813
21	30	0.296238	0.418678	0.536014	24A	28B	0.073717	0.106068	0.140884
22A	22B	-0.005788	0.004284	0.015825	24A	29	0.110078	0.169559	0.236613
22A	22C	-0.008634	0.002664	0.014239	24A	30	0.124327	0.213955	0.324643
22A	23A	-0.028063	0.015450	0.061957	24B	25	0.009108	0.041642	0.080654
22A	23B	0.003002	0.032343	0.067440	24B	26	0.042659	0.075980	0.111653
22A	24A	0.048942	0.087770	0.132652	24B	27A	0.013428	0.032339	0.052315
22A	24B	0.021348	0.051538	0.090105	24B	27B	0.016612	0.052851	0.095034
22A	25	0.045230	0.087506	0.132578	24B	28A	0.022352	0.052542	0.091458
22A	26	0.034505	0.058205	0.083047	24B	28B	0.033352	0.077144	0.125676
22A	27A	0.028678	0.053969	0.081249	24B	29	0.063337	0.120291	0.180807
22A	27B	0.026093	0.048473	0.072797	24B	30	0.111497	0.194414	0.283810
22A	28A	0.024712	0.053189	0.083849	25	26	0.108643	0.146745	0.187047
22A	28B	0.036018	0.082184	0.136472	25	27A	0.045627	0.077702	0.112735
22A	29	0.060077	0.121938	0.189861	25	27B	0.045105	0.090072	0.141638
22A	30	0.125279	0.209148	0.297493	25	28A	0.082435	0.122450	0.164449
22B	22C	-0.012213	-0.000960	0.011774	25	28B	0.083765	0.138021	0.199758
22B	23A	-0.025245	0.024940	0.081186	25	29	0.127747	0.205385	0.291769
22B	23B	0.019420	0.055232	0.096593	25	30	0.154471	0.264530	0.385792
22B	24A	0.048860	0.091347	0.140392	26	27A	0.014926	0.044687	0.078632
22B	24B	0.016687	0.045881	0.080584	26	27B	0.015873	0.046242	0.083094

