

УДК 575:597.553.2

## МЕЖРЕГИОНАЛЬНАЯ И МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЧАСТОТ ГАПЛОТИПОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК КЕТЫ (*ONCORHYNCHUS KETA*) АЗИИ

В. А. Савин, Н. Ю. Шпигальская, Н. В. Варнавская



Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии  
683000 Петропавловск-Камчатский, Набережная, 18  
Тел., факс: (415-2) 41-27-01; (415-22) 5-25-92  
E-mail: savin@kamniro.ru, shpigalskaya@kamniro.ru, varnavskaya@kamniro.ru

### КЕТА, МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК, ГАПЛОТИПЫ, ДИВЕРГЕНЦИЯ

Проанализированы частоты 32 гаплотипов, выявленных на основе изменчивости контрольной области мтДНК кеты Азии и Северной Америки. Приведены результаты оценки гаплотипического и нуклеотидного разнообразия в популяциях и региональных популяционных комплексах. Дана характеристика географического распределения частот гаплотипов на видовом ареале и определены наиболее дискриминирующие из них. Вычислены генетические расстояния, являющиеся количественной оценкой межпопуляционной дифференциации, на основе которых выполнено многомерное шкалирование, дающее пространственное отображение картин дивергенции в системе координат комплексных факторов. Показано, что изменчивость контрольной области мтДНК является достаточно информативным генетическим маркером, что определяет возможность использования полученных данных в целях идентификации популяционной принадлежности смешанных морских выборов.

## INTERREGIONAL AND INTERPOPULATION VARIATIONS OF CHUM SALMON (*ONCORHYNCHUS KETA*) MITOCHONDRIAL DNA HAPLOTYPE FREQUENCIES IN ASIA

V. A. Savin, N. Yu. Shpigalskaya, N. V. Varnavskaya

Kamchatka Research Institute of Fisheries and Oceanography  
683000 Petropavlovsk-Kamchatsky, Naberejnaya, 18  
Tel., fax: (415-2) 41-27-01; (415-22) 5-25-92  
E-mail: savin@kamniro.ru, shpigalskaya@kamniro.ru, varnavskaya@kamniro.ru

### CHUM SALMON, MITOCHONDRIAL DNA, HAPLOTYPE, DIVERGENCE

The frequencies of 32 haplotypes revealed on the base of variations within the control region of the mtDNA of Asian and North American chum salmon are analyzed. The results of the assessment of the haplotype and nucleotide diversity in the populations and regional population complexes are demonstrated. The characterization of the geographical distribution of the haplotype frequencies is provided for the area inhabited by this species, and the most discriminating frequencies are found. The genetical distances which are the quantitative measure for the interpopulation differentiation and the ground base for making the multi-dimensional scaling, providing the spatial image of divergence in the system of the coordinates of the complex factors, are calculated. The variations in the control region of the mtDNA are demonstrated to be a quite informative genetic marker, what creates the possibility to use the data obtained for the purposes of the identification of the population membership in the mixed marine samples.

Из всех видов тихоокеанских лососей кета имеет наиболее обширный ареал, границы которого простираются вдоль азиатского побережья на юг до северной Японии и Кореи и на север до устья р. Лена (Берг, 1948). В Северной Америке границы ареала проходят от арктического побережья до рек зал. Монтерей (Salo, 1991). Зрелые особи кеты, также как и других тихоокеанских лососей, возвращаются в родные реки для нереста. Эта особенность жизненного цикла (хоминг), вероятно, является одной из основных причин значительной изоляции и генетической неоднородности региональных групп популяций. Оценка уровня генетической

изменчивости между и внутри совокупностей локальных стад важна как для понимания современного состояния и эволюции вида, так и для выявления путей миграций и состава смешанных морских и прибрежных уловов.

До недавнего времени в исследованиях популяционно-генетических различий кеты в качестве маркеров использовали аллельные частоты полиморфных белковых генов (Kondzela et al., 1994, 2002; Phelps et al., 1994; Wilmot et al., 1994, 1999; Макоедов и др., 1995; Алтухов и др., 1997; Seeb et al., 1997; Urawa et al., 1998, 2000, 2004, 2005; Seeb, Crane, 1999; Варнавская, 2001, 2002, 2006; Шпи-

гальская и др., 2005). В последние десятилетия значительное развитие получили методы, основанные на изменчивости структуры ДНК митохондрией (мтДНК) и ядра клеток.

Митохондриальная ДНК — замкнутая кольцевая молекула, содержащая обычно не более 20 000 пар нуклеотидов (Динамика популяционных генофондов..., 2004). При определении полной нуклеотидной последовательности мтДНК у позвоночных, в том числе и у рыб рода *Oncorhynchus*, обнаружены 37 структурных генов (2 рибосомальных гена, 22 гена транспортных РНК, 13 генов, кодирующих белки) и некодирующая контрольная область, участвующая в репликации и называемая D-петлей (Ferris, Berg, 1987; Thomas, Beckenbach, 1989).

Митохондриальная ДНК является гаплоидной и наследуется только по материнской линии. Несмотря на то, что мтДНК содержит более 30 различных генов, с позиций формальной генетики она рассматривается как один локус, а гаплотипы мтДНК — как аллели этого локуса. Соответственно, эффективный размер популяции для мтДНК равен  $1/4$  аналогичной оценки для ядерных генов (Nei, Tajima, 1981), что в значительной степени обуславливает изменчивость мтДНК в результате случайного дрейфа генов и эффекта «горлышка бутылки» при резком сокращении численности популяции (Динамика популяционных генофондов..., 2004). Кроме того, следует отметить, что скорость нуклеотидных замен в митохондриальном геноме в 5–10 раз выше, чем в ядерной ДНК (Moritz et al., 1987), в связи с чем степень дивергенции мтДНК, будучи обусловленной более интенсивными мутационным процессом и дрейфом, вероятно, выше, чем у ядерных аллозимных генов. Скорость нуклеотидных замен в среднем в молекуле мтДНК разных организмов составляет 1–2% нуклеотидных замен за 1 млн лет (Brown et al., 1979; Ferris et al., 1983; Avise, 1994).

Благодаря описанным выше особенностям, полиморфизм мтДНК широко и успешно используется в исследованиях, посвященных эволюции и филогении (Avise, 1994, 2000; Брыков, 2001; Гречко, 2002; и т. д.), при анализе популяционной структуры и исторической филогеографии вида (Полякова и др., 1996; Seeb et al., 1998; Брыков и др., 1999а, б; Брыков, 2001; Churikov et al., 2001; Gharrett et al., 2001; Churikov, Gharrett, 2002; и т. д.).

На современном этапе популяционно-генетических исследований митохондриального генома тихоокеанских лососей широко используется метод анализа полиморфизма длины рестриктных фрагментов (ПДРФ-анализ) (Брыков, 2001; Чуриков,

2001; и т. д.), при котором изменчивость ДНК, обусловленная заменой отдельных оснований или инсерциями и делециями, проявляется в конечном счете в том, что особи отличаются друг от друга типами рестрикционных фрагментов (Dowling et al., 1990).

В настоящее время разработан метод экспресс-анализа структуры контрольной области мтДНК (Moriya et al., 2002, 2005; Yoon et al., 2004, 2005), при котором применяется microarray-метод анализа единичных нуклеотидных замен с использованием синтезированных олигонуклеотидов длиной 14–31 оснований, каждый из которых содержит предварительно выявленный полиморфный единичный нуклеотидный вариант. Недавние исследования структуры контрольной области мтДНК кеты на основе microarray-метода выявили большую информативность данного подхода, по сравнению с применявшимся ранее ПДРФ-анализом (Sato et al., 2001), что позволяет предположить перспективность его использования при анализе структуры мтДНК как информативного маркера межпопуляционной дифференциации.

Вышеизложенное позволило определить цель настоящей работы — оценить уровень полиморфизма контрольной области мтДНК кеты и возможность использования результатов исследования для популяционно-генетического анализа морских скоплений и идентификации региональных групп популяций в период нагульных и нерестовых миграций.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для настоящего исследования послужили данные от особей из 16 выборок (15 нативных популяций) кеты северной части Дальнего Востока (Камчатка, Чукотка, материковое побережье Охотского моря). Все пробы были собраны на путях нерестовых миграций и нерестилищах рек сотрудниками КамчатНИРО, а одна выборка (р. Охота) была любезно предоставлена коллегами из Хабаровского отделения ТИНРО (рис. 1, табл. 1). Образцы ткани сердечной мышцы извлекали из свежельвовленных рыб и фиксировали в жидком азоте или низкотемпературных холодильниках. Кроме того, в качестве фиксатора использовали этиловый спирт.

Для достижения цели исследования были привлечены литературные данные, охватывающие популяции о. Сахалин, Приморья, Магадана, Курильских о-вов, бассейна р. Амур, Японии, Кореи, Аляски, Британской Колумбии и штатов Вашингтон и Орегон (табл. 1).

Лабораторная обработка материала проводилась в Университете Хоккайдо (г. Хакодате, Япо-



Рис. 1. Локализация сбора проб кеты северной части Дальнего Востока

ния) (Laboratory of Breeding Science, Division of Marine Biosciences Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Japan) под руководством д-ра С. Абэ (Syuiti Abe, Dr. Sc.).

Методика экспресс-анализа генетической структуры лососей на основе изменчивости полиморфных сайтов контрольной области мтДНК (около 500 пар оснований) включала следующие основные этапы:

- выделение тотальной ДНК,
- амплификация контрольной области мтДНК,
- гибридизация продуктов полимеразной цепной реакции (PCR-продуктов),
- визуализация результатов гибридизации.

#### Выделение мтДНК

Выделение мтДНК проводили по общепринятой фенол-хлороформной методике (Sambrook et al., 1989). Каждую пробу (приблизительно 50–100 мг ткани сердца) гомогенизировали в 500 мкл лизисного буфера, добавляли 50 мкл 10% SDS, 2,5 мкл протеиназы К и оставляли при  $t=37^{\circ}\text{C}$  до полного просветления лизата (14–16 часов). Лизат ткани и 500 мкл хлороформа тщательно перемешивали примерно 10 мин. и центрифугировали в течение 8–10 мин. при 8000 об/мин. и  $t=-18^{\circ}\text{C}$ . Верхнюю фракцию (примерно 750 мкл) аккуратно отбирали и переносили в чистые пробирки, добавляли 500 мкл хлороформа и проводили повторное центрифугирование в том же режиме. После отбора верхней фракции в раствор добавляли 250 мкл ацетата аммония и 750 мкл изопропилового спирта. Тщательно перемешивали до выпадения белого осадка ДНК — «медузы», инкубировали 2–3 часа в холодильнике и центрифугировали.

Пробирки со сгустком ДНК на стенке подсушивали в открытом виде при комнатной темпера-

туре в течение 30–40 мин. Осадок ДНК, в зависимости от количества, растворяли в 100–500 мкл ТЕ-буфера. Далее добавляли РНКазу из расчета: на 100 мкл ТЕ-буфера — 0,5 мкл РНКазы, тщательно перемешивали и приблизительно 40–45 мин. инкубировали в термостате при  $t=37^{\circ}\text{C}$ .

В пробирки с лизатом ткани добавляли протеиназу К в том же объеме, что и РНКазу (на каждые 100 мкл ТЕ-буфера — 0,5 мкл фермента) и инкубировали в том же температурном режиме в течение 1,5–2,0 часов. После этого раствор ДНК дважды обрабатывали хлороформом и центрифугировали в указанном выше режиме. Верхнюю фракцию переносили в чистые пробирки и добавляли 96%-й этанол в объеме равном ранее добавленному объему ТЕ-буфера и перемешивали. На этой стадии спиртовой раствор ДНК может сохраняться при  $t=4^{\circ}\text{C}$  неопределенно долгое время. Далее подготовка проб непосредственно перед амплификацией проводилась по следующей схеме:

1. центрифугировать в указанном выше режиме,
2. супернатант аккуратно слить,
3. высушить осадок ДНК (остается на стенках пробирки) в течение 30 мин.,
4. растворить ДНК в ТЕ-буфере (объем от 100 до 500 мкл),
5. добавить равный объему ТЕ-буфера объем хлороформа, отцентрифугировать, отобрать верхнюю фазу,
6. осадить ацетатом аммония (10 мкл) и 96%-м этиловым спиртом (в 2,0–2,5 раза больше объема ранее добавленного ТЕ-буфера),
7. инкубировать на льду 2,0–2,5 ч.,
8. повторить пункты 1–4.

#### Амплификация мтДНК

Для амплификации контрольной области мтДНК использовали две пары праймеров (Moriya et al., 2005):

5'-ACC TAC TCT CTG GCG GCT-3'

5'-TTG GTG GGT AAA GAC GGA-3'.

и

5'-AGT CCT GCT TAA TGT AGT-3'

5'-ATA AGA TTG ACA CCA TTA-3'.

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции (PCR) содержала 25–100 ng матричной ДНК, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM каждого dNTP, 1 U Taq ДНК полимеразы, 1 μM каждого праймера.

Режим амплификации:

95°C — 3,0 мин.

95°C — 1,0 мин.

45°C — 0,5 мин.

72°C — 3,5 мин.

} 40 циклов

Таблица 1. Локализация и объем выборок кеты, использованных для анализа гаплотипической изменчивости мтДНК

Регион	Локальность	Год	Объем материала (экз.)	Источник
о. Хоккайдо (поб-е Японского моря)	р. Читоз	1996	51	(Yoon et al., 2004)
о. Хоккайдо (поб-е Охотского моря)	р. Токушибетсу	1997	51	(Yoon et al., 2004)
	р. Токоро 1 (ранняя)	1999	49	(Yoon et al., 2004)
	р. Токоро 2 (поздняя)	1998	44	(Yoon et al., 2004)
	р. Нишибетсу	1997	41	(Yoon et al., 2004)
о. Хоккайдо (поб-е Тихого океана)	р. Куширо	1998	49	(Yoon et al., 2004)
	р. Токачи	1996	46	(Yoon et al., 2004)
	р. Юраппу	1998	40	(Yoon et al., 2004)
о. Хонсю (поб-е Тихого океана)	р. Цугаруиши 1 (ранняя)	1999	47	(Yoon et al., 2004)
	р. Цугаруиши 2 (поздняя)	1997	44	(Yoon et al., 2004)
	р. Оцучи	1999	49	(Yoon et al., 2004)
	р. Койзуми	1996	47	(Yoon et al., 2004)
о. Хонсю (поб-е Японского моря)	р. Кавабукуро	1997	30	(Yoon et al., 2004)
	р. Гакко	1996	45	(Yoon et al., 2004)
	р. Уоно	1996	49	(Yoon et al., 2004)
	р. Джинтсу	1995	49	(Yoon et al., 2004)
Корея	р. Намада	2000	46	(Yoon et al., 2004)
Чукотка	р. Анадырь 1 (ранняя)	2000	33	(Yoon et al., 2004)
	р. Анадырь 2 (поздняя)	1990	45	Наши данные
Северо-Западная Камчатка	р. Хайрюзова	1993	41	Наши данные
	р. Тигиль	2002	44	Наши данные
Восточная Камчатка	р. Камчатка 1 (ранняя)	1990	50	Наши данные
	р. Камчатка 2 (поздняя)	1991	32	Наши данные
Западная Камчатка	р. Воровская	1990	46	Наши данные
	р. Коль	1991	44	Наши данные
	р. Пымта	2003	49	Наши данные
	р. Утка	2002	20	Наши данные
	р. Большая	1999	50	Наши данные
	р. Быстрая	2001	50	Наши данные
Северо-Восточная Камчатка	р. Алука	2002	50	Наши данные
	р. Пахача	2002	50	Наши данные
о. Сахалин	р. Калининка 1 (ранняя)	2003	25	(Yoon et al., 2004)
	р. Калининка 2 (поздняя)	1994	44	(Yoon et al., 2004)
	р. Белая	2003	25	(Yoon et al., 2004)
	р. Таранай	2003	24	(Yoon et al., 2004)
	р. Найба	1995	16	(Yoon et al., 2004)
	р. Тымь	2003	25	(Yoon et al., 2004)
Северо-Западное Охотоморье	р. Охота	2003	25	ХоТИНРО
Приморье	р. Аввакумовка 1 (ранняя)	2001	26	(Yoon et al., 2004)
	р. Аввакумовка 2 (поздняя)	1994	30	(Yoon et al., 2004)
	р. Нарва	1995	34	(Yoon et al., 2004)
Магадан	р. Ола	1999	33	(Yoon et al., 2004)
	р. Ола (ЛРЗ)	1990	37	Наши данные
	р. Туманы	1991	42	Наши данные
	р. Тауй	1999	39	(Yoon et al., 2004)
Курильские острова	р. Серноводная	1995	33	(Yoon et al., 2004)
бассейн р. Амур	р. Амур	2000	50	(Yoon et al., 2004)
залив Коцебу	р. Салмон	1991	48	(Yoon et al., 2004)
	р. Ноатак	1991	50	(Yoon et al., 2004)
залив Нортон	р. Юналаклит	1992	50	(Yoon et al., 2004)
бассейн р. Юкон	р. Андреевски	1993	45	(Yoon et al., 2004)
	р. Шинджек	1992	45	(Yoon et al., 2004)
	р. Танана	1993	50	(Yoon et al., 2004)

Продолжение таблицы 1

Регион	Локальность	Год	Объем материала (экз.)	Источник
Бристольский залив	р. Токлат	1992	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Пелли	1993	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Донджек	1994	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Кветлук	1994	50	(Yoon et al., 2004)
	р. Кускоквим (южный приток)	1995	50	(Yoon et al., 2005)
о. Кодьяк	р. Тогиак	1993	49	(Yoon et al., 2004)
	р. Нушагак (верхнее течение)	1993	49	(Yoon et al., 2004)
залив Кука	Китои ЛРЗ	1993	49	(Yoon et al., 2004)
	р. Кижук	1992	44	(Yoon et al., 2004)
залив Принца Вильяма	р. МкНейл	1994	50	(Yoon et al., 2004)
	р. Чунлина (бас. р. Сузитна)	1993	50	(Yoon et al., 2005)
полуостров Аляска	Вэлли Норенберг ЛРЗ 1	2002	50	(Yoon et al., 2005)
	Вэлли Норенберг ЛРЗ 2	1992	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Олсен Крик	1992	45	(Yoon et al., 2004)
	р. Белковски	1992	46	(Yoon et al., 2004)
	р. Чигинагак	1991	50	(Yoon et al., 2004)
Юго-Восточная Аляска	р. Джошуа Грин	1992	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Св. Катерины	1992	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Фрости	1992	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Сомилл	1993	50	(Yoon et al., 2004)
	залив Лонг	1991	49	(Yoon et al., 2004)
	залив Вейл	1993	48	(Yoon et al., 2004)
	Литл Порт Уолтер	2004	50	(Yoon et al., 2005)
	Порт Боклер	1995	45	(Yoon et al., 2004)
Северная Британская Колумбия	р. Дизапиренс	1998	50	(Yoon et al., 2004)
	р. Девятая речка	2004	44	(Yoon et al., 2005)
	р. Фиш	1988	49	(Yoon et al., 2004)
	р. Блоссом	1986	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Мартен	1986	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Эксталл (бас. р. Скина)	1988	45	(Yoon et al., 2004)
	р. Бэг Харбор	1989	50	(Yoon et al., 2004)
	канал Неките	1989	47	(Yoon et al., 2004)
Южная Британская Колумбия	р. Веддер	2002	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Харрисон	2002	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Нитинат	1992	50	(Yoon et al., 2005)
	р. Нанаймо	2002	32	(Yoon et al., 2005)
	залив Ковичан	1997	50	(Yoon et al., 2005)
шт. Вашингтон	р. Нуксак	1998	49	(Yoon et al., 2004)
	залив Квилсен	1998	50	(Yoon et al., 2004)
	р. Блекджек	1998	50	(Yoon et al., 2004)
	р. Сатсоп	1998	49	(Yoon et al., 2004)
шт. Орегон	р. Хамилтон	1998	43	(Yoon et al., 2004)

Примечание: ХоТИНРО — выборка собрана сотрудниками Хабаровского отделения ТИНРО

### Гибридизация PCR-продуктов

Для экспресс-анализа генетической структуры применяли microarray-метод с использованием синтезированных олигонуклеотидов (Research and Development Center, Nisshinbo Industries, Inc 1–2–3–, Onodai, Midori-ku, Chiba, 267–0056, Japan) длиной 14–31 оснований, каждый из которых содержал предварительно выявленный полиморф-

ный единичный нуклеотидный вариант. Использовали набор реактивов Oligo-Array® (Chum salmon) Kit (Nisshinbo Industries, Tokyo). Гибридизация PCR-продуктов включала следующие этапы:

1. денатурация 4 µl PCR-продукта при 95°C в течение 1–2 мин.,

2. после денатурации незамедлительно поместить продукт в холод,

3. добавить 16  $\mu\text{l}$  гибридизационного раствора (предварительно нагреть до  $37^\circ\text{C}$ ), нанести все 20  $\mu\text{l}$  смеси на предметное стекло с синтезированными олигонуклеотидами, накрыть покровным стеклом (гибридизационный раствор нельзя нагревать долгое время, т. к. он является термолабильным),

4. поместить предметное стекло с пробой в термостат для гибридизации при  $37^\circ\text{C}$  в течение 2 ч.,

5. приготовить окрашивающий раствор примерно за 20 мин. до конца гибридизации,

6. вынуть пробу из термостата, поместить в буфер для промывки (предварительно нагретый до  $37^\circ\text{C}$ ), снять покровное стекло и промывать при  $37^\circ\text{C}$  в течение 5 мин.

### Визуализация результатов гибридизации

После гибридизации продуктов PCR-реакции для визуализации результатов применяли ABC-метод окрашивания, позволяющий выявлять сигнал гибридизации:

1. для подготовки окрашивающего раствора (п. 5) необходимо к 2,5 ml буфера для окраски добавить по 40  $\mu\text{l}$  растворов А и В, которые входят в набор реактивов для данного метода, оставить смесь на 30 мин. (не использовать подготовленный раствор сразу после приготовления),

2. нанести 1,4 ml окрашивающего раствора на предметное стекло с промытой пробой и оставить при комнатной температуре на 30 мин. без покровного стекла,

3. слить с предметного стекла окрашивающий раствор, перенести пробу в окрашивающий буфер и промыть в буфере 5 мин. при комнатной температуре, повторить дважды,

4. в течение второй промывки подготовить другой окрашивающий раствор, для чего добавить по 40  $\mu\text{l}$  каждого из растворов № 1–4 (из набора реактивов) к 40  $\mu\text{l}$  дистиллированной и деионизированной воды (подготовленный окрашивающий раствор не хранить, всегда готовить непосредственно перед использованием),

5. нанести 1,4 ml окрашивающего раствора на предметное стекло и оставить при комнатной температуре на 30 мин. без покровного стекла,

6. промыть окрашенный препарат в дистиллированной и деионизированной воде и высушить.

Полученные в результате лабораторной обработки данные были проанализированы с использованием стандартных математических методов. Гаплотипическая и нуклеотидная изменчивость в локальных стадах кеты, а также внутри крупных региональных групп популяций была оценена по Нею (Nei, 1987). Был использован пакет программ

Arlequin 2.000 (Schneider et al., 2000). Анализ генетической дивергенции осуществлялся при помощи пакета программ NTSYSpc 2.01d (NTSYS, 1997). Генетические расстояния, являющиеся мерой количественных различий между популяциями, вычисляли попарно с использованием критерия идентичности Нея (Nei, 1986). Полученные матрицы анализировали с применением метода трехмерного шкалирования, который обеспечивает максимальное разделение классов (области с высокой концентрацией точек, где каждая точка соответствует генетической характеристике отдельной популяции) и позволяет получить картину дивергенции популяций в трехмерном пространстве (Kruskal, 1964).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования нуклеотидной последовательности контрольной области мтДНК (481 пара оснований) в 95 популяциях кеты Азии и Северной Америки было выявлено 32 гаплотипа, частота встречаемости которых приведена в таблице 2. В зависимости от наличия нуклеотидных замен в определенных сайтах они были объединены в три гаплогруппы (А, В и С) в соответствии с предложенной ранее градацией (Yoon et al., 2004, 2005) (табл. 3). На рисунке 2 представлена генеалогическая сеть выявленных гаплотипов, построенная по принципу минимального числа нуклеотидных различий. В пределах групп А и С гаплотипы различаются между собой одной нуклеотидной заменой. Сходную картину можно наблюдать и в группе В, где исключения составляют

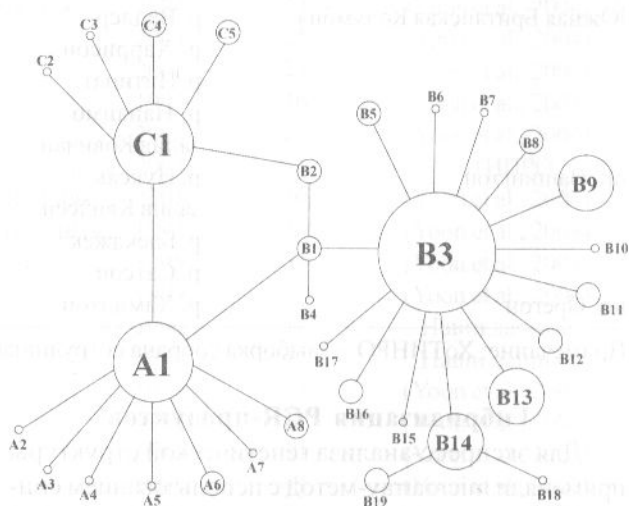


Рис. 2. Генеалогическая сеть гаплотипов кеты, построенная по принципу минимального числа нуклеотидных замен. Размер окружности приблизительно отражает частоту встречаемости данного гаплотипа во всех исследованных популяциях









Таблица 3. Изменчивые нуклеотидные сайты в контрольной области мтДНК кеты (по: Yoon et al., 2005)

Гаплотип	10	30	42	57	70	78	96	108	154	194	231	242	244	250	260	339	340	386	395	401	428	471	
A1	T	T	A	A	T	T	—	A	C	C	T	C	C	T	A	T	C	G	C	T	A	A	
A2	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A3	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A4	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C
A8	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B2	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B3	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B5	C	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B6	*	*	*	*	C	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B7	*	*	*	*	*	C	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B8	*	*	*	*	*	*	*	C	G	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B9	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	C	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B10	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	T	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B11	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	T	*	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B12	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	C	*	*	*	—	A	*	*	*	*
B13	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	—	A	*	*	*	*
B14	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	A	*	—	A	*	*	*	*
B15	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	C	*	*	*
B16	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	*	G	*	*
B17	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	—	A	*	*	*	C
B18	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	A	T	—	A	*	*	*	*
B19	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	A	*	—	A	C	*	*	*
C1	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C2	*	C	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C3	*	C	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C4	*	C	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C5	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Примечание: \* — нуклеотид в каждой позиции дан по A1; — — делеция (отсутствие нуклеотида)

гаплотипы B2, B4, B18 и B19, которые отличаются от доминирующего гаплотипа B3 двумя нуклеотидными заменами (табл. 3, рис. 2).

Анализ гаплотипической и нуклеотидной изменчивости (Nei, 1987) в российских популяциях кеты показал, что наиболее высокими значениями характеризуются выборки р. Аввакумовка (Приморье). Минимальная изменчивость отмечена у нативных стад, нерестящихся в бассейнах рр. Камчатка и Большая (п-ов Камчатка) (табл. 4). Аналогичное исследование внутри крупных региональных групп популяций выявило, что японская кета характеризуется наибольшим уровнем изменчивости, а для северо-американских популяций данные параметры находятся на относительно низком уровне (табл. 5).

Для удобства графического представления географического распределения гаплотипов мтДНК в популяциях кеты, частоты некоторых из них, как правило редких, были объединены (рис. 3, 4).

Анализ географического распределения гаплотипов мтДНК в локальных стадах Японии и Кам-

чатки — двух регионов, дающих наибольший вклад в общую численность кеты Азии (Варнавская, 2006), позволил выявить следующую картину (рис. 3, табл. 2). В популяциях кеты Японии наиболее частыми оказались гаплотипы A1 (в среднем 52,4%), C1 (в среднем 25,7%) и B3 (в среднем 16,8%). Концентрация первого из них была наименьшей в выборке из р. Нишибетсу (29,3%) (охотоморское побережье о. Хоккайдо). По мере смещения на юг она увеличивается и достигает максимума в самой южной из рассмотренных локальностей — р. Джинтсу (75,5%) (япономорское побережье о. Хонсю). Наибольшим гаплотипическим разнообразием характеризуется популяция р. Куширо (тихоокеанское побережье о. Хоккайдо). В данной выборке было выявлено 8 гаплотипов, тогда как в выборках из локальных стад рр. Токушибетсу, Нишебетсу, Юраппу, Джинтсу и Оучи — только по три гаплотипа. Популяция р. Оучи оказалась единственной в данном регионе, где не был обнаружен гаплотип B3 (рис. 3А, табл. 2).

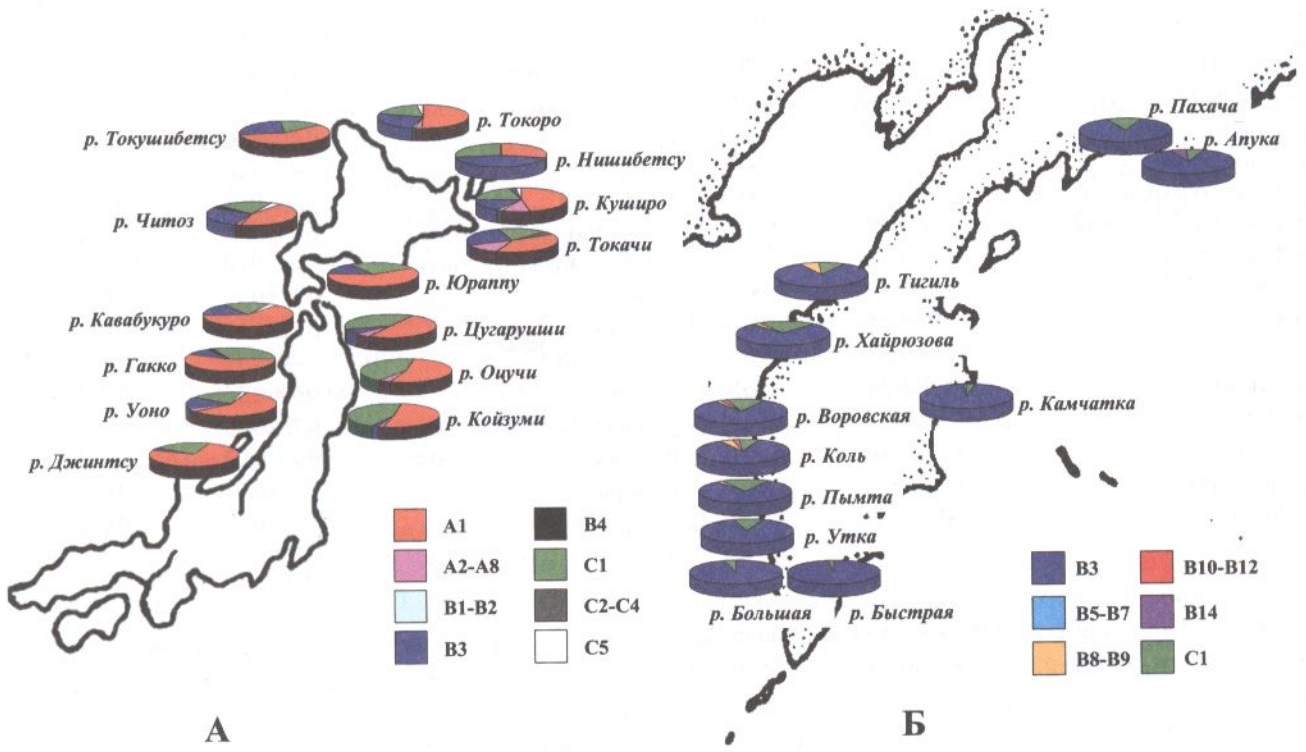


Рис. 3. Распределение частот гаплотипов мтДНК в популяциях кеты Японии (А) и Камчатки (Б)

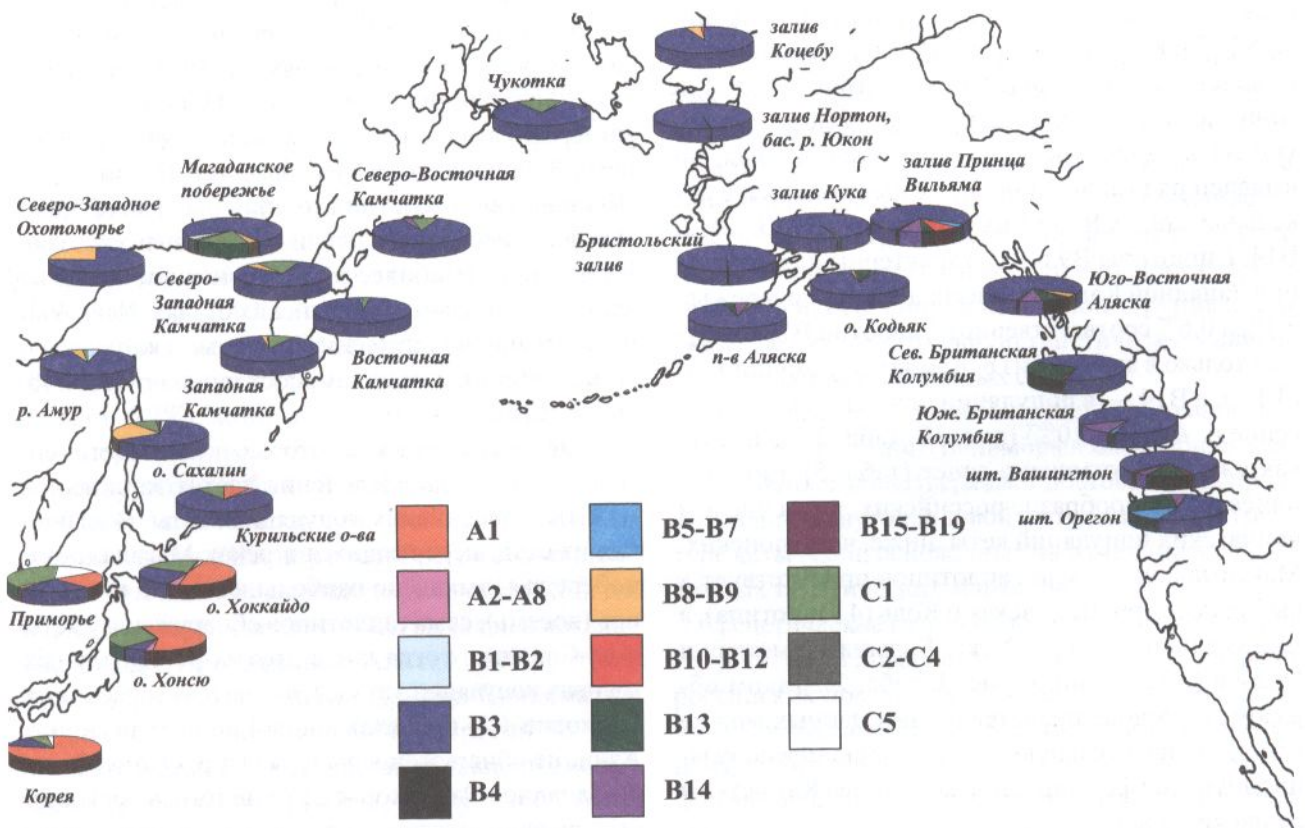


Рис. 4. Распределение частот гаплотипов мтДНК в региональных группах кеты Азии и Северной Америки

Таблица 4. Гаплотипическая ( $h \pm SD$ ) и нуклеотидная ( $\pi$ ) изменчивость в популяциях кеты России

Популяция	$h \pm SD$	$\pi$	Популяция	$h \pm SD$	$\pi$
р. Анадырь (ранняя)	0,17±0,08	0,0011	р. Ола (ЛРЗ)	0,29±0,09	0,0014
р. Анадырь (поздняя)	0,36±0,07	0,0023	р. Ола	0,60±0,08	0,0030
р. Хайрюзова	0,36±0,08	0,0021	р. Тауй	0,47±0,07	0,0027
р. Камчатка (ранняя)	0,08±0,05	0,0005	р. Туманы	0,38±0,08	0,0023
р. Камчатка (поздняя)	0,06±0,06	0,0001	р. Калининка (ранняя)	0,63±0,08	0,0019
р. Воровская	0,31±0,08	0,0016	р. Калининка (поздняя)	0,65±0,04	0,0029
р. Коль	0,25±0,08	0,0011	р. Белая	0,53±0,12	0,0020
р. Пымта	0,31±0,08	0,0018	р. Тымь	0,22±0,10	0,0014
р. Утка	0,19±0,11	0,0012	р. Таранай	0,42±0,12	0,0014
р. Апука	0,22±0,08	0,0010	р. Найба	0,54±0,15	0,0024
р. Пахача	0,22±0,07	0,0014	р. Аввакумовка (ранняя)	0,79±0,03	0,0040
р. Тигиль	0,29±0,08	0,0013	р. Аввакумовка (поздняя)	0,79±0,02	0,0039
р. Большая	0,08±0,05	0,0005	р. Нарва	0,59±0,07	0,0023
р. Быстрая	0,04±0,04	0,0003	р. Серноводная	0,37±0,10	0,0019
р. Охота	0,41±0,11	0,0009	р. Амур	0,19±0,07	0,0006

Таблица 5. Гаплотипическая ( $h \pm SD$ ) и нуклеотидная ( $\pi$ ) изменчивость внутри региональных групп популяций кеты

Регион	$h \pm SD$	$\pi$
Россия	0,36±0,001	0,0017
Япония	0,61±0,001	0,0021
Северная Америка	0,17±0,001	0,0005

В отличие от Японии, в локальных стадах Камчатки доминирующим оказался гаплотип В3, составляя в среднем для исследованных популяций 88,8%. Максимальная частота его встречаемости отмечена для выборки из р. Быстрая (98,0%), а минимальная — для р. Хайрюзова (78,0%). Гаплотип А1 в данном регионе обнаружен не был, но выявлен ряд гаплотипов, не встречающихся в локальных стадах Японских островов — В7, В9, В12, В14. Гаплотипы В9 и В12 характерны для популяций Западной Камчатки (в среднем по побережью 2,3% и 0,6% соответственно). Гаплотип В7 обнаружен только в выборке из р. Камчатка (поздний ход) (3,1%), а В14 — в популяции, нерестующей в бассейне р. Апука (6,0%) (рис. 3Б, табл. 2). В целом, как уже было отмечено ранее (табл. 5), гаплотипическое разнообразие российских, в том числе и камчатских популяций кеты, ниже, чем японских. Максимальное число гаплотипов присутствует в выборках из рр. Воровская и Коль (4 гаплотипа), а минимальное — в рр. Утка, Большая, Быстрая и Пахачи (2 гаплотипа) (рис. 3, табл. 2). Таким образом, на основе представленных данных можно отметить значительную региональную межпопуляционную дифференциацию кеты п-ова Камчатка и Японских о-вов.

При сравнительном анализе географического распределения гаплотипов мтДНК кеты азиатской

части ареала были рассмотрены менее значительные по видовой численности региональные группы популяций. Как показано на рисунках 3 и 4, гаплотип А1, доминирующий в японских популяциях и отсутствующий в локальных стадах северной части Дальнего Востока, был выявлен в выборках из рек Корейского п-ва, Приморья, Курильских о-вов и о-ва Сахалин. В выборке из р. Намада (Корея), самой южной из рассмотренных локальностей, концентрация гаплотипа А1 оказалась максимальной (78,3%). Наименьшая его встречаемость отмечена в популяциях, нерестящихся в реках о. Сахалин (в среднем 0,6%). Гаплотип А6, характерный для локальных стад кеты Японии (в среднем 1,3%), обнаружен в выборке из р. Серноводная (Курильские о-ва), где его доля составила 3,0%. Доминирующий в камчатских популяциях гаплотип В3 является наиболее представленным почти во всех исследованных российских стадах. Исключением являются популяции Приморья, в которых его концентрация, в среднем, составила всего 24,9% (табл. 2, рис. 4).

Следует отметить некоторые особенности географического распределения частот гаплотипов мтДНК в российских популяциях кеты. В выборках из стад, нерестящихся в реках Магаданского побережья, выявлено наибольшее число гаплотипов (восемь), семь гаплотипов обнаружены у кеты о-ва Сахалин, тогда как в других региональных группах популяций это значение не превышает пяти. Гаплотип С1, представленный во всех регионах Азии, не обнаружен в выборке из р. Охота (Северо-Западное Охотоморье). Кроме того, в большинстве российских популяций выявлены гаплотипы В8 и В9, тогда как в южно-азиатских (Япония и Корея) они отсутствуют (табл. 2, рис. 3, 4).

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что результаты анализа гаплотипического разнообразия контрольной области мтДНК в локальных стадах кеты Азии свидетельствуют о существенных различиях в наборах и распределении гаплотипов «северных» и «южных» популяций и, в частности, между стадами российского Дальнего Востока и Японии.

Основным отличием генетической структуры популяций Северной Америки является отсутствие в контрольной области мтДНК ряда гаплотипов, характерных для азиатской кеты. В выборках из рек американского континента не выявлено гаплотипов группы А, дискриминирующих, в первую очередь, кету Японских островов, а также Кореи, Приморья и о-ва Сахалин. Из гаплотипов группы С только гаплотип С1 встречается в четырех популяциях Аляски (табл. 2, рис. 4). Для кеты данного региона, также как для Камчатского п-ова, характерно наличие гаплотипов группы В. Из 19-ти гаплотипов этой группы, выявленных в исследованных стадах, 14 присутствуют на американской части ареала, при этом лишь 5 из них (В2, В3, В9, В12, В14) встречались в выборках азиатской кеты (табл. 2, рис. 4).

На рисунке 4 показано, что во всех региональных группах северо-американской кеты, как и в большинстве российских популяций, доминирует гаплотип В3, составляя в среднем 85,6%. Его максимальная концентрация выявлена в локальных стадах Северо-Западной Аляски, нерестящихся в реках залива Нортон, Бристольского залива и бассейне р. Юкон (в среднем 99,5%), а минимальная — в самых южных из исследованных американских популяций (р. Сатсоп (шт. Вашингтон) — 46,9% и р. Хамилтон (шт. Орегон) — 53,5%). В рассматриваемой части ареала вторым по частоте встречаемости гаплотипом является В13 (в среднем 6,2%), который может считаться типично «американским», т.к. в азиатских популяциях он обнаружен не был. В выборках кеты из рек Юго-Восточной Аляски, Северной Британской Колумбии и штатов Вашингтон и Орегон его концентрация достаточно высока, варьируя от 8,5% до 28,2%. В меньших долях он был выявлен в локальных стадах Центральной Аляски (полуостров Аляска, о-в Кодьяк, залив Принца Вильяма) (в среднем 4,7%). Гаплотип В14 — третий по частоте встречаемости в северо-американских популяциях (в среднем 4,3%) и присутствующий в Азии лишь в одной выборке (р. Апука), выявлен в популяциях Центральной и Юго-Восточной Аляски, Южной Британской Колумбии и шт. Вашингтон и

Орегон, где его доля составляет в среднем 6,9% (табл. 2, рис. 4).

Таким образом, можно заключить, что популяции кеты Азии, и особенно ее южной части, имеют заметные отличия от локальных стад Северной Америки по структуре контрольной области мтДНК.

Для оценки уровня популяционной дивергенции кеты Азии на основе изменчивости частот выявленных гаплотипов были вычислены генетические расстояния (Nei, 1986) и, с использованием полученных матриц, выполнено трехмерное шкалирование (Kruskal, 1964). Были проведены следующие варианты анализа:

1. Азия — 47 популяций (23 гаплотипа контрольной области мтДНК) (рис. 5А);
2. Россия (северная часть Дальнего Востока) — 19 популяций (12 гаплотипов контрольной области мтДНК) (рис. 5Б);
3. Россия (южная часть Дальнего Востока) — 11 популяций (9 гаплотипов контрольной области мтДНК) (рис. 5В);
4. Япония — 16 популяций (16 гаплотипов контрольной области мтДНК) (рис. 5Г).

На рисунке 5А представлена картина генетической дивергенции кеты азиатской части ареала. По степени генетического сходства выделяются две большие группы: «северная», куда входят российские популяции севера Дальнего Востока, а также часть локальных стад о-ва Сахалин, и «южная», куда входят популяции Японии и Кореи. Приморские и некоторые сахалинские популяции не входят ни в одну из них, занимая промежуточное положение, при этом точки, характеризующие их генетическую структуру, располагаются на более значительных расстояниях друг от друга, чем в «южной» и, особенно, в «северной» группах. Это указывает на значительную генетическую дивергенцию данных локальных стад.

Сходные результаты были получены ранее при анализе аллозимного полиморфизма (Варнавская, 2001, 2006), что подтверждает достоверность представлений о внутривидовой популяционной структуре кеты Азии, основанных на изменчивости различных генетических маркеров.

Генетические взаимоотношения внутри каждой из групп были проанализированы отдельно. Среди российских локальных стад северной части Дальнего Востока наиболее обособленными являются популяции, нерестящиеся в реках Северного (Магаданская область) и Северо-Западного (Хабаровский край) Охотоморья. Генетическая структура кеты воспроизводства лососевого рыбозаводного завода (ЛРЗ) на р. Ола сильно отличается как от «ди-

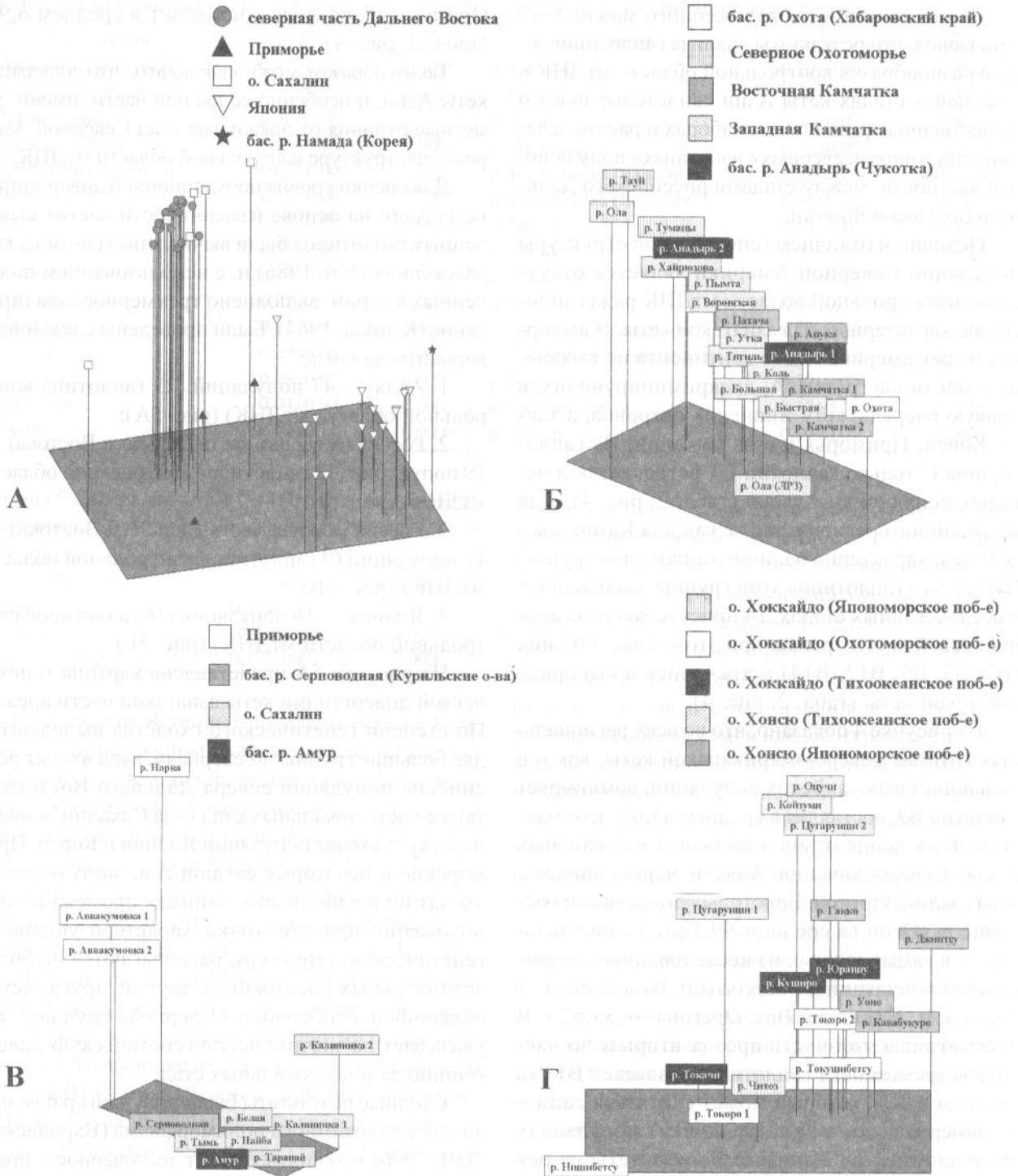


Рис. 5. Генетическое сходство популяций кеты (Nei, 1986), представленное в виде трехмерного шкалирования (Kruskal, 1964): А — Азия (23 гаплотипа); Б — Россия (северная часть Дальнего Востока, 12 гаплотипов); В — Россия (южная часть Дальнего Востока, 9 гаплотипов); Г — Япония (16 гаплотипов)

кой» части популяции данной реки, так и от других стад рассматриваемого региона, что, возможно, является следствием искусственного воспроизводства и нарушения принципов сохранения естественной популяционно-генетической структуры (рис. 5Б).

Среди популяций кеты Камчатки четкой генетической дивергенции по географической принад-

лежности к восточно- и западно-камчатскому регионам не просматривается.

Следует отметить, что по времени хода на нерест существенно различаются выборки из бассейна р. Анадырь, одна из которых (позднего хода) оказалась близка по своей генетической структуре к популяции р. Туманы (Северное Охотоморье)

(рис. 5Б). Подобные результаты согласуются с данными аллозимного анализа (Алтухов и др., 1997; Варнавская, 2001, 2006) и с более ранними исследованиями изменчивости мтДНК (Брыков и др., 2003), где также обсуждается генетическое сходство североберингоморских и североохотоморских локальных стад кеты. Вероятная причина этого родства предполагает, что перешеек, соединяющий п-ов Камчатка с материком, в период пост-Плейстоценового расселения лососевых был затоплен, и это обеспечивало генетический обмен и, как следствие, генетическую близость между рассматриваемыми популяциями (Варнавская, 2001, 2006).

Анализ генетических расстояний между российскими локальными стадами южной части Дальнего Востока выявил наличие двух достаточно обособленных групп. В первую вошли популяции Приморья, а во вторую — Курильских о-вов, о-ва Сахалин и р. Амур. Различия между выборками кеты из р. Калининка могут быть обусловлены как сроками сбора проб, так и деятельностью рыбозаводного завода (Алтухов и др., 1980) (рис. 5В).

Трехмерное шкалирование, выполненное для 16 популяций кеты Японии, показало, что локальные стада о-вов Хоккайдо и Хонсю характеризуются существенными генетическими различиями. Кроме того, подобные различия можно отметить и для совокупностей популяций, нерестящихся в бассейнах рек разных побережий (рис. 5Г).

Приведенные выше результаты многофакторного анализа частот гаплотипов, выявленных при исследовании контрольной области мтДНК, свидетельствуют о генетическом своеобразии региональных совокупностей популяций кеты Азии и о возможности использования частот гаплотипов в качестве информативного маркера для идентификации локальных стад в смешанных морских уловах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая представленные результаты исследования популяционной структуры кеты на основе полиморфизма контрольной области мтДНК, можно выделить некоторые особенности генетической дифференциации данного вида. Во-первых, наибольшее гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие свойственно популяциям Японии, заметно ниже эти показатели для российских популяций, и относительно невысокая гаплотипическая и нуклеотидная изменчивость характерна для североамериканских стад.

Во-вторых, географическое распределение гаплотипов, объединенных в зависимости от локализации нуклеотидных замен в гаплогруппы А, В и С, позволяет заключить, что, в целом, гаплогруппа А доминирует в популяциях кеты Японии и в значительно меньшей степени представлена в некоторых российских стадах южной части Дальнего Востока (Приморье, Курильские о-ва, о. Сахалин). Гаплогруппа В свойственна, в первую очередь, североамериканским популяциям и стадам северной части Дальнего Востока. В Азии 10 из 19 гаплотипов данной группы выявлено в исследованных локальностях и только 3 из них обнаружены у кеты Японских о-вов. Гаплотипы группы С характеризуют азиатскую часть ареала кеты, встречаясь с относительно малой частотой на североамериканском континенте.

В-третьих, в пределах указанных гаплогрупп существует ряд наиболее дискриминирующих отдельные регионы гаплотипов, выявление которых наиболее значимо при идентификации смешанных выборок из скоплений кеты в период нагульных и преднерестовых миграций. Так, гаплотипы В5, В10-11, В13 и В15-19 характерны исключительно для популяций Северной Америки, А2-5, А7-8, В4, также как и С3, встречаются только в японских стадах, В7 — только на Камчатке, а В8 — на юге российского Дальнего Востока.

Количественная оценка генетической дивергенции, выявленной на основе гаплотипической изменчивости азиатской кеты, подтвердила генетическое своеобразие двух региональных популяционных групп — «северной» (север Дальнего Востока и часть локальных стад о-ва Сахалин) и «южной» (популяции Японии и Кореи).

Таким образом, полученные результаты, характеризующие внутривидовую генетическую подразделенность кеты, позволяют в дальнейшем использовать полиморфизм контрольной области мтДНК в качестве информативного маркера для идентификации региональной принадлежности смешанных выборок при исследовании миграций и оценке промыслового изъятия стад.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Рябова Г.Д., Куликова Н.И. 1980. Генетическая дифференциация популяций кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) и эффективность некоторых акклиматизационных мероприятий // Биология моря. № 3. С. 23–38.

Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. 1997. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 287 с.

- Берг Л.С. 1948. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. М.-Л.: АН СССР. Ч. 1, 466 с.
- Брыков В.А., Полякова Н.Е., Скурихина Л.А., Кухлевский А.Д., Кириллова О.Н., Чуриков Д.Ю., Пудовкин А.И., Гарретт А.Дж., Алтухов Ю.П. 1999а. Популяционно-генетическая структура у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестриктазного анализа митохондриальной ДНК: временная гетерогенность в период нерестового хода // Генетика. Т. 35. № 5. С. 666–673.
- Брыков В.А., Полякова Н.Е., Скурихина Л.А., Кухлевский А.Д., Малинина Т.В., Минахин Л.С., Алтухов Ю.П. 1999б. Популяционно-генетическая структура у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестриктазного анализа митохондриальной ДНК: динамика изменчивости в поколениях // Генетика. Т. 35. № 5. С. 657–665.
- Брыков В.А., Полякова Н.Е., Прохорова А.В. 2003. Филогеографический анализ кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) в азиатской части ареала, основанный на изменчивости митохондриальной ДНК // Генетика. Т. 39. № 1. С. 75–82.
- Брыков В.А. 2001. Эволюция генома, изменчивость и дивергенция ДНК у морских животных. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: Ин-т общей генетики РАН, 48 с.
- Варнавская Н.В. 2001. Принципы генетической идентификации популяций тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus spp.* в связи с задачами рационального промысла. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: Ин-т общей генетики РАН, 48 с.
- Варнавская Н.В. 2002. Генетическое разнообразие популяций в связи с задачами рациональной промысловой эксплуатации лососевых рыб // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана: Сб. науч. тр. КамчатНИРО. Вып. VI. С. 158–181.
- Варнавская Н.В. 2006. Генетическая дифференциация популяций тихоокеанских лососей. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 488 с.
- Гречко В.В. 2002. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // Генетика. Т. 38. № 8. С. 1013–1033.
- Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. 2004. Под ред. Ю.П. Алтухова. М.: Наука, 619 с.
- Макоедов А.Н., Ермоленко Л.Н., Бачевская Л.Т., Овчинников К.А. 1995. Генетическая изменчивость кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum), размножающейся в реках охотоморского побережья Камчатки // Генетика. Т. 31. № 11. С. 1552–1556.
- Полякова Н.Е., Скурихина Л.А., Кухлевский А.Д., Брыков В.А., Малинина Т.В., Минахин Л.С., Алтухов Ю.П. 1996. Популяционно-генетическая структура у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестриктазного анализа митохондриальной ДНК. Сравнение неперекрывающихся поколений четных и нечетных лет // Генетика. Т. 32. № 9. С. 1256–1262.
- Чуриков Д.Ю. 2001. Генеалогия гаплотипов митохондриальной ДНК у нескольких видов тихоокеанских лососей. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: Санкт-Петербургский государственный университет, 17 с.
- Шпигальская Н.Ю., Варнавская Н.В., Шаповрев Р.А. 2005. Генетическая дивергенция некоторых региональных популяционных комплексов у кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) Дальнего Востока // Поп. биол., генетика и систематика гидробионтов. Сб. науч. тр. КамчатНИРО. Т. 1. С. 63–79.
- Avise J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. N.Y.: Chapman and Hall. 511 p.
- Avise J.C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Cambridge, (Mass.): Harvard Univ. press, 447 p.
- Brown W.M., George M., Wilson A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 76. P. 1967–1971.
- Churikov D., Matsuoka M., Luan X., Gray A.K., Brykov V.A., Gharrett A.J. 2001. Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) // Mol. Ecol. Vol. 10. P. 2329–2339.
- Churikov D.U., Gharrett A.J. 2002. Comparative phylogeography of the two pink salmon broodlines: An analysis based on a mitochondrial DNA genealogy // Mol. Ecol. Vol. 11. P. 1077–1101.
- Dowling T.E., Moritz C., Palmer J.D. 1990. Nucleic acids II: Restriction site analysis // Molecular systematics / Eds. D.M. Hillis, C. Moritz. Sanderland (Mass.): Sinauer. P. 250–317.
- Ferris S.D., Sage R.D., Prager E.M. et al. 1983. Mitochondrial DNA evolution in mice // Genetics (US). Vol. 105. P. 681–721.



- Ferris S.D., Berg W.J. 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and management // Population genetics and fishery management / Ed. N. Ryman, F. Utter. Seattle; L.: Univ. Wash. press. P. 277–301.
- Gharrett A.J., Gray A.K., Brykov V.A. 2001. Phylogeographical analysis of mitochondrial DNA variation in Alaskan coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* // Fish. Bull. V. 99. P. 528–544.
- Kondzela C.M., Guthrie C.M., Hawkins S.L., Russell C.D., Helle J.H., Gharrett A.J. 1994. Genetic relationships among chum salmon population in south-east Alaska and northern British Columbia salmon // Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 51 (Suppl.). P. 50–64.
- Kondzela C., Crane P., Urawa S., Burger J., Varnavskaya N., Efremov V., Luan X., Templin W., Hayashizaki K., Wilmot R., Seeb L. 2002. Development of comprehensive allozyme baseline for Pacific Rim chum salmon (*Oncorhynchus keta*, Walbaum) // NPAFC Doc. № 629, 21 p.
- Kruskal J.B. 1964. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method // Psychometrika. Vol. 29. P. 28–42.
- Moritz C., Dowling T.E., Brown W.M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics // Annu. Rev. Ecol. Syst. Vol. 18. P. 269–292.
- Moriya S., Abe S., Urawa S., Suzuki O., Urano A. 2002. DNA microarray for rapid detection of mitochondrial DNA haplotypes of chum salmon // NPAFC Doc. № 617, 9 p.
- Moriya S., Urawa S., Suzuki O., Urano A., Abe S. 2005. DNA microarray for rapid detection of mitochondrial DNA haplotypes of chum salmon // Mar. Biotechnol. Vol. 6. P. 430–434.
- Nei M. 1986. Genetic distance and molecular phylogeny // In N. Ryman and F. Utter (ed.) Populations genetics and fishery management. Seattle, WA.: University of Washington Press. P. 193–223.
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 512 p.
- Nei M., Tajima F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases // Genetics (US). Vol. 105. P. 207–217.
- NTSYS: Numerical Taxonomy & Multivariate analysis System. Exeter Software. 1997.
- Phelps S.R., LeClair L.L., Young S., Blankenship H.L. 1994. Genetic diversity patterns of chum salmon in the Pacific Northwest // Can. J. Fish Aquat. Sci. Vol. 51. № 1. P. 65–83.
- Salo E.O. 1991. Life History of Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) // Groot C., Margolis L. (ed) UBS Press. University of British Columbia, Vancouver, BC. P. 233–309.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1626 p.
- Sato S., Ando J., Ando H., Urawa S., Urano A., Abe S. 2001. Genetic variation among Japanese populations of chum salmon inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial DNA control region // Zool. Sci. Vol. 18. P. 99–106.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Univ. Geneva, Switzerland.
- Seeb L.W., Crane P.A., Debevec E.M. 1997. Genetic analysis of chum salmon harvested in the South Unimak and Shumagin Islands June fisheries, 1993–1996 / Reg. Inf. Rep. № 5J97–17. Alaska Department of Fish and Game. Anchorage, Alaska 99518. 53 p.
- Seeb J.E., Habicht C., Olsen J.B. et al. 1998. Allozyme, mtDNA, and microsatellite variants describe structure of populations of pink and sockeye salmon in Alaska // Assessment and status of Pacific rim salmonid stocks // Ed. D.W. Welch. Vancouver. (NPAFC Bull. № 1). P. 300–318.
- Seeb L.W., Crane P.A. 1999. High Genetic heterogeneity in chum salmon in Western Alaska, the contact zone between Northern and Southern lineages // Trans. Amer. Fish. Soc. Vol. 128. P. 58–87.
- Thomas W.K., Beckenbach A.T. 1989. Variation in salmonid mitochondrial DNA: evolutionary constraints and mechanisms of substitution // J. Mol. Evol. Vol. 29. P. 233–245.
- Urawa S., Ueno Y., Ishida Y., Takagi S., Winans G., Davis N. 1998. Genetic stock identification of young chum salmon in the North Pacific in the North Pacific Ocean and adjacent seas // NPAFC Doc. № 336. 9 p.
- Urawa S., Kawana M., Anma G., Kamei Y., Shoji T., Fukuwaka M., Munk K., Myers K.W., Farley E.V.Jr. 2000. Geographical origin of high seas chum salmon determined by genetic and thermal otolith markers // NPAFC Bull. № 2. P. 283–290.
- Urawa S., Azumaya T., Crane P.A., Seeb L.W. 2004. Origin and distribution of chum salmon in the Bering Sea during the early fall of 2002: estimates by allozyme analysis // NPAFC Doc. 11 p.

Urawa S., Kawana M., Azumaya T., Grane P.A., Seeb L.W. 2005. Stock-specific ocean distribution of immature chum salmon in the summer and early fall of 2003: estimates by allozyme analysis // NPAFC Doc. № 896. 14 p.

Wilmot R.L., Everett R.J., Spearman W.J., Baccus R., Varnavskaya N.V., Putivkin S.V. 1994. Genetic stock structure of Western Alaska chum salmon and a comparison with Russian Far East stocks // Can. J. Fish Aquat. Sci. Vol. 51 (Suppl.). P. 84-94.

Wilmot R.L., Kondzela C.M., Guthrie III C.M., Moles A., Martinson E., Helle J.H. 1999. Origin of

sockeye and chum salmon seized from the Chinese vessel Ying Far // NPAFC Doc. № 440, 20 p.

Yoon M., Brykov V., Varnavskaya N., Seeb L.W., Urawa S., Abe S. 2004. Mitochondrial DNA analysis of genetic variation in the Pacific Rim populations of chum salmon // NPAFC Doc. № 792. 25 p.

Yoon M., Sato S., Seeb J.E., Wilmot R.L., Urawa S., Urano A., Abe S. 2005. Genetic variation among chum salmon populations in the Pacific Rim inferred from the mitochondrial and microsatellite DNA analyses // NPAFC Doc. № 898. 20 p.