

УДК 575: 597.553.2

ПОЛИМОРФИЗМ мтДНК ГОРБУШИ КАМЧАТКИ И ОСТРОВА САХАЛИН

Н. Ю. Шпигальская, Вл. А. Брыков*, А. Д. Кухлевский*



Н. с., Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии

683038 Петропавловск-Камчатский, Набережная, 18

Тел., факс: (415-2) 41-27-01; (415-22) 5-25-92

E-mail: shpigalskaya.n.u@kamniro.ru

*Зав. лаб.; н. с., Институт биологии моря, РАН

690041 Владивосток, Пальчевского, 17

Тел., факс: (423-2) 31-04-19

E-mail: vladbrykov@hotmail.com

ГОРБУША, МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК, МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Проанализирована изменчивость нуклеотидной последовательности фрагмента Cytb/D-loop мтДНК в выборках горбуши Камчатки и о. Сахалин. Анализ изменчивости длины рестриктивных фрагментов мтДНК позволил выявить 23 комбинированных гаплотипа. На основании полученных оценок гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, было отмечено, что для горбуши о. Сахалин эти показатели, в целом, выше, чем для большей части камчатских популяций. В результате применения методов F -статистики для оценки уровня генетической подразделённости исследуемых популяций, были показаны статистически значимые различия между большинством сравниваемых пар выборок. В структуре UPGMA- и NJ-дендрограмм, построенных на основе генетических расстояний по Нею, не обнаружено четкой дифференциации между популяциями Западной и Восточной Камчатки, в то же время популяции о. Сахалин занимают относительно обособленное положение. При анализе групп выборок, объединённых в соответствии с географическим положением, величина внутривидовой изменчивости составила 93,15%, доля, приходящаяся на межгрупповую компоненту, составила 3,81% и заметно превысила долю межпопуляционной дисперсии внутри групп — 3,04%. Полученные результаты свидетельствуют о генетической гетерогенности горбуши на изучаемой части ареала, а уровень межрегиональной изменчивости более значителен, чем межпопуляционной.

PINK SALMON mtDNA POLYMORPHISM IN KAMCHATKA AND SAKHALIN

N. Yu. Shpigalskaya, Vl. A. Brykov*, A. D. Kuchlevsky*

Scientist, 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: shpigalskaya@kamniro.ru

*Head of the laboratory; scientist, Institute of Marine Biology, Russian Academy of Sciences

Palchevsky St., 17, Vladivostok, 690041 Russia,

Tel., fax: (423-2) 31-04-19

E-mail: vladbrykov@hotmail.com

PINK SALMON, MITOCHONDRIAL DNA, INTERPOPULATION VARIATION

Nucleotide sequence variation in the part of Cytb/D-loop mtDNA have been analyzed in pink salmon samples from Kamchatka and Sakhalin. Analysis of the variation of mtDN restrict fragments length revealed 23 composite haplotypes. It was noted, basing on the haplotype and nucleotide diversity data, that Sakhalin pink salmon had generally higher indexes, than majority of Kamchatka populations had. Significant statistical differences were demonstrated in majority of pairs (pairs of samples) compared, when using the F -statistics method for estimation of the structural genetic level in studied populations. There were no clear differences revealed between populations of West and East Kamchatka in the structure of UPGMA- and NJ-joint-trees, built on the base of Nei's genetic distances; the Sakhalin populations demonstrated relatively isolated position. In the analysis of groups of samples, united according to the geographical position, the intrapopulation variation were 93,15%, the intergroup component was 3,81%, and it was visibly higher, than the interpopulation dispersion in the groups (3,04%). The results we have obtained can indicate of pink salmon genetic heterogeneity in the studied part of the areal, and of the higher level of inter-regional variation, comparing it to the interpopulation level.

ДНК митохондрий животных — замкнутая кольцевая молекула, содержащая обычно не более 20 000 пар нуклеотидов (Алтухов и др., 2004). При определении полной нуклеотидной последовательности мтДНК у позвоночных обнаружены 37 структурных генов (два рибосомальных гена, 22 гена транспортных РНК, 13 генов, кодирующих белки)

и некодирующая контролирующая область, участвующая в репликации и называемая D-петлей (Ferris, Berg, 1987). Контролирующая область состоит из центральной консервативной последовательности, которая фланкируется, как правило, полиморфными доменами, содержащими тандемные повторы от четырех до сотен пар оснований.

Тандемные повторы мтДНК часто высокополиморфны. Подобная организация генов мтДНК была выявлена и у рыб рода *Oncorhynchus* (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 определяет быстрые изменения частот гаплотипов мтДНК в результате случайного дрейфа генов и эффекта «горлышка бутылки» при резком сокращении численности популяции (Алтухов и др., 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, обусловленная более интенсивными мутационным процессом и дрейфом, выше, чем у ядерных 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 по эволюции и филогении (Avise, 1994, 2000; Брыков, 2001; Гречко, 2002; и т. д.), в анализе популяционной структуры и исторической филогеографии вида (Полякова и др., 1996; Seeb et al., 1998; Брыков и др., 1999а,б; Брыков, 2001; Gharrett et al., 2001а,б; Churikov et al., 2001; Churikov, Gharrett, 2002; и т. д.).

Важная особенность анализа мтДНК состоит в том, что в отличие от аллелей белковых генов и сателлитной ДНК, гаплотипы мтДНК можно связать друг с другом сетью последовательных эволюционных превращений — минимальное число пошаговых мутационных изменений, необходимых для взаимопревращений гаплотипов через появление/утрату рестрикционных сайтов или любые другие изменения последовательности нуклеотидов (Алтухов и др., 2004). С учетом данных по всем использованным рестриктазам или по нуклеотидной последовательности, можно таким образом выстроить филогению (генеалогию) комплексных (или комбинированных) гаплотипов (Брыков, 2001; Чуриков, 2001). Молекулярные расстояния между гаплотипами мтДНК можно включать в оценки генетической дифференциации (Excoffier et al.,

1992). На основе филогении гаплотипов возможно получить дополнительную информацию и в отношении генетического родства и исторических связей между популяциями и видами.

Успехи анализа популяционной структуры с использованием молекулярно-генетических методов обусловлены, прежде всего, тем, что известны механизмы и закономерности наследуемости большинства молекулярных маркеров. Кроме того, эти признаки практически не подвержены влиянию факторов внешней среды. Использование данных методов основано на концепции, согласно которой, если внутривидовые группировки оказываются частично или полностью изолированными, то в них накапливаются генетические различия как следствие стохастических процессов (дрейфа) и/или отбора при наличии разнонаправленных факторов (Алтухов и др., 1997; Алтухов, 2003). Эмпирическое подтверждение существования в пределах видов генетически отличающихся, репродуктивно изолированных единиц, дает основание для утверждения, что успех краткосрочной стратегии управления ресурсами и долговременных целей сохранения видов зависит от наличия, наряду с демографическими и экологическими данными, информации о генетической структуре вида (Алтухов и др., 1997; Алтухов и др., 2004).

Исследования популяционной структуры животных и, в частности, рыб имеют важное теоретическое и практическое значение, что связано, в первую очередь, с тем, что популяции являются, как правило, единицей хозяйственной деятельности. Поэтому комплекс мероприятий и технологических подходов, направленных на рациональное использование природных ресурсов, включает необходимость знания популяционной структуры видов. Если промысловая нагрузка на единицы, входящие в состав стада, неравномерна, то возможны ситуации, когда отдельные самовоспроизводящиеся элементы не смогут поддерживать свою численность на необходимом для выживания уровне.

Известно, что как численность, так и динамика демографических показателей в разных участках ареала видов рыб могут значительно различаться. Ярким примером может служить горбуша *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum), непрерывающиеся поколения которой (линии), возвращающиеся на нерест в четные и нечетные годы, могут в одной и той же реке различаться по численности на порядки величин. Такого рода закономерности, очевидно, определяются существованием в пределах вида в разной степени экологически и генетически отличающихся самостоятельных единиц — популяций и субпопуляций.

В результате анализа изменчивости аллельных частот аллозимных локусов было установлено, что в целом для горбуши характерна слабая пространственная дифференциация: региональные количественные оценки степени генетической дивергенции у горбуши в два–пять раз ниже, чем у других видов рода *Oncorhynchus* (Животовский и др., 1989; Алтухов и др., 1997; Алтухов и др., 2004). Оценки генетической дифференциации горбуши в азиатской части ареала на основе полиморфизма микросателлитных локусов ядерной ДНК показали, что представление о невысокой степени генетической дифференциации азиатской горбуши, сформировавшееся на основе изучения аллозимов, подтверждается и на уровне микросателлитной ДНК (Салменкова и др., 2006).

Безусловно, высокая промышленная значимость данного вида определяет необходимость не только стабильного мониторинга популяционных процессов, но и достаточно точного прогнозирования численности нерестовых популяций, что, в свою очередь, ставит задачи идентификации региональных комплексов и наиболее крупных популяционных систем в смешанных морских скоплениях в период нагула и преднерестовых миграций.

Вышеизложенное позволило определить цель исследования — выявление и оценка уровня полиморфизма мтДНК горбуши как маркера для идентификации региональной принадлежности смешанных морских скоплений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для настоящей работы послужили выборки из семи камчатских популяций горбуши и трех популяций о. Сахалин, собранные сотрудниками различных лабораторий ФГУП «КамчатНИРО» и лаборатории генетики Института Биологии моря (ИБМ, г. Владивосток) в период полевых исследований 2008 г. Локализация сбора проб представлена на рис. 1.

Образцы ткани сердечной мышцы горбуши извлекали из свежельвовленных рыб и фиксировали в этаноле. Объем каждой из исследованных выборок составлял 50 экз. Исключением является выборка из р. Водопадная, объем которой был 40 экз. Таким образом, общее количество включенных в генетический анализ на основе изменчивости мтДНК особей составило 490 экз. (7 выборок из рек Камчатки и 3 — о. Сахалин).

Тотальную ДНК выделяли из ткани сердечной мышцы стандартным способом с использованием метода протеиназного гидролиза в присутствии додецилсульфата натрия с последующим высаливани-

ем белков, удалением их вместе с клеточными обломками центрифугированием и осаждением ДНК из супернатанта изопропанолом (Sambrook et al., 1989).

Изменчивость структуры мтДНК исследовали, используя рестрикционный анализ фрагмента *Cytb/D-loop* (рис. 2). Фрагмент мтДНК горбуши амплифицировали посредством полимеразной цепной реакции (PCR Technology, 1989) с использованием праймерных последовательностей, разработанных на других видах лососей — микиже, *Oncorhynchus mykiss*, и кижуче, *Oncorhynchus kisutch* (Zardoya et al., 1995; Gharrett et al., 2001a), и позволяющих амплифицировать фрагменты мтДНК, почти идентичные по длине у всех тихоокеанских лососей.

Обозначения праймерных последовательностей, использованных нами при амплификации, приведены ниже:

Cytb/D-loop

5' TGAA(G/A)ACCACCGTTGTTATTC AA 3'

5' TAGGGCCTCTCGTATAACCG 3'

Длина амплифицированного фрагмента составляет около 2700 пар нуклеотидов (пн) (Gharrett et al., 2001a).

Изменчивость нуклеотидной последовательности анализировали, используя набор рестриктных ферментов: *Dde I*, *Hin6 I*, *Hinf I*, *Msp I*, *Rsa I*, *Sfr*13 I.

После реакции эндонуклеазного гидролиза пробы подвергали электрофорезу в 1,8–2,0% агарозном геле (или 1,5% SynerGel) в трис-боратном буфере. Для определения молекулярной массы образующихся фрагментов использовали маркерный набор фрагментов ДНК, кратных 100 парам оснований. Фрагменты ДНК в геле окрашивали эти-

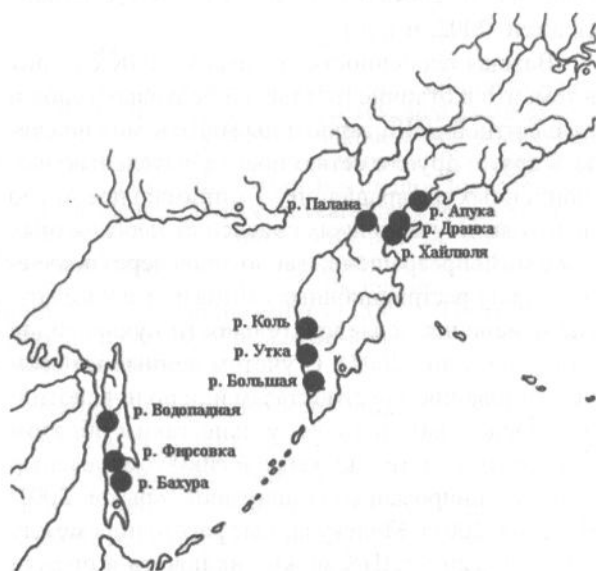


Рис. 1. Локализация сбора проб горбуши в 2008 г.

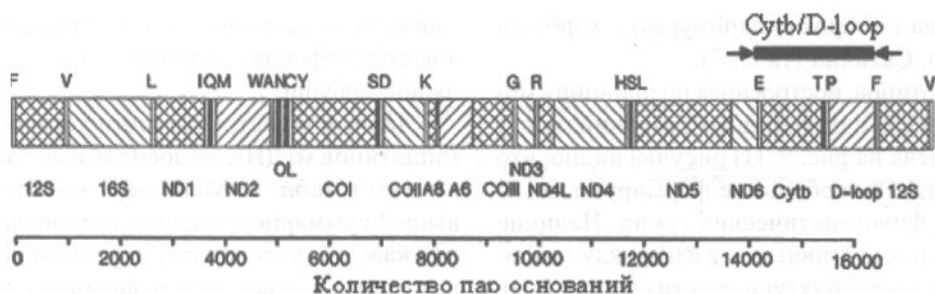


Рис. 2. Расположение амплифицированного участка мтДНК горбуши относительно линейной генной карты митохондриального генома (по Zardoya et al., 1995)

диумбромидом и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Результаты анализа изменчивости длины рестриктных фрагментов мтДНК каждой особи по всем рестрикционным сайтам объединяли, получая, таким образом, комбинированные гаплотипы (в дальнейшем — гаплотипы G1–G23).

Оценку количества замен оснований на нуклеотидный сайт и их стандартные отклонения между гаплотипами рассчитывали, используя пакет программ REAP (McElroy et al., 1992). Нуклеотидную дивергенцию между всеми парами гаплотипов определяли с помощью программы D, а дивергенцию между всеми парами популяций — с помощью программы DA (McElroy et al., 1992). Нуклеотидную (h) и гаплотипическую (p) величины разнообразия рассчитывали по Нею (Nei, Tajima, 1983; Nei, 1987) в пакетах программ REAP. Оценку величины дивергенции между выборками и их стандартные ошибки оценивали по Нею и Ли (Nei, Li, 1979). Полученная в REAP матрица количественных значений дивергенции между популяциями использовалась для кластерного анализа (программа NTSYS) и построения дендрограмм (UPGMA — “Unweighted Pair Group Method, Arithmetic Average” и NJ — “Neighbor Joining”) (Rolf, 1990).

Для оценки значимости межпопуляционных различий частот гаплотипов использовали методы F -статистики в пакете программ Arlequin2000 (Schneider et al., 2000).

Для определения возможности использования полученных результатов в целях идентификации региональной принадлежности смешанных морских уловов проводили анализ искусственно заданных смешанных выборок по «нулевому» сценарию в программе SPAM (Masuda et al., 1991; Pella et al., 1996).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полиморфизм фрагмента мтДНК Cytb/D-loop в популяциях горбуши

Длина амплифицированного фрагмента Cytb/D-loop составляет 2720 пар нуклеотидов (пн), или

около 15% всего митохондриального генома горбуши (Gharrett et al., 2001a). В результате ПДРФ-анализа было выявлено 65 рестриктных сайтов, что соответствует примерно 1,5% митохондриального генома. Большая часть рестриктных сайтов оказались полиморфными — 36 (55,4% от общего количества исследованных сайтов).

Варианты расщепления фрагмента Cytb/D-loop мтДНК горбуши 6-ю рестриктазами приведены в табл. 1. Примеры электрофоретического разделения продуктов ПДРФ-анализа в SynerGel или в агарозном геле представлены на рис. 3–8.

Различия между выявленными вариантами гаплотипов по количеству, размеру и положению рестрикционных фрагментов мтДНК, вероятно, обусловлены мутационным замещением нуклеотидов (инсерции, делеции или инверсии) и образованием или исчезновением в указанных участках рестриктного сайта, опознаваемого соответствующей эндонуклеазой (Алтухов и др., 1997; Чуриков, 2001; Алтухов, Салменкова, 2002). Кроме того, следует отметить, что в ряде случаев нами было выявлено наличие вставки, локализованной в D-петле, размером ≈ 200 пн.

Данные по изменчивости частот выявленных вариантов гаплотипов являются основой для анализа популяционных различий и, при условии одинаковой скорости накопления мутаций в рассматриваемых локальностях, могут свидетельствовать о различном возрасте популяций, а при подтверждении достаточно значимой глубины межпопуляционной дивергенции — указывать на принадлежность к различным потокам видового расселения.

Гаплотипическая изменчивость горбуши Камчатки и о. Сахалин

Объединенные данные по всем сайтам рестрикции, полученные в результате анализа фрагмента Cytb/D-loop мтДНК с использованием шести эндонуклеаз, позволили выявить 23 комбинирован-

ных гаплотипа (composite haplotypes) у горбуши Камчатки и о. Сахалин (табл. 2).

Сеть гаплотипов, построенная по принципу минимального числа нуклеотидных различий между ними, приведена на рис. 9. Из рисунка видно, что гаплотипы мтДНК горбуши не формируют четко выраженных филогенетических групп. Наличие возможных альтернативных связей между гаплотипами (петлевые структуры в сети) может быть результатом гомоплазии, т. е. повторных и обратных мутаций в мтДНК (Churikov et al., 2001). Отсутствие явно выраженной картины «звездчатой» радиации, вероятно, может свидетельствовать о различном происхождении исследованных популя-

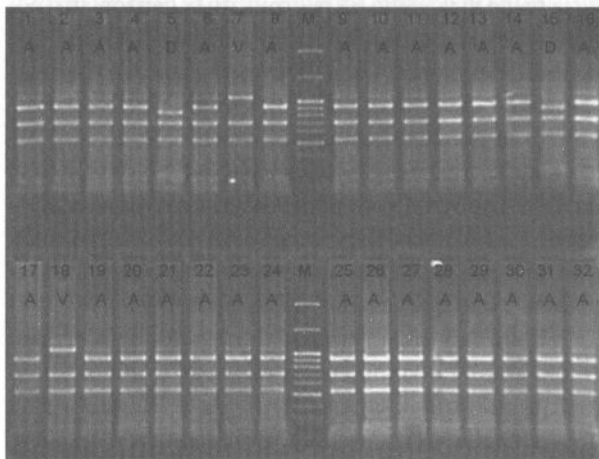


Рис. 3. Примеры электрофоретического разделения в азарозном геле рестриктных фрагментов мтДНК горбуши. Фрагмент ДНК — *Cytb/D-loop*, эндонуклеаза рестрикции *Hin* 6 I. А, D, V — варианты гаплотипов, М — маркер молекулярного веса, 1–32 — номера исследованных особей

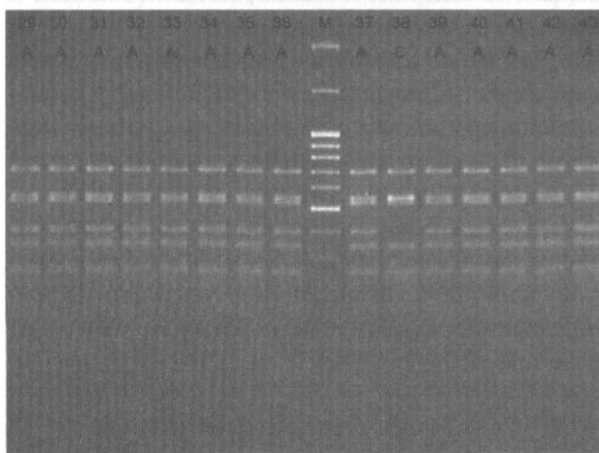


Рис. 4. Примеры электрофоретического разделения в азарозном геле рестриктных фрагментов мтДНК горбуши. Фрагмент ДНК — *Cytb/D-loop*, эндонуклеаза рестрикции *Hinf* I. А, С — варианты гаплотипов, М — маркер молекулярного веса, 29–43 — номера исследованных особей

ций и соответственно об отсутствии единого предкового генофонда камчатских и сахалинских популяций горбуши.

Данные по встречаемости комбинированных гаплотипов мтДНК — абсолютные частоты, приведены в табл. 3. Меньшее, чем было указано выше? суммарное число исследованных особей для каждой локальности обусловлено тем, что в некоторых случаях амплификация исследуемого фрагмента оказалась затруднена, вероятно, в связи с низким качеством выделенной тотальной ДНК. Распределения относительных частот гаплотипов в исследованных популяциях горбуши отражены на рис. 10.

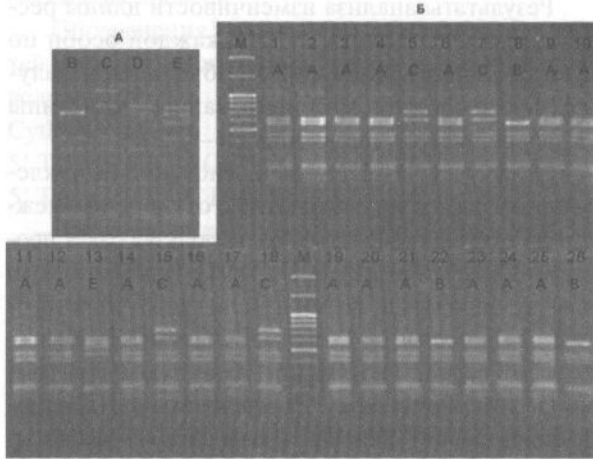


Рис. 5. Примеры электрофоретического разделения в SynerGel (А) и азарозном геле (Б) рестриктных фрагментов мтДНК горбуши. Фрагмент ДНК — *Cytb/D-loop*, эндонуклеаза рестрикции *Rsa* I. А, В, С, D, Е — варианты гаплотипов, М — маркер молекулярного веса, 1–26 — номера исследованных особей

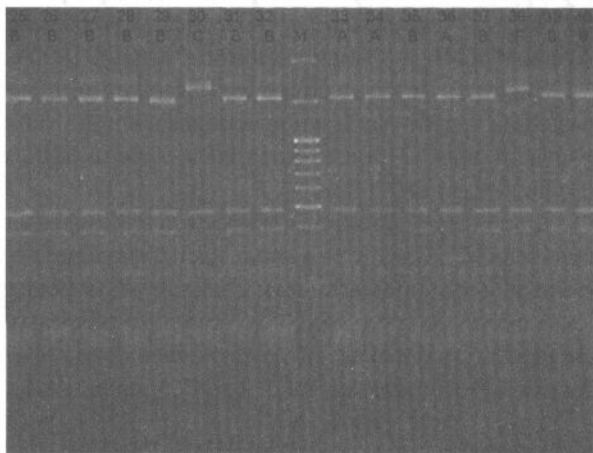


Рис. 6. Примеры электрофоретического разделения в азарозном геле рестриктных фрагментов мтДНК горбуши. Фрагмент ДНК — *Cytb/D-loop*, эндонуклеаза рестрикции *Cfr* 13 I. А, В, С, F — варианты гаплотипов, М — маркер молекулярного веса, 25–40 — номера исследованных особей

Таблица 1. Варианты расщепления фрагмента Svb/D-loop мтДНК горбуши 6-ю рестриктазами. Длины рестриктивных фрагментов даны в парах нуклеотидов (пн). Жирным шрифтом выделены варианты, выявленные при наличии вставки ≈ 200 пн

Hin 6 I				Hinf I				Rsa I				Cfr13 I				Msp I						Dde I						
A	D	V	C	A	A	C	C	A	B	C	D	E	A	B	C	F	A	B	C	F	G	I	J	V	A	C	D	V
930	-	1130	690	690	690	580	600	780	-	600	600	600	-	-	-	1850	-	-	-	1308	-	-	-	-	-	630	540	540
-	720	-	540	580	580	580	580	600	580	580	580	580	1650	-	-	-	-	-	-	-	-	-	820	-	-	-	-	475
690	690	690	520	520	-	575	-	-	575	-	-	510	480	480	480	480	690	690	690	690	690	690	690	-	-	325	310	325
505	505	505	380	380	-	-	-	445	445	445	445	445	380	380	380	380	-	495	495	495	495	495	495	-	305	310	310	310
-	210	-	340	340	340	340	340	395	395	395	395	395	270	-	-	-	-	480	-	-	-	-	360	-	305	305	305	305
205	205	205	250	250	250	250	250	395	395	395	395	395	210	210	210	210	-	-	-	-	-	-	360	-	275	275	275	275
145	145	145	-	-	-	-	-	300	300	300	300	110	-	-	-	-	-	-	-	-	350	-	-	-	205	205	205	205
140	140	140	-	-	200	200	200	200	200	200	200	200	110	-	-	-	-	-	-	-	325	-	-	-	170	170	170	170
105	105	105	-	-	195	195	195	195	195	195	195	195	110	-	-	-	325	325	325	325	325	325	325	-	170	170	170	170
-	-	-	-	-	190	190	190	190	190	190	190	190	110	-	-	-	-	-	-	-	226	226	226	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	190	190	190	190	190	190	190	190	110	-	-	-	226	226	226	226	226	226	226	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	205	205	205	205	205	205	205	-	125	125	125	125
-	-	-	-	-	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	176	176	176	176	176	176	176	-	80	80	80	80
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	155	155	155	155	155	155	155	-	80	80	80	80
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	145	-	-	-	70	70	70	70
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	121	121	121	-	60	60	60	60
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65	65	65	-	60	60	60	60
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50	-	60	60	60	60
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50	-	60	60	60	60

Наибольшее число вариантов комбинированных гаплотипов выявлено в выборках сахалинской горбуши — р. Бахура (12 гаплотипов), р. Водопадная (10 гаплотипов), р. Фирсовка (10 гаплотипов).

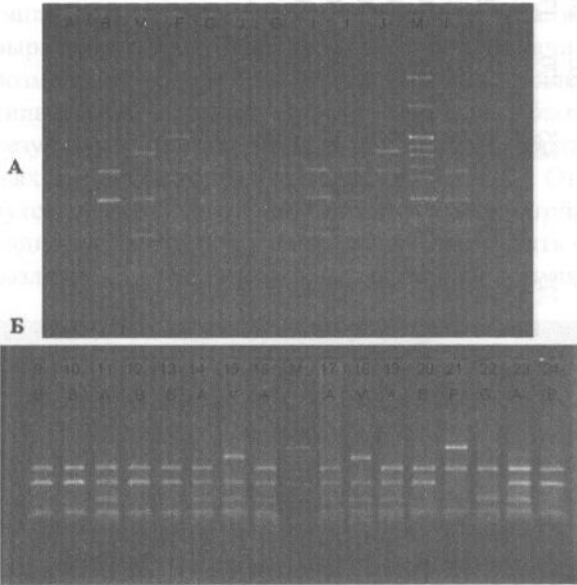


Рис. 7. Примеры электрофоретического разделения в SynerGel (А) и азарозном геле (Б) рестриктных фрагментов мтДНК горбуши. Фрагмент ДНК — *Cytb/D-loop*, эндонуклеаза рестрикции *Msp I*. А, В, F, G, I, J, V — варианты гаплотипов, М — маркер молекулярного веса, 9–24 — номера исследованных особей

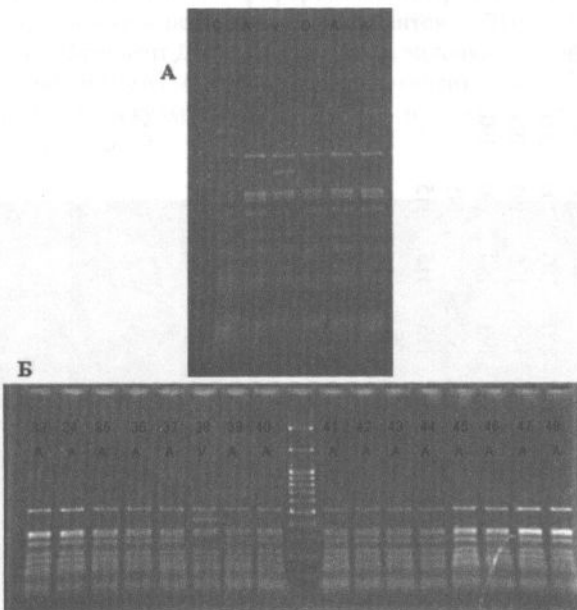


Рис. 8. Примеры электрофоретического разделения в SynerGel (А) и азарозном геле (Б) рестриктных фрагментов мтДНК горбуши. Фрагмент ДНК — *Cytb/D-loop*, эндонуклеаза рестрикции *Dde I*. А, С, D, V — варианты гаплотипов, М — маркер молекулярного веса, 33–48 — номера исследованных особей

В выборках из рек Камчатки количество гаплотипов изменяется в пределах от 6 до 9.

В результате анализа распределения частот комбинированных гаплотипов удалось обнаружить, что только четыре из них являются общими для всех исследованных выборок. Гаплотип G4, который можно охарактеризовать как доминирующий, представлен во всех исследованных популяциях со средней частотой 0,46. Его частота варьировала от 0,27 (р. Большая) до 0,80 (р. Утка) (рис. 10). Вторым по встречаемости является гаплотип G1, его средняя частота — 0,21, диапазон варьирования от 0,02 (р. Утка) до 0,34 (р. Бахура), причем если в камчатских выборках его средняя частота была 0,14, то в сахалинских он выявлен с заметно более высокой частотой — 0,35. Частота третьего общего для всех локальностей гаплотипа G3 изменялась от 0,07 (р. Дранка) до 0,30 (р. Большая) и в среднем составила 0,14. Наименее представлен четвертый общий гаплотип G17, его средняя частота составила всего 0,05, диапазон варьирования — от 0,02 (р. Хайлюля) до 0,11 (р. Дранка).

Восемь гаплотипов обнаружены только лишь в какой-либо одной из 10 выборок, причем G15, G18, G19, G22 оказались свойственны выборкам о. Сахалин, а G8, G11, G12 и G13 — только камчатским популяциям горбуши. Вероятно, вышеперечислен-

Таблица 2. Выявленные комбинированные гаплотипы мтДНК горбуши Камчатки и о. Сахалин

Комбинированный гаплотип	<i>Cytb/D-loop</i>					
	<i>Hin6 I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Cfr13 I</i>	<i>Msp I</i>	<i>Dde I</i>
G1	A	A	A	A	A	A
G2	A	A	B	A	A	A
G3	A	A	A	B	A	A
G4	A	A	A	B	B	A
G5	A	A	A	A	B	A
G6	A	A	A	C	A	A
G7	A	A	A	B	F	A
G8	A	A	B	B	A	A
G9	A	A	A	A	I	A
G10	A	A	A	A	F	A
G11	A	A	A	A	J	A
G12	A	A	A	B	I	A
G13	A	A	A	A	A	C
G14	A	A	B	A	G	A
G15	A	A	D	B	A	A
G16	A	A	E	B	B	A
G17	V	A	C	F	V	A
G18	V	A	C	F	V	D
G19	V	A	C	C	V	A
G20	V	C	C	F	V	V
G21	D	A	C	F	V	A
G22	D	A	A	F	V	A
G23	V	C	C	F	V	A

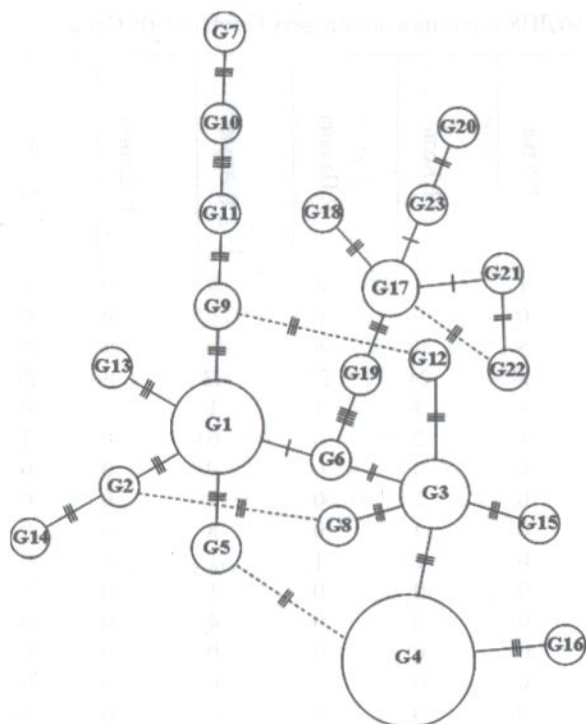


Рис. 9. Генеалогическая сеть гаплотипов горбуши, построенная по принципу минимального числа нуклеотидных замен и показывающая мутационные различия между гаплотипами. Размер окружности приблизительно отражает частоту встречаемости данного гаплотипа во всех исследованных популяциях. Число поперечных штрихов на ветвях обозначает число нуклеотидных замен. Пунктиром обозначены альтернативные связи между гаплотипами

ные восемь гаплотипов можно охарактеризовать как уникальные молекулярные маркеры, хотя в данном случае нельзя не учитывать относительно небольшие объёмы исследованных выборок, особенно при условии поставленных задач популяционных исследований. Однако следует принимать во внимание, что редкие гаплотипы, являясь дискриминирующими, могут служить основой для идентификации особей соответствующих локальностей, что определяет необходимость продолжения и расширения поисковых исследований в данной области.

Значения гаплотипической и нуклеотидной изменчивости в популяциях приведены в табл. 4. Из представленных данных видно, что, в целом, для горбуши о. Сахалин характерны более высокие показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, чем для большинства камчатских популяций. Исключением являются выборки из рек Апука, Дранка и Коль, в структуре мтДНК которых, также как и во всех сахалинских выборках, выявлены редкие гаплотипы, с невысокой частотой встречающиеся только в этих локальностях.

Внутри- и межпопуляционная изменчивость частот гаплотипов мтДНК

В табл. 5 представлены результаты применения методов *F*-статистики для оценки уровня генетической подразделённости исследуемых популяций. В

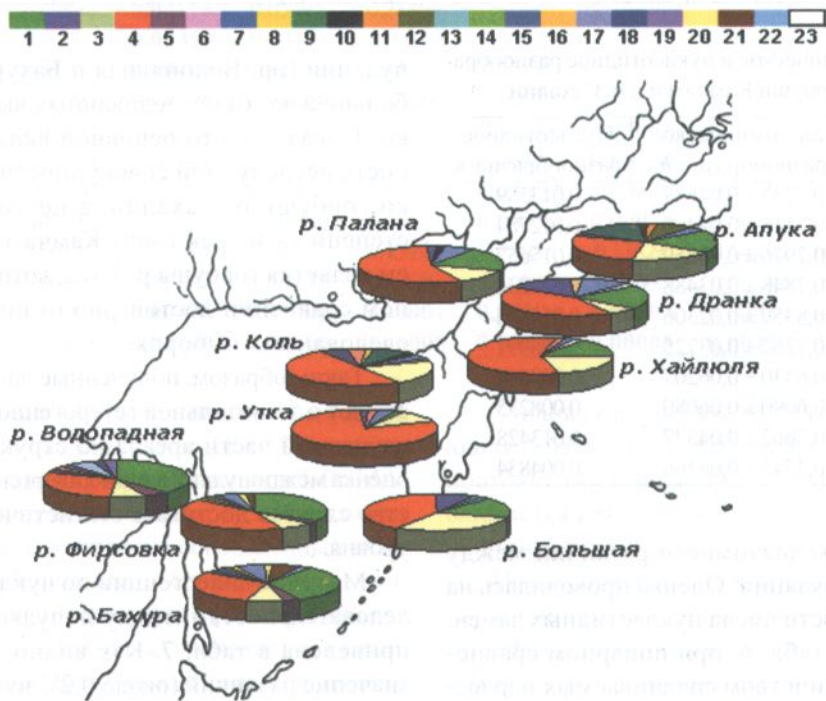


Рис. 10. Распределение частот гаплотипов G1–G23 в популяциях горбуши Камчатки и о. Сахалин (1–23 — соответствующие гаплотипы G1–G23)

Таблица 3. Встречаемость 23-х комбинированных гаплотипов мтДНК горбуши в популяциях Камчатки и о. Сахалин

Комбинированный гаплотип	Р. Водопадная	Р. Бахура	Р. Фирсовка	Р. Большая	Р. Утка	Р. Коль	Р. Палана	Р. Алука	Р. Дранка	Р. Хайлюля
G1	14	16	17	8	1	1	10	9	9	8
G2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
G3	3	4	4	14	5	10	6	9	3	10
G4	11	15	21	19	40	24	27	13	19	29
G5	1	1	0	4	1	3	1	1	7	0
G6	1	0	1	0	1	2	0	0	0	1
G7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
G9	0	0	0	0	0	4	0	8	0	0
G10	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
G11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
G12	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
G13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
G14	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
G15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
G16	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
G17	2	3	2	1	2	2	3	2	5	1
G18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G20	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
G21	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0
G22	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G23	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Исследовано особей	37	49	50	47	50	48	48	48	46	50

Таблица 4. Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие в популяциях горбуши Камчатки и о. Сахалин

Популяция	Гаплотипическое разнообразие h	Нуклеотидное разнообразие π
Р. Водопадная	0,7733 ± 0,04889	0,013589
Р. Фирсовка	0,7118 ± 0,04406	0,012784
Р. Бахура	0,7976 ± 0,03859	0,015657
Р. Коль	0,7848 ± 0,03488	0,014236
Р. Алука	0,8359 ± 0,02306	0,014866
Р. Большая	0,7262 ± 0,03725	0,008991
Р. Палана	0,6330 ± 0,06207	0,009844
Р. Хайлюля	0,6090 ± 0,06080	0,008235
Р. Дранка	0,7662 ± 0,04377	0,013428
Р. Утка	0,3543 ± 0,08366	0,004834

табл. 6 приведены значимости различий между всеми парами популяций. Оценка проводилась на основе изменчивости числа нуклеотидных замен.

Как видно из табл. 6, при попарном сравнении между большинством сравниваемых пар выборок горбуши о. Сахалин и Камчатки обнаружены значимые различия. Две сахалинские по-

пуляции (рр. Водопадная и Бахура) отличны от большей части исследованных выборок Камчатки. Показано, что основной вклад в гетерогенность исследуемой совокупности вносят выборки горбуши о. Сахалин, в несколько меньшей степени — из рек п-ова Камчатка. Исключением является горбуша р. Утка, которая при попарном сравнении достоверно отлична от всех исследованных выборок.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительной гетерогенности горбуши на изучаемой части ареала по структуре мтДНК, а оценка межпопуляционной дивергенции в большинстве случаев достигает статистически значимого уровня.

Матрица дивергенции по нуклеотидным последовательностям между популяциями горбуши приведена в табл. 7. Как видно, максимальное значение различий (около 0,2% нуклеотидных замен) прослеживается между выборкой из р. Утка и остальными.

Таблица 5. Значения *Fst* при попарном сравнении выборок из популяций горбуши Камчатки и о. Сахалин (число пермутаций 3024)

Популяции	Р. Водопадная	Р. Коль	Р. Алука	Р. Большая	Р. Фирсовка	Р. Бахура	Р. Палана	Р. Хайлюля	Р. Дранка
Р. Коль	0,08908								
Р. Алука	0,02981	0,06488							
Р. Большая	0,04813	0,00318	0,05451						
Р. Фирсовка	-0,00918	0,03580	0,02730	0,00378					
Р. Бахура	-0,01258	0,06678	0,03884	0,03989	-0,00690				
Р. Палана	0,07136	-0,01352	0,07600	-0,00481	0,02134	0,05062			
Р. Хайлюля	0,10959	-0,01090	0,10385	-0,00042	0,04456	0,07964	-0,01235		
Р. Дранка	0,03204	0,01274	0,05986	0,01698	0,00603	0,01583	-0,00285	0,02381	
Р. Утка	0,29744	0,06755	0,26710	0,15312	0,20406	0,23199	0,07872	0,06968	0,12304

Таблица 6. Уровни значимости различий между выборками из популяций горбуши Камчатки и о. Сахалин на основе значений *Fst* (по материалам таблицы 5). Жирным шрифтом обозначены статистически значимые различия между парами популяций ($P < 0,05$)

Популяции	Р. Водопадная	Р. Коль	Р. Алука	Р. Большая	Р. Фирсовка	Р. Бахура	Р. Палана	Р. Хайлюля	Р. Дранка
Р. Коль	0,0007± 0,00050								
Р. Алука	0,0579± 0,00390	0,0046± 0,00130							
Р. Большая	0,0311± 0,00270	0,2982± 0,00750	0,0119± 0,00160						
Р. Фирсовка	0,6083± 0,00960	0,0417± 0,00360	0,0549± 0,00450	0,2886± 0,00740					
Р. Бахура	0,7385± 0,00900	0,0040± 0,00120	0,0251± 0,00260	0,0321± 0,00290	0,5679± 0,00980				
Р. Палана	0,0116± 0,00200	0,8413± 0,00740	0,0020± 0,00080	0,4826± 0,00710	0,1084± 0,00580	0,0205± 0,00330			
Р. Хайлюля	0,0010± 0,00060	0,7233± 0,00830	0,0003± 0,00030	0,3709± 0,00830	0,0367± 0,00310	0,0017± 0,00070	0,7233± 0,00710		
Р. Дранка	0,0684± 0,00410	0,1709± 0,00740	0,0063± 0,00140	0,1349± 0,00680	0,2595± 0,00730	0,1382± 0,00660	0,4433± 0,00840	0,1012± 0,00630	
Р. Утка	0,0000± 0,00000	0,0047± 0,00140	0,0000± 0,00000	0,0000± 0,00000	0,0000± 0,00000	0,0000± 0,00000	0,0053± 0,00150	0,0093± 0,00190	0,0000± 0,00000

Дендрограммы на основе матрицы нуклеотидной дивергенции представлены на рис. 11 и 12. При представлении полученных результатов в виде UPGMA-дендрограммы популяции горбуши о. Сахалин оказались объединены в достаточно обособленный кластер. Камчатские популяции, в соответствии с уровнем нуклеотидной дивергенции, сформировали два кластера, каждый из которых включает выборки, имеющие относительно близкие значения данного показателя. Наиболее обособленное положение при кластеризации заняла выборка из р. Утка.

Сходная картина кластеризации, иллюстрирующая генетические различия между локальными популяциями горбуши Камчатки и о. Сахалин, наблюдается при использовании метода «присоединения к ближайшему соседу» (NJ) (рис. 12).

Можно отметить, что расположение популяций на дендрограммах не формирует четкую картину дифференциации популяций горбуши Западной и Восточной Камчатки на основе изменчивости структуры мтДНК, а популяции о. Сахалин занимают относительно обособленное положение.

Таблица 7. Матрица нуклеотидной дивергенции мтДНК между выборками горбуши

Популяции	Р. Водопадная	Р. Коль	Р. Алука	Р. Большая	Р. Фирсовка	Р. Бахура	Р. Палана	Р. Хайлоля	Р. Дранка
Р. Коль	0,00123264								
Р. Алука	0,00014684	0,00040067							
Р. Большая	0,00048502	0,00112361	0,00082079						
Р. Фирсовка	0,00002771	0,00097501	0,00038901	0,00008280					
Р. Бахура	0,00015419	0,00123768	0,00037342	0,00047492	0,00000650				
Р. Палана	0,00086712	0,00077713	0,00100232	0,00006438	0,00012198	0,00071139			
Р. Хайлоля	0,00128649	0,00121213	0,00143584	0,00001633	0,00033917	0,00109232	0,00011991		
Р. Дранка	0,00036326	0,00056573	0,00055977	0,00024073	0,00004122	0,00026670	0,00000390	0,00041238	
Р. Утка	0,00359473	0,00215592	0,00345335	0,00123162	0,00198963	0,00315178	0,00062203	0,00046567	0,00141440

Полученные данные были проанализированы также с использованием программы AMOVA (Analysis of Molecular Variance) в пакете программ Arlequin2000. В первом варианте анализировали всю совокупность выборок. Расчеты показали, что на долю внутривидовой генетической дисперсии приходится 94,11%, на долю межвидовой — 5,89%.

В другом варианте расчета популяции объединяли в три группы в соответствии с географической принадлежностью — Западная Камчатка, Восточная Камчатка и о. Сахалин. При таком объединении было выявлено, что величина изменчивости, приходящаяся на межгрупповую компоненту, составляет 3,81%, превышая долю межвидовой дисперсии внутри групп, которая составила 3,04%. Доля внутривидовой изменчивости (93,15%) незначительно уменьшается по сравнению с предыдущим вариантом анализа.

Исходя из того, что выявленная межгрупповая доля изменчивости превышает межвидовую оценку данного показателя внутри групп сахалинских и камчатских популяций, необходимо было оценить возможность региональной идентификации на основе выявленных частот комбинированных гаплотипов мтДНК. Был проведен симуляционный анализ выборок по «нулевому» сценарию, результаты которого представлены в табл. 8 и 9.

Показано, что вероятность идентификации камчатских популяций (за исключением р. Палана) достаточно высока, точность ее находится в пределах 70–86%. При рассмотрении популяций о. Сахалин, точность идентификации которых значительно ниже, можно отметить, что наибольшая часть «недостающих» процентов выпадает на генетически сходные популяции того же региона (табл. 8).

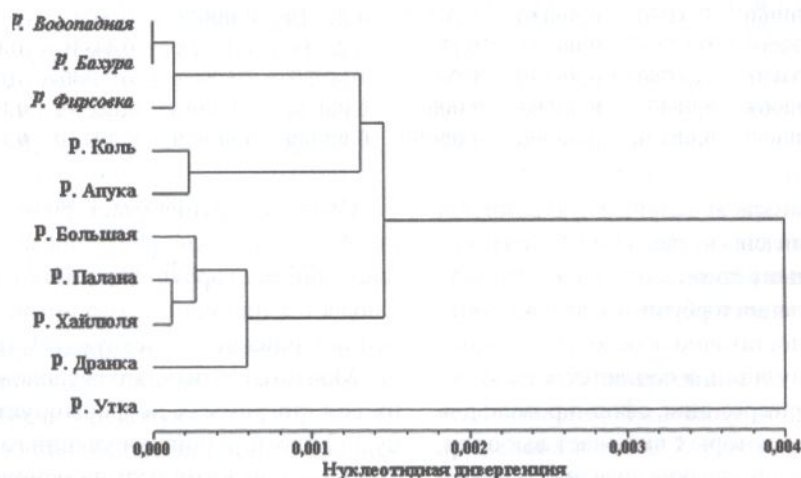


Рис. 11. UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая генетические различия между локальными популяциями горбуши Камчатки и о. Сахалин (обозначены курсивом)

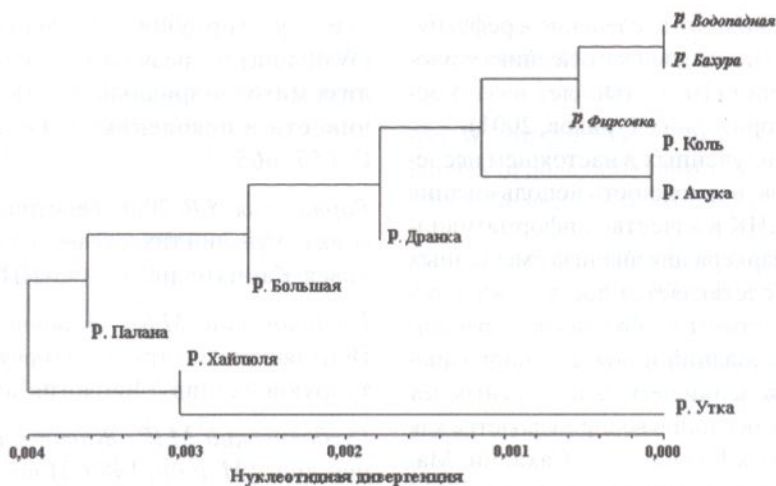


Рис. 12. NJ-дендрограмма, иллюстрирующая генетические различия между локальными популяциями горбуши Камчатки и о. Сахалин (обозначены курсивом)

Таблица 8. Оценка состава (%) симулированных смешанных выборок горбуши («нулевой» сценарий)

Популяция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Р. Водопадная	48,30	9,66	22,78	1,39	0,38	0,60	0,70	2,66	0,56	1,06
2. Р. Фирсовка	12,29	58,72	13,24	3,26	0,07	0,50	0,50	5,62	2,32	1,02
3. Р. Бахура	25,79	13,86	47,65	1,95	0,00	0,00	0,30	0,64	0,76	0,79
4. Р. Палана	0,93	2,10	4,01	57,25	0,77	0,48	2,62	5,89	2,87	1,85
5. Р. Коль	0,12	0,08	0,00	1,72	85,70	0,40	0,00	0,07	0,00	4,92
6. Р. Утка	1,64	3,78	2,03	8,15	5,60	86,22	2,20	12,09	4,28	1,09
7. Р. Большая	1,15	0,29	3,13	5,17	2,28	2,17	77,33	2,69	6,14	4,40
8. Р. Хайлюля	5,02	10,30	2,32	15,12	1,93	6,90	5,38	70,11	2,34	1,37
9. Р. Дранка	4,46	0,01	4,15	5,97	1,74	2,69	10,21	0,00	80,72	2,31
10. Р. Алука	0,00	0,00	0,00	0,01	0,92	0,02	0,00	0,20	0,00	80,29
Неизвестные	0,29	1,20	0,68	0,00	0,61	0,02	0,75	0,02	0,00	0,89
Всего	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Таблица 9. Оценка регионального состава (%) симулированных смешанных выборок горбуши («нулевой» сценарий)

Регион	1	2
1. О. Сахалин	86,51	1,51
2. Полуостров Камчатка	12,75	98,18
Неизвестные	0,74	0,31
Всего	100,00	100,00

При оценке регионального состава симулированных выборок по нулевому сценарию выявлено, что точность идентификации в данном случае повышается до 98% для популяций Камчатки и до 86% для горбуши о. Сахалин (табл. 9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо подчеркнуть несомненное теоретическое и практическое значение исследований внутривидовой организации такого важного в промысловом отношении вида как горбуша, относительно невысокий уровень межпопуляционной из-

менчивости которого, по сравнению с другими видами тихоокеанских лососей, получал разные объяснения (Алтухов, 2004; Варнавская, 2006). Основные из них, это:

1) миграционные потоки, связанные с более слабым инстинктом хоминга у данного вида (гипотеза о существовании системы «флуктуирующих стад») (Глубоковский, Животовский, 1986; Глубоковский и др., 1989). Данная гипотеза вызвала ряд достаточно обоснованных возражений (Алтухов и др., 2004) и до настоящего времени представляется спорным моментом в оценке современной популяционной структуры горбуши;

2) стабилизирующий (балансирующий) отбор, поддерживающий на относительно сходном уровне частоты в ряде аллозимных локусов на больших участках ареала (Алтухов и др., 1987; Алтухов и др., 1997);

3) небольшой «возраст» и общее происхождение популяций горбуши, нерестящихся на недавно освободившихся ото льда обширных областях, от

прапопуляций, переживших оледенение в рефугиумах до отступления Винконсинского ледника и процессов реколонизации (10–12 тыс. лет назад) освобождающихся территорий (Чуриков, 2001).

На основании полученных в настоящем исследовании результатов, возможность использования полиморфизма мтДНК в качестве информативного регионального маркера для анализа смешанных уловов горбуши представляется достаточно перспективной, но существует необходимость расширения района исследований и обязательного анализа популяций поколений четных и нечетных лет таких значительных регионов воспроизводства как Западная и Восточная Камчатка, о. Сахалин, Магаданское побережье Охотского моря, Курильские и Японские острова.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам ФГУП «КамчатНИРО» Н.М. Кириас, И.В. Шатило, А.А. Ходько, И.Н. Кирееву, И.Н. Сиротенко, Д.С. Курносову, Е.Н. Збоевой за помощь в сборе генетических проб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алтухов Ю.П. 2003. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 431 с.

Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. 2002. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. Т. 38. № 9. С. 1173–1195.

Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л. и др. 2004. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. М.: Наука, 619 с.

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

Брыков В.А. 2001. Эволюция генома, изменчивость и дивергенция ДНК у морских животных: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: Ин-т общей генетики РАН, 48 с.

Брыков В.А., Полякова Н.Е., Скурихина Л.А. и др. 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. и др. 1999б. Популяционно-генетическая струк-

тура у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) по результатам рестриктазного анализа митохондриальной ДНК: динамика изменчивости в поколениях // Генетика. Т. 35. № 5. С. 657–665.

Варнавская Н.В. 2006. Генетическая дифференциация популяций тихоокеанских лососей. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 488 с.

Глубоковский М.К., Животовский Л.А. 1986. Популяционная структура горбуши: Система флуктуирующих стад // Биология моря. № 2. С. 39–44.

Глубоковский М.К., Животовский Л.А., Викторовский Р.М. и др. 1989. Популяционная организация горбуши // Генетика. Т. 25. № 7. С. 1275–1284.

Гречко В.В. 2002. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // Генетика. Т. 38. № 8. С. 1013–1033.

Животовский Л.А., Глубоковский М.К., Викторовский Р.М. и др. 1989. Генетическая дифференциация горбуши // Генетика. Т. 25. № 7. С. 1261–1274.

Полякова Н.Е., Скурихина Л.А., Кухлевский А.Д. и др. 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.

Салменкова Е.А., Гордеева Н.В., Омельченко В.Т. и др. 2006. Генетическая дифференциация горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) в азиатской части ареала // Генетика. Т. 42. № 10. С. 1371–1387.

Чуриков Д.Ю. 2001. Генеалогия гаплотипов митохондриальной ДНК у нескольких видов тихоокеанских лососей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: Санкт-Петербургский Гос. ун-т, 17 с.

Avise J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. N.Y.; London: Chapman and Hall, 511 p.

Avise J.C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard Univ. Press. Cambridge, MA, London, England. 447 p.

Brown W.M., George M., Wilson A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. US. Vol. 76. P. 1967–1971.

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.

- Churikov D.U., Matsuoka M., Luan X. et al. 2001. Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) // Mol. Ecol. Vol. 19. № 9. P. 2329–2339.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analyses of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics (US). V. 131. P. 479–491.
- 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.
- Ferris S.D., Sage R.D., Prager E.M. et al. 1983. Mitochondrial DNA evolution in mice // Genetics. Vol. 105. P. 681–721.
- Gharrett A.J., Gray A.K., Brykov V.A. 2001a. Phylogeographical analysis of mitochondrial DNA variation in Alaskan coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* // Fish. Bull. Vol. 99. P. 528–544.
- Gharrett A.J., Lane S., McGregor A.J., Taylor S.G. 2001b. Use the genetic marker to examine genetic interaction among subpopulations of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Genetica Vol. 111. P. 259–267.
- Masuda M., Nelson S., Pella J. 1991. The computer programs for computing conditional maximum likely estimates of stock composition from discrete characters // USA–Doc–NOAA NMFS Rep. Auke Bay Laboratory, Juneau, AK.
- McElroy D.M., Moran P., Bermingham E., Kornfield I. 1992. REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data // J. Heredity. Vol. 83. P. 153–158.
- 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.
- Nei M. Molecular evolutionary genetics. 1987. N.Y.: Columbia Univ. Press. 512 p.
- Nei M., Li W.-H. 1979. Mathematical model for shifting genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. Vol. 76. P. 5269–5273.
- Nei M., Tajima F. 1983. Maximum likelihood of the number of nucleotide substitution from restriction sites data // Genetics. Vol. 105. P. 207–217.
- Nei M., Tajima F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases // Genetics. Vol. 105. P. 207–217.
- PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. / Ed. Erlich H.A.. Stockton Press, 1989, 246 p.
- Pella J., Masuda M., Nelson S. 1996. Search algorithms for computing stock composition of mixture from traits of individuals by maximum likelihood // US. Dep. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS–AFSC–61. 68 p.
- Rolf F.J. 1990. NTSYS-ps: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version. 1.60. N.Y.: Exter Publ. Ltd.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1626 p.
- 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 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 // North Pacific Anadr. Fish Comm. Bull. Vol. 1. P. 300–318.
- 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.
- Zardoya R., Garrido-Pertierra A., Bautista J.M. 1995. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // J. Mol. Evol. Vol. 41. P. 942–951.