

УДК 575.174; 575.174.015.3; 597.553.2

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ РАННЕЙ РЕЧНОЙ ФОРМЫ НЕРКИ В БАССЕЙНЕ Р. ОЗЕРНОЙ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ****О.А. Пильганчук, Н.Ю. Шпигальская, В.А. Дубынин, О.Н. Сараванский, У.О. Муравская, Н.В. Варнавская**

*Н. с., зам. дир., вед. н. с., инж., мл. н. с., Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии*  
 683000 Петропавловск-Камчатский, Набережная, 18  
 Тел.: (4152) 22-68-33, 41-27-01  
 E-mail: pilganchuk.o.a@kamniro.ru, shpigalskaya.n.u@kamniro.ru

**НЕРКА, СЕЗОННЫЕ ФОРМЫ, МИКРОСАТЕЛЛИТЫ, ТЕМПОРАЛЬНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ**

В работе представлены результаты анализа аллельных частот пяти микросателлитных локусов — *Oki1a*, *Oki1b*, *Oki6*, *Ots107*, *Ots3* в выборках нерки бассейна р. Озерной. Выделены две различающиеся по данным признакам сезонно-экологические формы, соответствующие раннему и позднему периодам нереста. Подтверждена темпоральная стабильность использованных молекулярно-генетических маркеров. Расширена реперная база данных по аллельным частотам микросателлитных локусов, определена ее разрешающая способность. Показано, что точность генетической идентификации выборок из смешанных речных уловов в р. Озерной находится на уровне 83% для нерки раннего времени нереста и 84% — для позднего. Использование частот аллелей микросателлитных локусов для идентификации смешанных речных выборок позволило определить соотношение особей выделенных сезонных форм в различные периоды нерестового хода. Показано, что особей, анадромная миграция которых проходит до середины июля, с большой степенью вероятности можно отнести к ранней речной форме.

**IDENTIFICATION OF EARLY RIVER FORM OF SOCKEYE SALMON IN THE OZERNAYA RIVER BASIN WITH MICROSATELLITE LOCI****O.A. Pilganchuk, N.Yu. Shpigalskaya, V.A. Dubynin, O.N. Saravanskiy, U.O. Muravskaya, N.V. Varnavskaya**

*Researcher, deputy director, leading scientist, engineer, researcher, Kamchatka Research Institute of Fisheries and Oceanography*  
 683000 Petropavlovsk-Kamchatsky, Naberedzhnaya, 18  
 Тел.: (4152) 22-68-33, 41-27-01  
 E-mail: pilganchuk.o.a@kamniro.ru, shpigalskaya.n.u@kamniro.ru

**SOCKEYE SALMON, SEASONAL FORMS, MICROSATELLITES, TEMPORAL STABILITY, IDENTIFICATION**

Some results of allelic frequencies analysis of five microsatellite loci — *Oki1a*, *Oki1b*, *Oki6*, *Ots107*, *Ots3* in sockeye salmon samples taken from the Ozernaya River basin are presented in this paper. Two seasonal-ecological forms differing in these features have been marked out, corresponding to early and late spawning periods. Temporal stability of used molecular-genetic markers has been confirmed. Reference database on allelic frequencies of microsatellite loci has been broadened, its resolving capacity has been defined. It is shown, that accuracy of genetic identification of samples from mixed river catches occurred in the Ozernaya River is on the level 83% for sockeye salmon of early spawning period and 84% — for that of late spawning period. Using of allelic frequencies of microsatellite loci for identification of mixed river samples let to determine the ratio of individuals of the distinguished seasonal forms in different periods of spawning running. It is shown, that individuals, anadromous migration of which occurs till the middle July, with high probability may be referred to the early river form.

Нерка (*Oncorhynchus nerka* Walbaum) — один из ценнейших промысловых видов рыб на Дальнем Востоке России. Так же как и для большинства представителей тихоокеанских лососей, для нерки характерна сложная внутривидовая организация. По времени хода и нереста различают две сезонные расы: весеннюю (ранняя) и летнюю (поздняя) (Алтухов, 1974; Коновалов, 1980; Крогиус, 1983), которые сформировались в ряде популяций как приспособление для более полного использования среды (Баранникова, 1975).

На юго-западе Камчатского п-ова в оз. Курильском (бассейн р. Озерной) воспроизводится самое многочисленное на азиатской части ареала промысловое стадо. В 2013 г. общая численность рыб, прошедших на нерест в озеро, составила 15,4 млн экземпляров (Шевляков и др., 2013). В бассейне оз. Курильского встречаются три типа нерестилищ: озерные, расположенные на литорали озера; речные, расположенные в реках, впадающих в озеро; нерестилища в ключах (Крохин, Крогиус, 1937; Егорова, 1968; Остроумов, 1970). Наиболь-

шую площадь занимают озерные — 755 тыс. м<sup>2</sup>, затем следуют речные — 225 тыс. м<sup>2</sup>. Ключевых — небольшое количество (30 тыс. м<sup>2</sup>). Общая площадь нерестилищ составляет 1010 тыс. м<sup>2</sup> (Остроумов, 1970). Отмечено, что на одних и тех же местах нерка может нереститься несколько раз за сезон (до 4–6) (Крохин, Крогиус, 1937; Остроумов, 1970; Селифонова, 1978).

Нерестовый ход нерки р. Озерной начинается обычно в последних числах мая и заканчивается в конце октября – начале ноября (Егорова, 1968). Расстояние в 62 км от устья р. Озерной до рыбоучетного заграждения, расположенного в истоке, нерка по результатам мечения преодолевает за 3–4 дня (Егорова, 1968; Ресурсы..., 1973; Лобков, 1999). Сезонные периоды в нерестовом ходе четко не выражены, и долгое время существовала точка зрения, что озерновское стадо нерки однородно и представлено только одной сезонной расой — поздней (Егорова, 1970; Коновалов, 1980; Крогиус, 1983). Весенняя нерка воспроизводится преимущественно на речных нерестилищах, расположенных в системах небольших рек и ручьев, впадающих в нагульный водоем, летняя — на литорали озера, однако жестких различий по местам размножения у нерки обеих рас нет (Крохин, 1960; Коновалов, 1980; Бугаев, 1995). Н.В. Варнавской (1988) отмечено, что в некоторых притоках озера нерест начинается в середине, а иногда в начале июля, что не характерно для поздней летней расы. По данным авиаучетов, в бассейне р. Озерной и оз. Курильского численность ранней сезонной расы нерки на нерестилищах составляет 1,9% (материалы А.Г. Остроумова, по: Бугаев, 1995). М.К. Глубоковский (1995) отмечает наличие осенней расы в оз. Курильском. По оценкам специалистов ФГУП «КамчатНИРО», подходы ранней нерки прослеживаются до середины июля и оцениваются в последние три года в следующем количестве: 2011 г. — 195 тыс. экз., 2012 г. — 623 тыс. экз., в 2013 г. — 762 тыс. экз. (Шевляков и др., 2011, 2012, 2013). В 2011 г. промысловое изъятие ранней нерки составило примерно 79,5% от подхода ее к берегу, в 2012 г. — 48,5%, в 2013 г. — 67,2% (Шевляков и др., 2011, 2012, 2013).

Результаты исследований, выполненных по аллозимным генам (четыре полиморфные ферментные системы), подтвердили генетическую неоднородность нерки р. Озерной различного времени нерестового хода и позволили предположить

наличие «весенне-летней» и «летне-осенней» рас в озере, различия между которыми нечетки из-за большой численности популяции (Мацак, 1983; Варнавская, 1988).

В последние два десятилетия в популяционно-генетических исследованиях успешно используются молекулярно-генетические маркеры, которые позволяют с высокой точностью идентифицировать различные внутривидовые формы тихоокеанских лососей (Beacham et al., 1998, 2000, 2006a, b; Beacham, Wood, 1999; Афанасьев и др., 2006; Варнавская, 2006; Хрусталева, 2007; Животовский, 2013). В Национальной морской ихтиологической службе США (National Marine Fisheries Service) был создан двухуровневый тест для выявления эволюционно значимых единиц у тихоокеанских лососей, которые были идентифицированы как отдельные популяционные сегменты и определены в качестве «популяций, которые репродуктивно отделены от других конспецифичных единиц и представляют важный компонент эволюционного наследия вида» (Waples, 2003). Выделено более 50 эволюционно значимых единиц у семи видов тихоокеанских лососей (Updated Status..., 2003). Так, к примеру, в популяции чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum) р. Фрейзер на основе аллельных частот тринадцати микросателлитных локусов были выделены семь стад, соответствующих географическим регионам, и три сезонные формы (весенняя, летняя и осенняя) (Beacham et al., 2003). Оценка доли выделенных групп в смешанных скоплениях была проведена во время промысла в нижнем течении реки, что подтвердило возможность достаточно быстро определять соотношение внутривидовых группировок и, таким образом, осуществлять оперативное регулирование их промысла. Необходимо отметить также темпоральную стабильность микросателлитов, что дает возможность определения популяционной принадлежности особей в смешанных скоплениях в период нагульных и нерестовых миграций по единожды созданным базам данных в течение ряда лет (Пильганчук и др., 2010).

Целью настоящего исследования является оценка уровня дифференциации сезонных форм нерки бассейна р. Озерной и вероятности их идентификации по микросателлитным локусам в смешанных уловах в течение нерестового хода.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом послужили 22 выборки производителей нерки бассейна р. Озерной в количестве 1133 экз. В их число входят 8 смешанных выборок из уловов промышленных закидных неводов в нижнем течении р. Озерной (394 экз.) и 14 выборок, отобранных в качестве реперов непосредственно с нерестилищ оз. Курильского в 2000 и 2001 гг., из которых 12 (653 экз.) проанализированы по опубликованным частотам аллелей микросателлитных локусов (Варнавская, 2006) (табл. 1, рис. 1).

Тканевые пробы — фрагменты грудных плавников или сердечной мышцы — отбирали у недавно пойманных рыб и фиксировали в 96%-м этаноле. До проведения лабораторных исследований пробы хранили в низкотемпературной морозильной камере (от  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Биоанализ проводили по схеме, предложенной И.Ф. Правдиным (1966), определяли длину по Смиту (АС) и массу рыб.

Тотальную ДНК выделяли стандартным способом (Маниатис и др., 1984; Sambrook et al., 1989; Коничев и др., 2012). Амплификацию проводили с использованием наборов реагентов, содержащих готовую лиофилизированную смесь для полимеразной цепной реакции — GenePak PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», РФ), по ранее описанной методике (Афанасьев и др., 2006). Продук-



Рис. 1. Карта-схема сбора материала для исследования изменчивости микросателлитных локусов у нерки оз. Курильского (1 — р. Выченкия, 2 — р. Кирушутк, 3 — бух. Южная, 4 — бух. Озерная, 5 — бух. Северная Ближняя, 6 — р. Гаврюшка, 7 — бух. Гаврюшка, 8 — бух. Гаврюшка, мыс Тугумынк, 9 — р. Этамынк, 10 — бух. Северная Дальняя, 11 — бух. Хакыцин, 12 — бух. Оладочная)

Таблица 1. Исследованные выборки нерки оз. Курильского и из уловов в устье р. Озерной

№	Сезонная форма	Место сбора	Дата сбора	Объем выборки, экз.
1		р. Выченкия*	28.07.2000	100
2		р. Кирушутк*	31.07.2000	50
3	Раннего хода	р. Гаврюшка*	02.08.2000	50
4		р. Этамынк*	05.08.2000	50
5		р. Этамынк	05.08.2001	48
6		р. Гаврюшка (устье)*	17.08.2000	50
7		бух. Гаврюшка, м. Тугумынк*	18.08.2000	50
8		бух. Южная*	28.08.2000	53
9		бух. Северная Дальняя*	30.08.2000	50
10	Позднего хода	р. Этамынк	27.08.2001	48
11		бух. Хакыцин*	31.08.2000	50
12		бух. Оладочная*	08.10.2000	50
13		бух. Северная Ближняя*	09.10.2000	50
14		бух. Озерная*	09.10.2000	50
15		р. Озерная	13.07.2011	48
16		р. Озерная	02.08.2011	48
17		р. Озерная	22.07.2011	48
18	Смешанные выборки из уловов	р. Озерная	16.08.2011	48
19	закидных неводов	р. Озерная	08.08.2011	48
20		р. Озерная	11.08.2011	48
21		р. Озерная	26.07.2011	48
22		р. Озерная	18.07.2011	48
Всего				1133

Примечание. \* — использованы опубликованные данные по частотам аллелей микросателлитных локусов (Варнавская, 2006)

ты амплификации разделяли в 6%-м неденатурирующем полиакриламидном геле в 0,5×ТБЕ-буфере (рН 8,0) с помощью вертикального электрофореза при постоянном напряжении 300 В в течение 2,0–3,5 ч. В качестве маркера длины фрагментов использовали ДНК плазмиды *pBR322*, обработанную рестриктазами *HpaII* или *HaeIII* (ООО «СибЭнзим»). В настоящей работе проанализированы пять микросателлитных локусов: *Oki1a*, *Oki1b*, *Oki6* (Smith et al., 1998), *Ots107* (Nelson, Beacham, 1999), *Ots3* (Banks et al., 1999).

Показатель генетической дифференциации  $F_{st}$  был рассчитан с помощью специализированного макроса GenALEx6 для MS-Excel (Peakall, Smouse, 2006) и программы Arlequin2000 (Schneider et al., 2000). Для оценки внутри- и межпопуляционной изменчивости, а также различий между группами популяций, использовали программу AMOVA (Analysis of Molecular Variance) в пакете программ Arlequin 2000.

Генетическую гетерогенность выборок оценивали с помощью критерия  $\chi^2$  (Лакин, 1990; Животовский, 1991). В качестве меры количественной оценки различий между популяциями использовали генетические расстояния, рассчитанные по Кавалли-Сфорца и Эдвардсу (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967), которые получили в программе NTSYS 2.0 (Rohlf, 1998).

На основе матриц генетических расстояний между популяциями выполняли кластерный анализ с представлением его результатов в виде NJ-дендрограмм («Neighbor-joining» — метод ближайших соседей) (Saitou, Nei, 1987) в программах GDA (Lewis, Zaykin, 2001) и NTSYS 2.0 (Rohlf, 1998).

Для оценки разрешающей способности реперных данных и вероятностной оценки состава смешанных речных выборок использовали симуляционный анализ по нулевому сценарию в программе SPAM (Masuda et al., 1991).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из задач популяционно-генетических исследований промысловых видов рыб является создание и постоянное расширение реперных баз данных, которые в течение длительного периода можно было бы использовать не обновляя, а лишь пополняя выборками из неисследованных ранее регионов воспроизводства. Это определяет необходимость оценки, насколько аллельные частоты микросателлитных локусов устойчивы во времени

и можно ли пренебречь величиной межгодовой изменчивости. Ранее темпоральная стабильность микросателлитных локусов была показана для выборок с нерестилищ оз. Курильского — б. Оладочная (23.09.1989 и 08.10.2000) и р. Кирушутк (15.08.1989 и 31.07.2000) (Пильганчук и др., 2010). В настоящей работе для оценки стабильности и воспроизводимости результатов, получаемых на основе изменчивости микросателлитной ДНК, были проанализированы частоты аллелей особей, отобранных в смежные годы (2000–2001 гг.) в ранний период нереста (05.08), а также в различные сроки нерестового хода в 2001 г. (05.08 и 27.08) на одном из нерестилищ оз. Курильского — р. Этамьнк (табл. 2, рис. 2). Между выборками раннего срока нереста разных лет подтверждено отсутствие различий по частотам всех исследованных локусов, что позволило в дальнейшем объединить данные выборки. Сравнительный анализ образцов, отобранных в начале и конце августа 2001 г., выявил изменчивость в распределении частот аллелей локуса *Oki6*, что подтверждает дифференциацию нерки различных периодов нерестового хода, на которую указывают результаты предыдущих исследований особей из оз. Курильского (Мацак, 1983; Варнавская, 1988, 2006).

Для выявления особенностей популяционной структуры нерки оз. Курильского был выполнен анализ особей, отобранных непосредственно на нерестилищах в различные периоды нереста 2000 г., с использованием основных биологических параметров (длина, масса) и частот аллелей микросателлитных локусов. Ранее в работе А.Н. Хрустальной (2007) было показано, что биологические данные в некоторых случаях эффективно дополняют результаты генетического анализа и позволяют дифференцировать стада нерки с большей точностью. Кластеризация выборок по методу ближайшего соседа отражает наибольшее сходство выборок, состоящих из особей раннего вре-

Таблица 2. Оценка темпоральной изменчивости частот аллелей микросателлитных локусов у производителей, отобранных на нерестилище р. Этамьнк в смежные годы (ранняя сезонная форма) и в один год (ранняя и поздняя сезонные формы), по критерию  $\chi^2$

Локус	05.08.2000 – 05.08.2001		05.08.2001 – 27.08.2001	
		<i>df</i>		<i>df</i>
<i>Oki6</i>	2,30	3	12,31*	4
<i>Ots107</i>	6,76	4	5,47	6
<i>Oki1a</i>	4,42	3	5,24	3
<i>Oki1b</i>	4,07	2	2,30	2
<i>Ots3</i>	7,60	6	7,95	6

Примечание. \* —  $P < 0,05$ ; *df* — число степеней свободы



мени хода с речных нерестилищ, с них начинается процесс группировки (рис. 3). На представленной дендрограмме наиболее сильная связь наблюдается между выборками раннего периода нерестового хода из рек Выченкия и Этамынк, расположенных в разных частях озера. Вторая по силе связь наблюдается между экземплярами, отобранными с речных, относительно близко расположенных нерестилищ Кирушутк и Гаврюшка. На следующем этапе построения дерева два данных кластера объединяются. Анализ выборок, входящих в выделенный кластер, выполненный с использованием критерия  $\chi^2$ , подтвердил его однородность по каждому из исследованных локусов (табл. 3). Выборки с литоральных нерестилищ самостоятельных кластеров не образуют, а последовательно присоединяются к кластеру, образованному выборками с речных нерестилищ в

зависимости от срока нереста, за исключением выборки с нерестилища бух. Северная Ближняя.

Для оценки гетерогенности производителей нерки разного периода нерестового хода в р. Озерной были проанализированы восемь выборок из уловов промышленных речных неводов. Выборки были отобраны с приблизительно равными временными интервалами (табл. 1). Особи, пойманные 13.07, условно были отнесены к «ранним», а выборка от 16.08, отобранная более чем с месяч-

Таблица 3. Оценка генетической однородности группы выборок нерки, относящихся к раннему периоду нереста по критерию  $\chi^2$ , проведенная по частотам пяти микросателлитных локусов

Локус	$\chi^2$	df
<i>Oki6</i>	4,08	9
<i>Ots107</i>	22,58	21
<i>Oki1a</i>	9,00	9
<i>Oki1b</i>	16,48	15
<i>Ots3</i>	11,67	18

Примечание. df — число степеней свободы

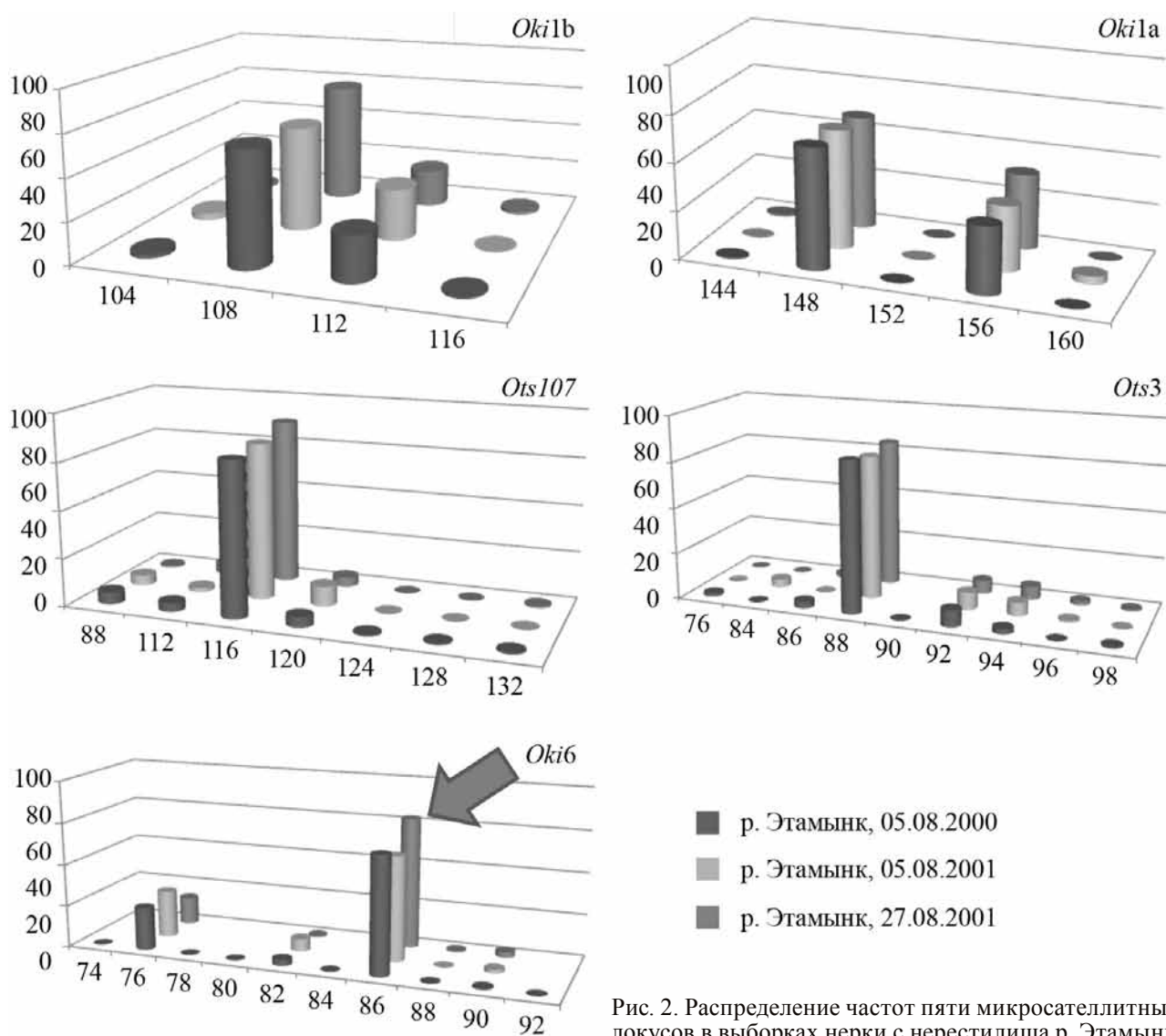


Рис. 2. Распределение частот пяти микросателлитных локусов в выборках нерки с нерестилища р. Этамынк

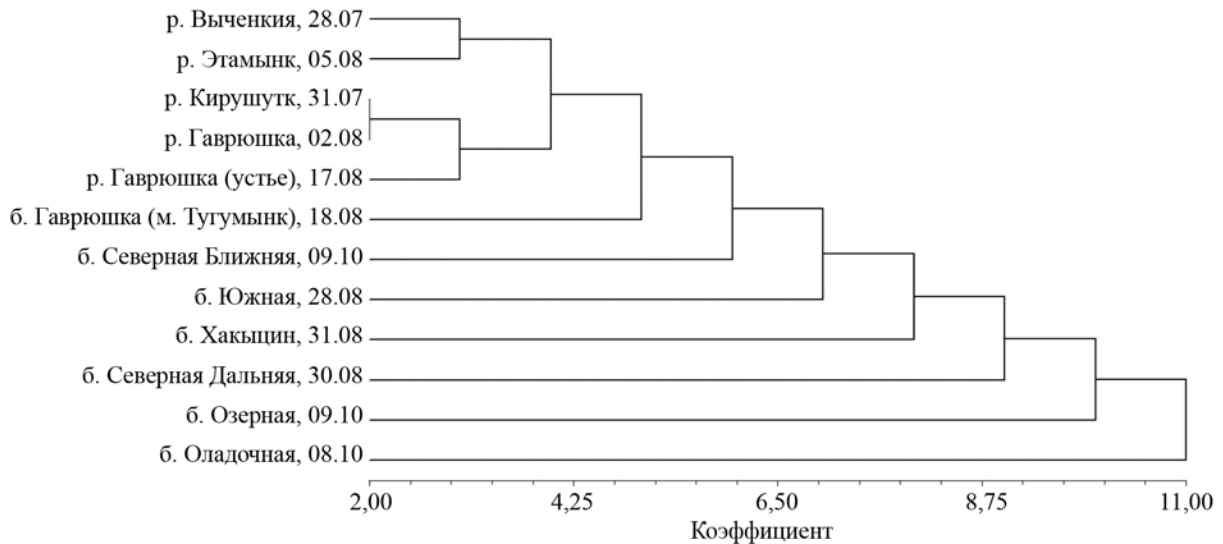


Рис. 3. NJ-дендрограмма, построенная по хордовым расстояниям (Cavalli-Sforza, Edvards, 1967) на основе аллельной изменчивости пяти микросателлитных локусов и биологических параметров (длина и масса) нерки с нерестилищ оз. Курильского (выборки 2000 г.)

ным интервалом, соответственно считалась «поздней». В опубликованной ранее работе были представлены данные по изменчивости четырех выборок (13.07, 22.07, 02.08 и 16.08), полученные предварительные результаты свидетельствовали об их генетической гетерогенности, показано, что максимально отдаленные по времени хода выборки статистически различаются (Пильганчук и др., 2012). В настоящем исследовании продолжен анализ особенностей распределения различных сезонных группировок нерки в течение нерестового хода на расширенном до восьми выборок материале (табл. 1). Статистические оценки генетической дифференциации выборок представлены в таблице 4, исходя из них, можно отметить, что выборка от 13.07 — наиболее раннего периода хода — отличается от всех остальных, кроме выборки от 18.07.

Кластеризация выборок с использованием основных биологических параметров и молекулярно-генетических маркеров показала, что наиболее сходны между собой особи, отобранные в августе, а к образованному ими кластеру последовательно

присоединяются выборки от 26.07 и 22.07 (рис. 4). Наиболее ранние по времени хода выборки (13.07, 18.07), несмотря на их объединение в один кластер, заметно дифференцированы как друг от друга, так и от остальных выборок.

Представление полученных результатов в виде NJ-дендрограммы, построенной по хордовым дистанциям с использованием только аллельных ча-

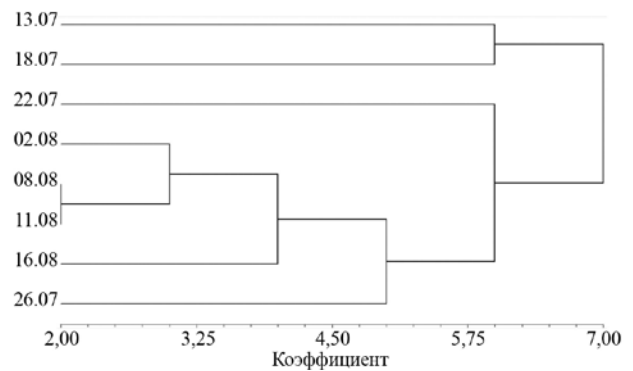


Рис. 4. NJ-дендрограмма, построенная по хордовым расстояниям (Cavalli-Sforza, Edvards, 1967) на основе аллельной изменчивости пяти микросателлитных локусов и биологических параметров (длина и масса) нерки из устья р. Озерной

Таблица 4. Оценки уровня попарной генетической дифференциации между смешанными выборками нерки из р. Озерной:  $F_{st}$  — над диагональю, дистанции Нея — под диагональю

Дата	13.07	18.07	22.07	26.07	02.08	08.08	11.08	16.08
13.07		0,005*	0,015	0,031	0,013	0,017	0,026	0,045
18.07	0,010		-0,006*	0,011	0,005*	0,003*	0,007*	0,007*
22.07	0,017	0,003		0,002*	0,001*	0,002*	-0,001*	0,002*
26.07	0,028	0,017	0,009		0,012	0,024	-0,005*	0,020*
02.08	0,015	0,009	0,006	0,013		-0,003*	0,002*	0,009*
08.08	0,017	0,007	0,007	0,021	0,004		0,012	0,005*
11.08	0,025	0,013	0,007	0,003	0,008	0,014		0,006*
16.08	0,037	0,014	0,010	0,020	0,012	0,009	0,011	

Примечание. \* — различия статистически незначимы,  $P > 0,05$

стот пяти микросателлитных локусов, также отражает генетические различия между неркой раннего и позднего периодов нерестового хода (рис. 5). В наибольшей степени по генетическим признакам отличны выборки, отобранные с месячным интервалом.

Таким образом, на основе анализа восьми выборок подтверждена гетерогенность нерестового хода нерки в р. Озерной и показано, что в наибольшей степени дифференцированы группы особей, темпорально наиболее разобщенные.

Для оценки точности идентификации ранней и поздней сезонных форм был проведен симуляционный анализ по нулевому сценарию. Компьютерное моделирование осуществлялось на основе опубликованных частот пяти микросателлитных локусов и двух основных биологических характеристик (длина и масса) в 12 выборках нерки, собранных в 2000 г. на основных нерестилищах оз. Курильского. Точность идентификации составила 94,4% для ранней нерки и 92,2% — для поздней (табл. 5). Таким образом, смешанные выборки, отобранные в один год с реперными, можно идентифицировать с высокой точностью при минимальном наборе анализируемых признаков. Необходимо отметить, что при выполнении данного анализа при разном соотношении самцов и самок в выборках, особей разного пола, в связи с ярко выраженным половым диморфизмом, следует анализировать отдельно.

Оценка точности идентификации сезонных форм только по частотам аллелей микросателлитных локусов несколько ниже и составила 83,4% для ранней нерки и 84,6% — для поздней (табл. 6), что указывает на необходимость расширения набора молекулярно-генетических маркеров. Тем не менее, полученные результаты симуляции позволили выполнить генетическую идентификацию восьми смешанных выборок (рис. 6). В результате можно отметить, что выборка производителей нерки из р. Озерной от 13.07 генетически наиболее близка к особям, которые были охарактеризованы как ранняя форма; выборка от

16.08 почти на 100% состоит из особей поздней формы; остальные выборки имеют смешанный состав. В выборках из уловов в устье р. Озерной, начиная со второй половины июля, прослеживается четкая тенденция замещения особей ранней формы представителями поздней.

Таблица 5. Оценка состава (%) симулированных смешанных выборок различных временных форм нерки оз. Курильского по пяти микросателлитным локусам с использованием основных биологических параметров (в скобках указано стандартное отклонение)

№	Сезонные формы	1	2
1	Раннего хода	92,2 <sub>(2,7)</sub>	3,5
2	Позднего хода	6,3	94,4 <sub>(1,9)</sub>
3	Неизвестные	1,5	2,1
Σ		100	100

Таблица 6. Оценка состава (%) симулированных смешанных выборок различных временных форм нерки оз. Курильского по пяти микросателлитным локусам (в скобках указано стандартное отклонение)

№	Сезонные формы	1	2
1	Раннего хода	83,4 <sub>(7,1)</sub>	15,0
2	Позднего хода	16,1	84,6 <sub>(8,0)</sub>
3	Неизвестные	0,5	0,4
Σ		100	100

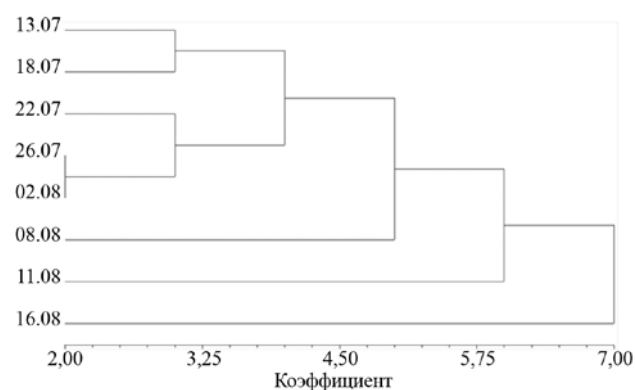


Рис. 5. NJ-дендрограмма, построенная по хордовым расстояниям (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967) на основе аллельной изменчивости пяти микросателлитных локусов нерки из устья р. Озерной

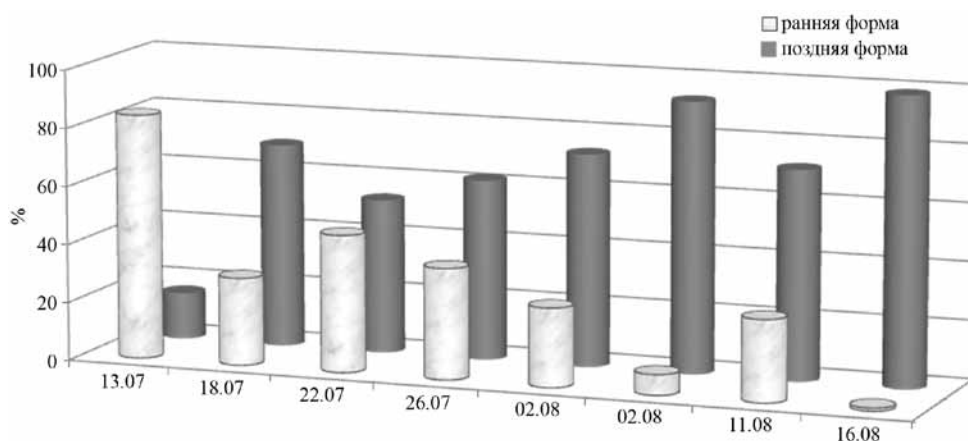


Рис. 6. Состав выборок нерки различных периодов нерестового хода в р. Озерной

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования подтверждена темпоральная стабильность микросателлитных локусов, что дает возможность обоснованно использовать созданную реперную базу данных в течение длительного периода и в дальнейшем расширять и дополнять ее новыми материалами.

Определена разрешающая способность реперных данных, показано, что вероятность генетической идентификации сезонных форм нерки бассейна р. Озерной превышает 83%. Полученные результаты анализа смешанных речных выборок на основе изменчивости микросателлитных локусов позволили определить соотношение особей ранней и поздней форм в различные периоды нерестового хода. Особей, анадромная миграция которых проходит до середины июля, с большой степенью вероятности можно отнести к ранней речной форме.

Действие длительных адаптационных механизмов, в результате которых произошла разобщенность нерки оз. Курильского по времени нереста и типам нерестилищ, привело к возникновению относительной репродуктивной изоляции и накоплению генетических различий между сезонными формами. Раннюю и позднюю нерку можно определить как две эволюционно значимые группировки, промысловая нагрузка на которые должна быть равномерной и распределяться с учетом естественной популяционно-генетической структуры.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алтухов Ю.П. 1974. Популяционная генетика рыб. М.: Пищ. пром-сть. 245 с.

Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Малинина Т.В., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Животовский Л.А. 2006. Микросателлитная изменчивость и дифференциация популяций кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum), воспроизводимых сахалинскими рыбободными заводами // Генетика. Т. 42. № 12. С. 1694–1702.

Баранникова И.А. 1975. Функциональные основы миграции рыб. Л.: Наука. 210 с.

Бугаев В.Ф. 1995. Азиатская нерка (пресноводный период жизни, структура локальных стад, динамика численности). М.: Колос. 464 с.

Варнавская Н.В. 1988. Пространственная и темпоральная генетическая структура в популяционной

системе нерки оз. Курильского (Камчатка) / Тез. III Всесоюз. совещ. по лососевидным рыбам. Тольятти: ИЭВБ. С. 49–51.

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

Глубоковский М.К. 1995. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука. 343 с.

Егорова Т.В. 1968. Основные закономерности, определяющие динамику численности красной *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) в бассейне р. Озерной : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ТИНРО. 22 с.

Егорова Т.В. 1970. Об отсутствии сезонных группировок красной бассейна реки Озерной // Изв. ТИНРО. Т. 78. С. 43–47.

Животовский Л.А. 2013. О методологии исследования популяционной организации вида по генетическим маркерам (на примере горбуши *Oncorhynchus gorbuscha*) // Вопр. ихтиологии. Т. 53. № 3. С. 371–376.

Животовский Л.А. 1991. Популяционная биометрия. М.: Наука. 267 с.

Коничев А.С., Цветков И.Л., Попов А.П., Шамшина Т.Н., Комаров А.Б. 2012. Практикум по молекулярной биологии. М.: Колосс. 151 с.

Коновалов С.М. 1980. Популяционная биология тихоокеанских лососей. М.: Наука. 238 с.

Крогиус Ф.В. 1983. Сезонные расы красной *Oncorhynchus nerka* (Walb.) и ее нерестилища в водоемах Камчатки / Биологические основы развития лососевого хозяйства в водоемах СССР. М.: Наука. С. 18–31.

Крохин Е.М. 1960. Нерестилища красной *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) // Вопр. ихтиологии. Т. 16. № 1. С. 90–110.

Крохин Е.М., Крогиус Ф.В. 1937. Очерк оз. Курильского и биологии красной в его бассейне // Труды Тихоокеанского комитета. М.: Академия наук СССР. 187 с.

Лакин Г.Ф. 1990. Биометрия. М.: Высш. школа. 352 с.

Лобков Е.Г. 1999. Камчатка. Объекты всемирного природного наследия. М.: ЛОГАТА. 152 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 479 с.

Мацак Е.А. 1983. Генетическая неоднородность нерки (*Oncorhynchus nerka*) оз. Курильского во время нерестового хода / Тез. X Всесоюз. симп. Ч. 2. «Биологические проблемы Севера». Магадан. С. 194–195.



- Остроумов А.Г.* 1970. Результаты аэровизуального учета и аэрофотосъемки красной и ее нерестилищ в бассейне оз. Курильского // Изв. ТИНРО. Т. 78. С. 17–32.
- Пильганчук О.А., Варнавская, Н.В., Бичем Т.Д.* 2010. Характеристика внутривидовой структуры нерки оз. Курильского и р. Камчатки по изменчивости микросателлитной ядерной ДНК // Исслед. водн. биол. ресурсов Камчатки и сев.-зап. части Тихого океана: Сб. науч. тр. Камчат. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии. Вып. 18. С. 28–37.
- Пильганчук О.А., Шпигальская Н.Ю., Дубынин В.А., Шевляков Е.А., Нигматулина Е.А., Косицына А.И., Сараванский О.Н.* 2012. Предварительные результаты оценки генетической гетерогенности нерестового хода нерки р. Озерной // Матер. Всерос. науч. конф. «Водные биологические ресурсы северной части Тихого океана: состояние, мониторинг, управление». Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО. С. 431–438.
- Правдин И.Ф.* 1966. Руководство по изучению рыб. М.: Пищепромиздат. 270 с.
- Ресурсы поверхностных вод. Камчатка. 1973 / Под ред. М.Г. Васильковского. Л.: Гидрометеиздат. Т. 20. 368 с.
- Селифонова М.Ф.* 1978. Распределение красной по нерестилищам бассейна реки Озерной / Исследования по биологии рыб и промысловой океанографии. Владивосток: ТИНРО. С. 129–133.
- Хрусталева А.М.* 2007. Комплексный метод дифференциации нерки (*Oncorhynchus nerka*) азиатских стад. М.: ВНИРО. 165 с.
- Шевляков Е.А., Дубынин В.А., Ерохин В.Г.* 2013. Характеристика прибрежного промысла тихоокеанских лососей в Камчатском крае в 2013 г. // Бюллетень № 8 реализации «Концепции Дальневосточной бассейновой программы изучения тихоокеанских лососей». Владивосток. ТИНРО-Центр. С. 11–20.
- Шевляков Е.А., Ерохин В.Г., Дубынин В.А.* 2011. Характеристика прибрежного промысла тихоокеанских лососей в Камчатском крае в 2011 г. // Бюллетень № 6 реализации «Концепции Дальневосточной бассейновой программы изучения тихоокеанских лососей». Владивосток. ТИНРО-Центр. С. 10–25.
- Шевляков Е.А., Ерохин В.Г., Дубынин В.А., Шпигальская Н.Ю., Зорбиди Ж.Х.* 2012. Характеристика прибрежного промысла лососей в Камчатском крае в 2012 г. // Бюллетень № 7 реализации «Концепции Дальневосточной бассейновой программы изучения тихоокеанских лососей». Владивосток. ТИНРО-Центр. С. 10–28.
- Banks M.A., Blouin M.S., Baldwin B.A., Rashbrook V.K., Fitzgerald H.A., Blankenship S.M., Hedgecock D.* 1999. Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) // J. Hered. V. 90. P. 281–288.
- Beacham T.D., Candy J.R., Supernault J., Wetklo M., Deagle B., Labaree K., Irvine J., Miller K.M., Nelson R.J., Withler R.E.* 2003. Evaluation and application of microsatellites for population identification of Fraser River chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) // Fish. Bull. V. 101. P. 243–259.
- Beacham T.D., Margolis L., Nelson R.J.* 1998. A comparison of methods of stock identification for sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Barkley Sound. British Columbia // N. Pac. Anad. Fish Comm. Bull. V. 1. P. 227–239.
- Beacham T.D., McIntosh B., MacConnachie C., Miller K.M., Withler R.E., Varnavskaya N.V.* 2006a. Pacific Rim population structure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) as determined from microsatellite analysis // Trans. Amer. Fish. Soc. V. 135. P. 174–187.
- Beacham T.D., Varnavskaya N.V., McIntosh B., MacConnachie C.* 2006b. Population structure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) from Russia determined with microsatellite DNA variation // Trans. Amer. Fish. Soc. V. 135. P. 97–109.
- Beacham T.D., Wood C.C.* 1999. Application of microsatellite DNA variation to estimation of stock composition and escapement of Nass River sockeye salmon // Can. J. Fish Aquat. Sci. V. 56. № 2. P. 297–310.
- Beacham T.D., Wood C.C., Withler R.E., Miller K.M.* 2000. Application of microsatellite DNA variation to estimation of stock composition and escapement of Skeena River sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) // N. Pac. Anad. Fish. Comm. Bull. V. 2. P. 263–276.
- Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.E.* 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures // Am. J. Hum. Genet. V. 19. P. 233–257.
- Lewis P.O., Zaykin D.Yu.* 2001. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data (<http://lewis.eeb.uconn.lewishome/software.html>).
- Masuda M., Nelson S., Pella J.* 1991. The computer programs for computing conditional maximum likelihood estimates of stock composition from discrete characters // U.S. Department of Commerce. NOAA/NMFS Auke Bay Laboratories. Juneau. Alaska.

- Nelson R.J., Beacham T.D.* 1999. Isolation cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon // *Animal Genetics*. V. 30. P. 228–229.
- Peakall R., Smouse P.E.* 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes*. V. 6. P. 288–295.
- Rohlf F.J.* 1998. NTSYSpc Numerical taxonomy and multivariate analysis system ver. 2.0 User Guide. Applied Biostatistics Inc. Setauket. New York. 37 p.
- Saitou N., Nei M.* 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. and Evol.* V. 4. P. 406–425.
- 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.
- Smith C.T., Koop B.F., Nelson R.J.* 1998. Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids // *Mol. Ecol.* V. 7. P. 1613–1621.
- Updated status of federally listed ESUs of West Coast salmon and steelhead. 2003 // URL <http://www.nwr.noaa.gov>.
- Waples R.S.* 2003. Definition of «species» under the Endangered Species Act: application to pacific salmon // U.S. Dept. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC-194 // URL <http://www.nwfsc.noaa.gov/publications/techmemos/tm194/waples.htm>.