

На правах рукописи

КОВПАК
НАТАЛЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ОТНОШЕНИЯ КОРЮШКОВЫХ РЫБ РОССИИ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени

Владивосток – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Скурихина Любовь Андреевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Фролов Сергей Владимирович

доктор биологических наук
Челомина Галина Николаевна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Зоологический институт РАН

Защита состоится «23» декабря 2010 года в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: 7 (4232) 31-09-05, факс: 7 (4232) 31-09-00. E-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « » ноября 2010 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Семейство Osmeridae, обитающее в Северном полушарии, состоит из шести родов, которые объединяют около полутора десятков видов и подвидов мелких, серебристых, стайных рыб, включающих в свой состав морские, анадромные и жилые пресноводные формы. Несмотря на малочисленность видов корюшковых, на протяжении многих десятилетий обсуждаются и уточняются систематическое положение отдельных таксонов, количество подсемейств и родов семейства, состав некоторых родов, а также последовательность и время дивергенции таксонов (Charman, 1941; Берг, 1948; Андрияшев, 1954; McAllister, 1963; Клюканов, 1970, 1975, 1977; Begle, 1991; Wilson, Williams, 1991; Johnson, Patterson, 1996; Федоров и др., 2003; Fu et al., 2005; Ilves, Tailor, 2009 и др.). Некоторые из этих вопросов до сих пор остаются нерешенными. В Российских водах обитают семь видов и подвидов наиболее массовых родов (*Osmerus*, *Mallotus* и *Hypomesus*), занимающих порой до 30–50% видового ареала. Зарубежными исследователями – как морфологами, так и молекулярными генетиками в анализах, за исключением редких единичных экземпляров, они не используются. Изучаются, главным образом, популяции из Америки, Канады, северо-западной Европы и Японии. Что касается отечественных исследований, то работы, на основании которых можно получить сведения по биологии, экологии, морфологической изменчивости корюшек, проводятся постоянно (Андрияшев, 1954; Линдберг, Легеза, 1965; Клюканов, 1969; Гриценко, Чуриков, 1983; Науменко, 1990, Великанов, 1993; Щукина, 1999; Заварзина, 2004; Черешнев и др., 2002, 2006; Черешнев, 2008). Но при этом существуют лишь единичные публикации по кариологии (Черешнев и др., 2002), аллозимному анализу (Дущенко, 1993; Сендек и др., 2005) и молекулярным данным (Скурихина и др., 2004, 2008, 2010) корюшковых рыб, несмотря на то, что в последнее время считается необходимым использование генетических и молекулярных методов для решения проблем систематики и установления родственных связей между таксонами, в основе которых лежат наследственная преимущество и изменчивость. Эта генетическая преимущество поколений и регуляция их биологически важных свойств осуществляется на популяционном уровне, в связи с чем именно популяции приобретают особое значение для существования и развития жизни на Земле (Айала, 1984). Параметры биологических свойств «непосредственно обусловлены особенностями популяционных генофондов, той совокупностью наследственной информации, которая в процессе воспроизводства передается от родителей потомкам и определяет такие важные свойства организма, как скорость роста и развития, размеры и пропорции тела, устойчивость к заболеваниям, продолжительность

жизни, способность адаптироваться к неблагоприятным факторам среды и другие» (Алтухов, 2003).

Все выше сказанное послужило причиной проведения данных исследований по всем корюшковым рыбам, обитающим в Российских водах, с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования является изучение генетического разнообразия, популяционной структуры и родственных взаимоотношений представителей трех родов (*Mallotus*, *Osmerus*, *Hypomesus*) корюшковых рыб семейства Osmeridae, обитающих в водах России, на основании данных рестрикционного полиморфизма митохондриальной ДНК и анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей митохондриальных и ядерных генов.

Основные задачи данного исследования:

1. Определить степень внутривидового генетического разнообразия и дифференциации популяций тихоокеанской мойвы *Mallotus villosus catervarius* Охотского моря на основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов митохондриальной ДНК.

2. Используя рестрикционный анализ митохондриальной ДНК и секвенирование нуклеотидных последовательностей генов цитохрома *b* (*cytb*), цитохромоксидазы (COI) мтДНК и интрона 1 гена белка фактора репликации (интрон 1 *grS7*) ядерной ДНК, оценить степень внутривидового разнообразия и уровень генетической дифференциации популяций и видов рода *Osmerus*: *O. eperlanus* и *O. mordax dentex*.

3. С помощью методов филогенетического анализа (NJ, MP, Байесовского), установить родственные взаимоотношения между видами и подвидами корюшковых рыб, обитающими в Российских водах (*Mallotus villosus catervarius*, *Mallotus villosus villosus*, *Osmerus mordax dentex*, *Osmerus eperlanus*, *Hypomesus olidus*, *Hypomesus nipponensis* и *Hypomesus japonicus*).

4. Сопоставить филогенетические схемы данного исследования с построениями других авторов, основанными на молекулярно-генетических данных, а также с результатами филогений, полученных на основании анализов сравнительно-морфологических и остеологических признаков.

Научная новизна работы. С помощью молекулярно-генетических методов в данной работе:

1. Впервые изучена внутривидовая изменчивость митохондриальной ДНК в популяциях тихоокеанской мойвы *Mallotus villosus catervarius* бассейна Охотского моря, внутривидовой и межвидовой полиморфизм мтДНК двух представителей рода *Osmerus* – *O. eperlanus* и *O. mordax dentex*.

2. Впервые определены нуклеотидные последовательности митохондриальных генов *cytb* и COI и интрона 1 ядерного гена *grS7* всех видов и подвигов корюшковых рыб, обитающих в Российских водах. Сто тридцать

последовательностей этих генов зарегистрировано в международной базе данных GenBank, National Center for Biotechnology Information, USA (GenBank/NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3. Впервые проанализированы филогенетические связи между родами и видами семейства Osmeridae, обитающими в Российских водах.

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе работы выявлены гаплотипы мтДНК, позволяющие идентифицировать исследованные виды для сохранения биоразнообразия, в таксономических и рыбохозяйственных целях. К видам, используемым в промышленном и любительском лове, относятся корюшки рода *Osmerus*, тихоокеанская и атлантическая мойва, малоротые корюшки *Hypomesus nipponensis* и *H. japonicus*. Для ведения рационального промысла и сохранения биоразнообразия, генетическая идентификация видов имеет наибольшее значение для *Osmerus eperlanus* и *Osmerus mordax dentex*, симпатрично обитающих в европейской части России и трудно определяемых по внешним морфологическим признакам.

Настоящая работа также внесет существенный вклад в исследования по филогении и эволюции семейства Osmeridae, пополнив отсутствующими данными молекулярно-генетическую базу по корюшковым рыбам, обитающим в Российских акваториях. Нами определены и депонированы в международную базу данных (GenBank) 130 новых нуклеотидных последовательностей генов митохондриальной и ядерной ДНК.

Полученные в ходе работы результаты могут быть использованы при проведении спецкурса «Молекулярная филогенетика» в Дальневосточном государственном университете (ДВГУ).

Личный вклад автора. Личное участие автора заключается в планировании, подготовке и проведении экспериментов, анализе полученных результатов и написании статей. Автором полностью самостоятельно выполнена экспериментальная часть исследования по анализу полиморфизма длин рестрикционных фрагментов митохондриальной ДНК мойвы, европейской и азиатской корюшек, прямому секвенированию митохондриальных генов цитохрома *b*, 1-ой субъединицы цитохром *c*-оксидазного комплекса всех исследуемых таксонов.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на ежегодных научных конференциях ИБМ ДВО РАН (Владивосток, 2008, 2009, 2010); конференции «Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб» (Санкт-Петербург, 2008); Съезде генетиков и селекционеров, посвященному 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина (Москва, 2009); международной конференции «International Conference on Evolutionary Ecology of Fishes Diversification, Adaptation and Speciation» (Erkner, Germany, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 2 статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК РФ. Две статьи приняты к публикации в российском («Генетика») и международном («Evolutionary Ecology») журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждения исследования), заключения, выводов и списка литературы, включающего 206 цитируемых работ, из них 82 на русском языке и приложения. Диссертация изложена на 241 страницах печатного текста, иллюстрирована 33 рисунками и содержит 30 таблиц, 11 из которых представлены в приложении.

Исследование осуществлено при финансовой поддержке Программы Президиума РАН (проект № 06-I-П10-015), а также грантов № 01-04-49436 ДВО РАН и № 06-04-96057 РФФИ – ДВО РАН.

Благодарности. Автор благодарен своему научному руководителю Л.А. Скурихиной (ИБМ ДВО РАН, Владивосток, Россия) за конструктивное руководство, А.Г. Олейник и А.Д. Кухлевскому (ИБМ ДВО РАН, Владивосток, Россия) за помощь в освоении молекулярно-генетических методов и статистической обработке данных, зав. лаб. Генетики (ИБМ ДВО РАН, Владивосток, Россия) Вл.А. Брыкову за оказанное внимание к работе, Т.Ф. Прийме (ИБМ ДВО РАН, Владивосток, Россия) за помощь в выделении препаратов ДНК, С.В. Фролову, А.Д. Кухлевскому, И.Н. Рязановой, Н.С. Соколовскому, М.Ю. Ковалеву, Е.Г. Рейзману (ИБМ ДВО РАН, Владивосток, Россия), И.А. Черешневу, М.Ю. Засыпкину (ИБПС ДВО РАН, Магадан, Россия), Н.В. Колпакову (ТИНРО-Центр, Владивосток, Россия), Д.С. Сендеку (ГосНИОРХ, Санкт-Петербург, Россия), Б.А. Шейко (ЗИН РАН, Санкт-Петербург, Россия), В.С. Шерсткову (СевПИПРО, Архангельск, Россия), Дж. Додсону (University Laval, Quebec, Canada) за помощь в сборе материала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Используемые в данной работе 30 выборок из популяций всех корюшковых рыб, обитающих в Российских водах, были собраны в 2001–2007 годах. Объем исследованного материала и условные обозначения представлены в таблице 1. При секвенировании нуклеотидных последовательностей, для сравнения, в анализ были включены две выборки *Osmerus mordax mordax* и *Mallotus villosus villosus* из Канады, обозначенные под номерами 13 и 23. Общая численность исследованных особей составила 594, из которых 580 были использованы для ПДРФ-анализа и 43 для секвенирования.

Таблица 1. Места сбора, объем и условные обозначения выборок исследованных корюшковых рыб

№	Таксон	Условные обозначения	Место сбора	Число особей ПДРФ/секвен.
1	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsOl01.60-79	Б. Ольга, сев.-зап. часть Японского моря	20 / 3
2	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsMa01.80-98	Р. Максимовка, сев.-зап. часть Японского моря	18 / -
3	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsAn06.01-30	Зал. Анива, юж. оконечность о. Сахалин, Японское море	30 / -
4	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsHa07.01-24	Р. Хайрюзова, зап. побережье п-ова Камчатка, Охотское море	24 / -
5	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsOk07.33-54	Р-он пос. Октябрьский, юго-зап. побережье п-ова Камчатка, Охотское море	10 / -
6	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsKo07.02-26	Р. Ковран, зап. побережье п-ова Камчатка, Охотское море	24 / -
7	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsMe07.01-38	Р-он с. Мейныпильгино, сев.-зап. часть Берингова моря	25 / -
8	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsAl05.01-20	Анадырский лиман, сев.-зап. часть Берингова моря	20 / -
9	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsBa06.01-25	Байдарацкая губа, юго-зап. часть Карского моря	25 / 3
10	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsHj06.01-15	Хайпудырская губа, юго-вост. часть Баренцева моря	15 / -
11	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsPe06.01-20	Печорская губа, юго-вост. часть Баренцева моря	20 / 3
12	<i>Osmerus mordax dentex</i>	OsChe06.01-09	Чешская губа, юго-вост. часть Баренцева моря	9 / 2
13	<i>Osmerus mordax mordax</i>	OsGa02.05 19	Р-он Джамбо, Ньюфаундленд, Канада	- / 3
14	<i>Osmerus eperlanus</i>	OsLa06.01-30	Ладожское озеро, бассейн Балтийского моря	28 / 3
15	<i>Osmerus eperlanus</i>	OsNe06.01-30	Устье р. Нева, вост. часть Финского залива, Балтийское море	29 / 3
16	<i>Osmerus eperlanus</i>	OsLu06.01-30	Лужская губа, юго-вост. часть Финского залива, Балтийское море	30 / 3
17	<i>Mallotus villosus catervarius</i>	MPi02.01-50	Зал. Пильтун сев.-вост. побережье о. Сахалин, Охотское море	33 / -
18	<i>Mallotus villosus catervarius</i>	MVz06.01-30	Р-он пос. Взморье, юго-вост. побережье о. Сахалин, Охотское море	30 / 3
19	<i>Mallotus villosus catervarius</i>	MNu06.01-54	Б. Нюкля, Тауйская губа, Охотское море	54 / -
20	<i>Mallotus villosus catervarius</i>	MNa01.179-206	Б. Нагаева, Тауйская губа, Охотское море	27 / -
21	<i>Mallotus villosus catervarius</i>	MOk07.01-05	Р-он пос. Октябрьский юго-зап. побережье п-ова Камчатка, Охотское море	- / 3
22	<i>Mallotus villosus villosus</i>	MKar07.01-05	Байдарацкая губа, юго-зап. часть Карского моря	- / 3
23	<i>Mallotus villosus villosus</i>	MDa01.35, 45	Девисов пролив, Лабрадор, Канада	- / 2
24	<i>Hypomesus nipponensis</i>	HniMaj01.163-175	Мыс Маячный, зал. Посьет, Японское море	10 / -
25	<i>Hypomesus nipponensis</i>	HniOl01.54-59	Б. Ольга, сев.-зап. часть Японского моря	6 / 3
26	<i>Hypomesus nipponensis</i>	HniSe0101-20	Р. Серебрянка, сев.-зап. часть Японского моря	19 / -
27	<i>Hypomesus japonicus</i>	HjaAm01.21-33	Амурский зал., Японское море	12 / -
28	<i>Hypomesus japonicus</i>	HjaMaj01.119-162	Мыс Маячный, зал. Посьет, Японское море	32 / -
29	<i>Hypomesus japonicus</i>	HjaOl0101-20	Б. Ольга, сев.-зап. часть Японского моря	20 / 3
30	<i>Hypomesus olidus</i>	HolSa0101-06	Р. Самарга, сев.-зап. часть Японского моря	6 / -
31	<i>Hypomesus olidus</i>	HolAz07.02-10	Оз. Азабачье, вост. побережье п-ова Камчатка, Берингово море	- / 3
32	<i>Hypomesus olidus</i>	HolPo0221-24	Р. Погиби сев.-зап. побережье о. Сахалин, Охотское море	4 / -

Выделение ДНК. Тотальную ДНК выделяли стандартным методом (Sambrook et al., 1989) из фиксированных этанолом тканей сердца или печени.

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов мтДНК. Изменчивость мтДНК анализировали, используя полиморфизм длины рестрикционных фрагментов четырех участков (A8/A6/COIII/ND3, ND5/ND6, ND3/ND4 и *Cytb/D-loop*), амплифицированных в полимеразной цепной реакции. Последовательности праймеров для использованных фрагментов, положение их на карте мтДНК и условия амплификации приведены в ранее опубликованной работе (Gharrett et al., 2001).

Амплифицированные участки мтДНК обрабатывали эндонуклеазами *Bst*UI, *Dde*I, *Hha*I, *Mbo*I, *Mbo*II, *Ava*II, *Eco*RV, *Rsa*I, *Ava*I, *Bst*NI, *Vsp*I, *Hinf*I, *Ssp*I, *Sty*I, *Bsu*RI, *Asu*I, *Msp*R9I, *Msp*I, *Taq*I («МБИ Ферментас», Литва; «СибЭнзим», Россия). Продукты рестрикции разделяли электрофоретически в 1.5–2.0% агарозном геле, содержащем одну часть Ultra Pure™ agarose («BRL Gibco», США) и две части Synergel™ («Diversified Biotech Inc.», США) в 0.5-кратном ТБЕ-буфере (Sambrook et al., 1989). Фрагменты ДНК в геле окрашивали этидиумбромидом и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Основные показатели генетической изменчивости определяли, используя пакеты программ REAP (McElroy et al., 1992) и Arlequin v.2.0 (Schneider et al., 2000). Гетерогенность частот гаплотипов между каждой парой анализируемых выборок оценивали методом Монте-Карло (Roff, Bentzen, 1989) по критерию F_{ST} (Weir, Cockerham, 1984). Количественную оценку географической подразделенности изменчивости мтДНК проводили методом AMOVA (Excoffier et al., 1992). Существенность иерархических компонентов дисперсии и соответствующих F-статистик оценивали из непараметрического распределения псевдовероятностного теста (Excoffier et al., 1992). Оценки нуклеотидной дивергенции (Nei, Tajima, 1981; Nei, Miller, 1990) использовали в качестве мер генетических дистанций при кластеризации (методы UPGMA, NJ, MP) операционных таксономических единиц (ОТЕ), в качестве которых рассматривали: 1) гаплотипы мтДНК; 2) выборки, представляющие исследованные популяции; 3) выделенные иерархические группировки. Поиск оптимального MP-дерева выполняли по алгоритму программы PENNY (Hendy, Penny, 1982) или с помощью теста Темплетона (Templeton, 1983). Для реконструкции филогеографических связей между гаплотипами мтДНК мойвы были построены деревья минимальной протяженности MST (Excoffier et al., 1992). Устойчивость кластеризации оценивали в 1000 итераций бутстреп-анализа (Felsenstein, 1985).

Расчеты нуклеотидной дивергенции, построение дендрограмм и оценку полученных топологий выполняли с использованием пакетов программ PAUP v.4.0 b 10 (Swofford, 2002), REAP (McElroy et al., 1992) и PHYLIP 3.67

(Felsenstein, 1989). Графическое изображение дендрограмм было получено в программе TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

Секвенирование нуклеотидных последовательностей митохондриальных и ядерных генов. Для секвенирования генов *cytb*, COI мтДНК и интрон 1 *gpS7* яДНК использовали ген-специфические праймеры, представленные в работах (Sevilla et al., 2007; Ward et al., 2005; Chow, Hazama, 1998). ПЦР проводили при условиях, описанных Скурихиной с соавторами (2010). Продукты ПЦР проверяли методом электрофореза в 1% агарозном геле и очищали переосаждением этанолом. Очищенные продукты митохондриальных генов использовали в качестве матрицы для реакции секвенирования. Фрагмент ядерного гена клонировали в плазмиде pTZ57R/T, используя набор InsTAcloneTM PCR Cloning Kit («MBI Fermentas», Литва). Секвенальную реакцию проводили в условиях, рекомендованных производителем, с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 («Applied Biosystems», США). Последовательности нуклеотидов определяли в автоматическом анализаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США) на 50 см колонке с полимером POP-7. Выравнивание последовательностей проводили в программе SeqScape v.2.5 («Applied Biosystems», США).

При филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей использовали пакеты программ MEGA 4 (NJ и MP методы) (Tamura et al., 2007). Устойчивость кластеризации полученных деревьев оценивали в 1000 итераций бутстреп-анализа (Felsenstein, 1985). Байесовский анализ (Bayesian analysis, BA) осуществляли в программе MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Оптимальные модели нуклеотидного замещения выбирали с использованием программ RAUP v.4.0 b 10 (Swofford, 2002), Modeltest 3.7 (для NJ деревьев) (Posada, Crandall, 1998) и Modeltest 2.3 (для Байесовских деревьев) (Nylander, 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая характеристика и дифференциация тихоокеанской мойвы Охотского моря. Среднее гаплотипическое разнообразие в исследованных популяциях мойвы составило 0.9639 ± 0.00015 с диапазоном изменчивости от 0.9316 ± 0.03945 (б. Нагаева) до 0.9867 ± 0.01353 (зал. Пильтун). Среднее значение нуклеотидного разнообразия 0.003818 ± 0.0000003 , колебалось от 0.002398 (б. Нагаева) до 0.005228 (район зал. Пильтун). Таким образом, мойва характеризуется высоким уровнем гаплотипического разнообразия при низких значениях нуклеотидного.

Для оценки достоверности генетических различий было проведено несколько тестов на гомогенность частот гаплотипов. Количественные оценки географической подразделенности полиморфизма ДНК с помощью критерия

F_{ST} (Weir, Cockerham, 1984) и с использованием χ^2 (Roff, Bentzen, 1989) не обнаружили статистически значимых различий при попарном сравнении анализируемых выборок мойвы (табл. 2).

Таблица 2. Тестирование уровня дифференциации популяций мойвы *Mallotus villosus catervarius* из бассейна Охотского моря

№	Локальность	1	2	3	4
Значения F_{ST} ниже диагонали, P выше диагонали (Weir, Cockerham, 1984)					
1	Б. Нагаева	–	–	–	–
2	Б. Нюкля	0.64271 ± 0.0048	–	–	–
3	Р-он зал. Пильтун	0.32769 ± 0.0047	0.11326 ± 0.0029	–	–
4	Р-он пос. Взморье	0.61281 ± 0.0044	0.21404 ± 0.0045	0.08989 ± 0.0029	–
Значения χ^2 ниже диагонали, P выше диагонали (Roff, Bentzen, 1989)					
1	Б. Нагаева	–	–	–	–
2	Б. Нюкля	53.88	–	–	–
3	Р-он зал. Пильтун	47.70	71.36	–	–
4	Р-он пос. Взморье	41.78	66.87	54.98	–

Примечание: «—» – различия недостоверны при уровне значимости $P < 0.05$.

Для количественной оценки величины генетических различий между всеми парами выборок методом AMOVA (Excoffier, 1992), проводили разложение общей молекулярной дисперсии частот гаплотипов на три иерархических уровня – межрегиональную, межпопуляционную и внутривидовую компоненты (табл. 3).

Таблица 3. Результаты иерархического анализа гаплотипических различий мойвы *Mallotus villosus catervarius* (Excoffier, 1992)

Уровень разнообразия	d.f.	Абсолютные оценки	Процент дисперсии (%)	Вероятность (P)
Между выборками	2	0.00872 (V_b)	0.35	0.13267
Между регионами*	1	–0.00170 (V_a)	–0.07	1.00000
Внутри выборок	140	2.46589 (V_c)	99.72	0.16218
Общее	143	2.47292		

*Дифференцировались выборки восточного побережья о. Сахалин и популяции Тауйской губы Охотского моря.

Анализ показал, что практически все молекулярное разнообразие тихоокеанской мойвы бассейна Охотского моря заключено внутри популяций – 99.70%. Однако, согласно полученным результатам, выделенные нами иерархические уровни географической подразделенности являются статистически недостоверными (95% уровень значимости). Таким образом, основная часть внутривидовой изменчивости мтДНК мойвы обусловлена различиями между особями внутри единой генеральной совокупности.

Величина дивергенции нуклеотидных последовательностей мтДНК не превышала 0.36%, что свидетельствует об очень низком уровне дифференциации исследованных популяций.

Для того, чтобы понять, какие исторические факторы оказали влияние на формирование современной популяционно-генетической структуры мойвы, на основании полученных величин дивергенции нуклеотидных последовательностей были реконструированы генеалогии гаплотипов в виде MST-деревьев (рис. 1).

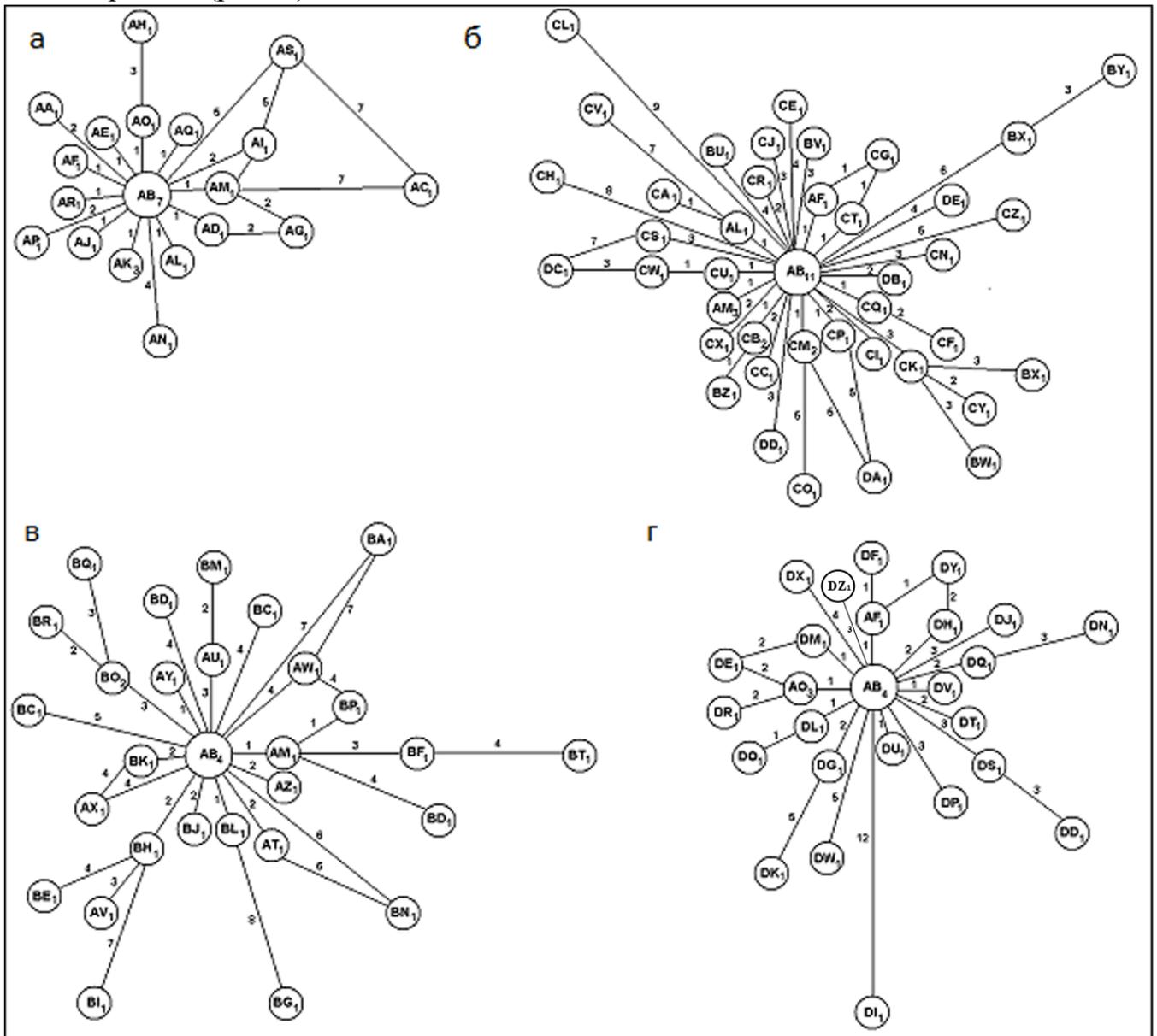


Рис. 1. Генеалогические сети (MST-деревья (Excoffier et al., 1992)) гаплотипов мтДНК мойвы *Mallotus villosus catervarius*: а – выборка из б. Нагаева, б – выборка из б. Нюкля, в – выборка из района зал. Пильтун, г – выборка из района пос. Взморье. Цифры на ветвях обозначают мутационные различия между гаплотипами. Цифры внутри окружностей показывают количество соответствующих гаплотипов в выборке.

Структуры полученных генеалогий радиальные с небольшим числом альтернативных связей, возникающих в результате обратных или параллельных мутаций. Все выборки содержат один и тот же наиболее распространенный гаплотип, занимающий внутреннее положение в генеалогиях, и различаются по составу уникальных гаплотипов, находящихся на периферии генеалогического древа. Центральное положение в каждой структуре занимает гаплотип АВ, являющийся предковым для всех выборок. Общими особенностями генеалогических деревьев гаплотипов мойвы являются: наличие радиальных кластеров, большое количество близкородственных гаплотипов, что связано с высоким гаплотипическим разнообразием, и небольшая историческая глубина, обусловленная низким нуклеотидным разнообразием.

Таким образом, популяционно-генетическая структурированность мойвы Охотского моря в целом очень слабая. Нуклеотидная дивергенция между выборками, степень генетической дифференциации, а также структура NJ-дерева гаплотипов мтДНК позволяют сделать вывод о том, что все четыре выборки входят в состав единой панмиктической популяции.

Генетическая дифференциация корюшек рода *Osmerus* по данным ПДРФ-анализа. Средняя величина гаплотипического разнообразия (h) при исследовании участков A8/A6/COIII/ND3 и ND3/ND4 мтДНК для популяций *O. m. dentex* составила 0.5997 ± 0.11264 , с диапазоном изменчивости от 0.1333 ± 0.11230 (Хайпудырская губа), до 0.9126 ± 0.03545 (зал. Анива). Для *O. eperlanus* показатели h оказались в два раза ниже (0.3086 ± 0.09892), с диапазоном от минимального 0.1355 ± 0.08453 (р. Нева) до максимального 0.5397 ± 0.11049 (оз. Ладожское). Среднее значение нуклеотидного разнообразия *O. m. dentex* (0.003201) на порядок выше, чем соответствующий показатель для *O. eperlanus* (0.000431).

При сравнении величин генетического разнообразия выборок из популяций *O. m. dentex*, объединенных по морским бассейнам, выявлено, что его максимальные значения наблюдаются в морях тихоокеанского бассейна.

Суммарно, средние показатели разнообразия для *O. m. dentex* азиатских морей значительно превышают средние значения для популяций европейской части ареала, представляющей Карское и Баренцево моря.

Достоверность генетических различий проводили с использованием тестов F_{ST} и χ^2 между всеми популяциями и объединенными по регионам выборками. Оба теста показали высоко достоверные различия между видами ($p < 0.001$). Парные значения F_{ST} между популяциями *O. eperlanus* и *O. m. dentex* варьировали от 0.97 до 0.99. В то же время, несмотря на то, что между объединенными выборками из популяций *O. m. dentex* азиатских и европейских морей наблюдалась существенная гетерогенность ($\chi^2 = 64.53$, $p = 0.0056$), показатель F_{ST} имеет крайне низкое значение (0.10081, $p < 0.001$).

При попарном сравнении выборок из популяций *O. eperlanus*, а также объединенных выборок из популяций *O. m. dentex* Карского и Баренцева морей статистически значимых различий не обнаружено. Популяции европейского региона в редких случаях отличались друг от друга с 95%-ой достоверностью, что характерно и для дальневосточных популяций. Наибольшее сходство по обоим критериям между особями европейских и азиатских популяций наблюдается между самой северной азиатской популяцией (Анадырский лиман Берингова моря) и самой восточной европейской популяцией (Байдарацкая губа Карского моря). Попарные значения F_{ST} между объединенными выборками *O. m. dentex*, представляющими моря, имели низкие значения, редко отличающиеся от нуля.

При оценке степени генетической дифференциации популяций *O. m. dentex* методом AMOVA (Excoffier et al., 1992) проводили разложение общей молекулярной дисперсии частот гаплотипов на следующие иерархические уровни: межрегиональный – между европейским и азиатским регионами; внутрорегиональный – для выборок из популяций азиатского региона и отдельно для выборок из популяций *O. m. dentex* европейского региона (табл. 4).

Таблица 4. Результаты иерархического анализа межпопуляционных гаплотипических различий корюшек рода *Osmerus* (Excoffier et al., 1992)

Уровень разнообразия	<i>d. f.</i>	Абсолютные оценки	Процент дисперсии	Вероятность (<i>p</i>)
Между объединенными по регионам выборками <i>Osmerus mordax dentex</i>	1	0.03778 (V_a)	10.08	< 0.001
	215	0.33699 (V_b)	89.92	< 0.001
	216	0.37477		
Между объединенными по морям азиатского региона выборками <i>Osmerus mordax dentex</i>	2	0.03296 (V_a)	7.85	0.00517
	4	0.01152 (V_b)	2.74	< 0.001
	141	0.37522 (V_c)	89.40	< 0.001
	147	0.41970		
Между объединенными по морям европейского региона выборками <i>Osmerus mordax dentex</i>	1	-0.01046 (V_a)	-5.44	0.11691
	2	0.01345 (V_b)	7.00	0.25032
	65	0.18923 (V_c)	98.44	0.95872
	68	0.19222		

Анализ показал, что основная часть молекулярного разнообразия тихоокеанской зубатой корюшки заключена внутри выборок (89.40% дисперсии для азиатского региона и 98.44% для европейского региона). На обширном ареале, включающем азиатские и европейские популяции, на долю региональной компоненты дисперсии *O. m. dentex* приходится только 10.08% дисперсии. В пределах азиатской части ареала выявлена умеренная структурированность между морями (7.85% дисперсии, $p < 0.01$) и крайне низкая популяционная структурированность (2.74% дисперсии, $p < 0.001$). Таким образом, количественная оценка структурированности показывает, что большая часть внутривидовой изменчивости мтДНК *O. m. dentex* обусловлена различиями между индивидуумами внутри популяций, тогда как различия между популяциями, морскими бассейнами и популяционными группировками на уровне удаленных регионов вносят незначительный вклад в общую изменчивость мтДНК.

Величина внутривидовой дивергенции имеет очень низкие значения и в среднем составляет 0.049% для *O. m. dentex* и 0.001% для *O. eperlanus*. Межвидовая дивергенция мтДНК при этом очень высока (12.94%).

Уровень дивергенции мтДНК, рассчитанный для популяций, объединенных по принадлежности к океаническим бассейнам (атлантический, арктический и тихоокеанский), также лежит в пределах этих величин: между популяциями арктических и тихоокеанских морей – 0.46%, между популяциями Балтийского моря и арктическими – 12.90%, между популяциями Балтийского моря и тихоокеанскими – 12.76%.

Топологии NJ и MP дендрограмм гаплотипов, построенных на основании полученных оценок дивергенции нуклеотидных последовательностей, принципиально не отличаются, и характеризуется наличием двух устойчивых компактных кластеров, объединяющих гаплотипы *O. eperlanus* и *O. m. dentex* в соответствии с их видовой принадлежностью без дифференциации в зависимости от географической локализации. На UPGMA фенограммах, построенных для оценки взаимоотношений между видами и составляющими их популяциями (рис. 2), формируется два устойчивых кластера, объединяющих исследуемые популяции по их принадлежности к видам (рис. 2а), либо к морским бассейнам (рис. 2б). Очевидно, что для популяционно-генетической структуры *O. eperlanus* и *O. m. dentex* характерны низкая дифференциация популяций в сочетании с достаточно слабыми различиями у *O. m. dentex* между популяциями географически удаленных регионов.

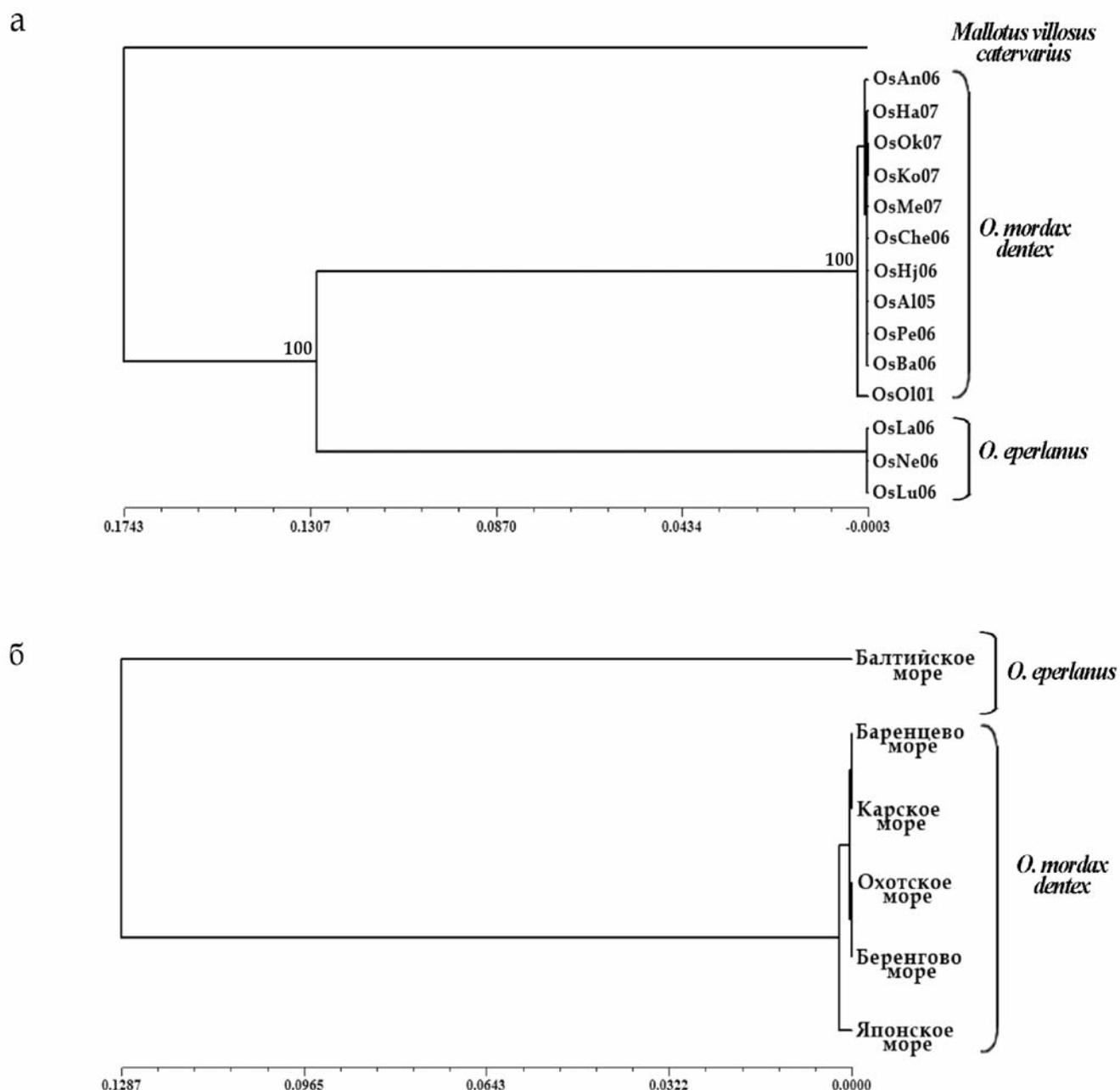


Рис. 2. Межвидовые и внутривидовые фенетические отношения корюшек рода *Osmerus* по данным ПДРФ-анализа мтДНК (метод UPGMA): а – взаимоотношения между популяциями, коэффициент кофенетической корреляции 0.98946; б – связь исследуемых популяций с их локализацией в морях арктического и тихоокеанского бассейнов, коэффициент кофенетической корреляции 0.99996. По осям – степень дивергенции нуклеотидных последовательностей мтДНК (Nei, Tajima, 1981; Nei, Miller, 1990).

Генетическая дифференциация зубатых корюшек (род *Osmerus*) по данным анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей митохондриального и ядерного геномов. Для прямого секвенирования были использованы гены *cytb* (717 п.н.) и *COI* (707 п.н.) мтДНК и интрон 1 *gpS7* (854 п.н.) яДНК. На основании полученных данных построены консенсусные NJ, MP

и Байесовское (далее ВА) филогенетические деревья отдельно для комбинированных митохондриальных и ядерного генов. Поскольку все полученные дендрограммы для митохондриальных генов оказались конгруэнтными, мы представляем только ВА филогению (рис. 3а), то же самое относится и к яДНК (рис. 3б). В соответствии с топологией данных деревьев, филум общего предка рода *Osmerus* делится на две филетические ветви, которые впоследствии формируют кластеры, объединяющие особей по их принадлежности к *O. eperlanus* и *O. m. dentex*. Оба дерева имеют высокие поддержки точек ветвления. Дифференциации на популяции в соответствии с географической локализацией не наблюдается.

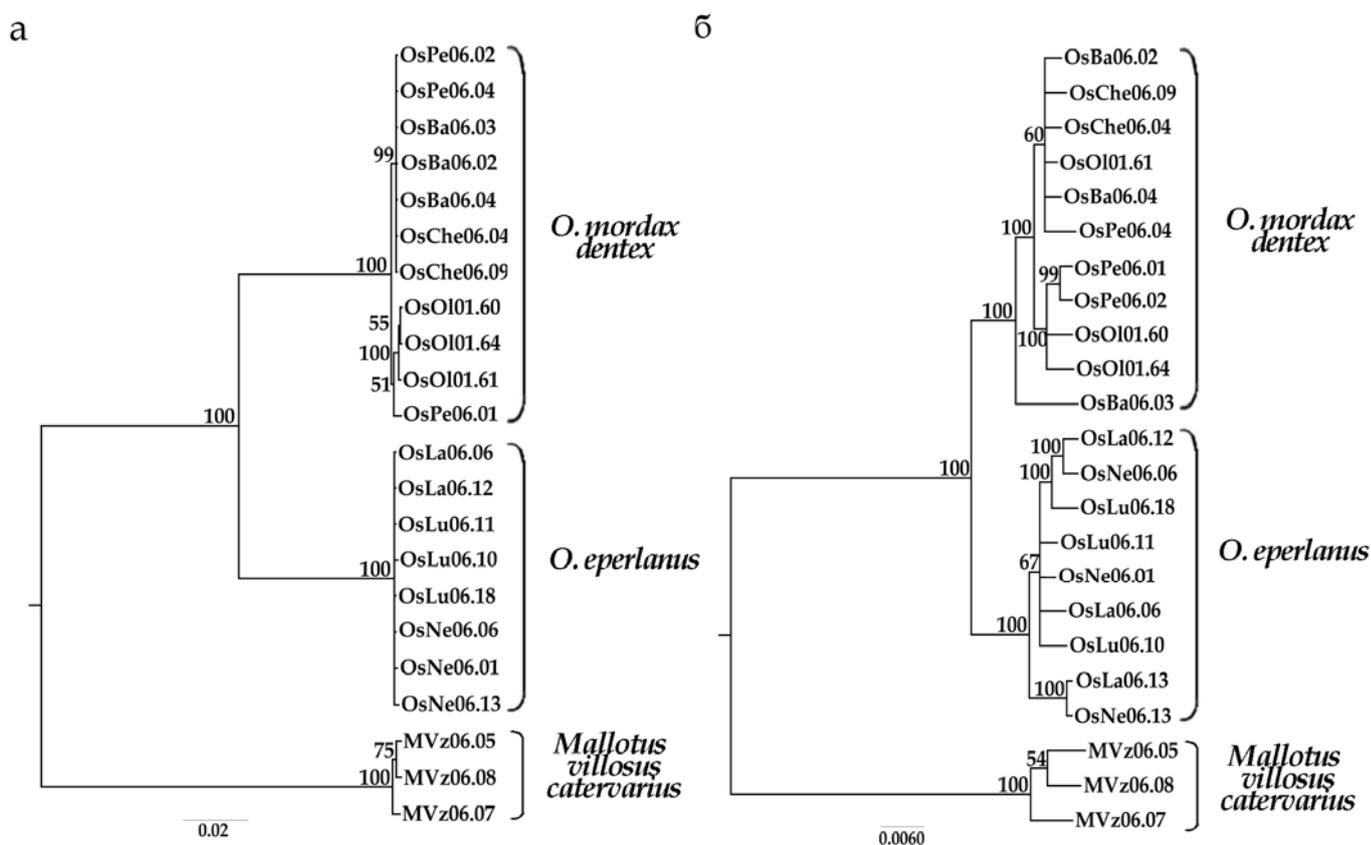


Рис. 3 Родственные взаимоотношения корюшек рода *Osmerus*. Консенсусные ВА деревья, полученные на основании анализа комбинированных нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов *cytb* и *COI* мтДНК (а) и интрона 1 *rpS7* ядерного гена (б). Цифрами в точках ветвления показаны значения байесовских апостериорных вероятностей.

Таким образом, результаты данного исследования выявили высокий уровень межвидовой дивергенции (12.94%), при низких значениях внутривидовой (0.049% – *O. m. dentex*, 0.001% – *O. eperlanus*). На всех филограммах особи *O. eperlanus* и *O. m. dentex* формируют устойчивые кластеры в соответствии с видовой принадлежностью, без подразделенности в зависимости от их географической локализации. Подтверждено единство

происхождения тихоокеанских и европейских популяций *O. m. dentex*, и монофилетичность политипичного рода *Osmerus*.

Филогенетические отношения корюшковых рыб семейства Osmeridae Российских вод. Дивергенция нуклеотидных последовательностей *cytb* и COI генов мтДНК варьировала от 8.9% до 22.2%. Попарное сравнение средних для видов значений дивергенции показало, что наименее дивергировавшими друг от друга являются представители рода *Osmerus* (8.9–9.7%). Дивергенция нуклеотидных последовательностей подвидов, входящих в состав *Mallotus villosus*, также относительно не велика и составляет 3.9%. Наиболее сильно дивергировали друг от друга виды рода *Hypomesus* (15.1–18.3%). Дивергенция митохондриальной ДНК между родами *Hypomesus* и *Mallotus* составляет 20.4%, между родами *Hypomesus* и *Osmerus* – 18.47%, между родами *Mallotus* и *Osmerus* – 17.62%. Уровень внутривидовой изменчивости для всех исследованных таксонов по митохондриальным генам не превышал 1%.

Дивергенция нуклеотидных последовательностей интрона 1 *gpS7* гена яДНК варьировала от 1.6% до 13.2%. Попарное сравнение средних для всех видов значений дивергенции показало, что наименее дивергировавшими друг от друга являются представители рода *Osmerus* (1.6–2.6%). Дивергенция нуклеотидных последовательностей подвидов, входящих в состав *Mallotus villosus*, также относительно не велика и составила 2.9%. Наиболее сильно дивергировали друг от друга виды рода *Hypomesus*: 6.6–11.8%. Дивергенция ядерной ДНК между родами *Hypomesus* и *Mallotus* составила 11.58%, между родами *Hypomesus* и *Osmerus* – 11.19%, между родами *Mallotus* и *Osmerus* – 11.37%. При этом уровень внутривидовой изменчивости для всех исследованных таксонов по интрону 1 гена *gpS7* не превышал 3%.

На основании полученных данных построены NJ, MP и ВА филограммы. Топологии ВА филограмм приведены на рис. 4. Почти во всех полученных нами филограммах, за исключением комбинированного митохондриального NJ-дерева, наблюдается кластеризация исследуемых признаков на обособленные группы, соответствующие подразделенности корюшковых рыб на три монофилетических рода: *Mallotus*, *Osmerus* и *Hypomesus*. Также почти во всех случаях, за исключением NJ-дерева, реконструированного для *cytb* и объединенных митохондриальных генов, филум монотипичного рода *Mallotus* первым дивергирует от общего гипотетического предка корюшковых рыб и является сестринским по отношению к кладе *Osmerus* и *Hypomesus*. Филум мойвы *Mallotus villosus* формирует два компактных кластера, один из которых объединяет *M. v. villosus* из Атлантического (Девисов пролив, Лабрадор) и Северного Ледовитого океанов (Карское море), второй – представителей *M. v. catervarius* из Тихого океана (Охотское море).

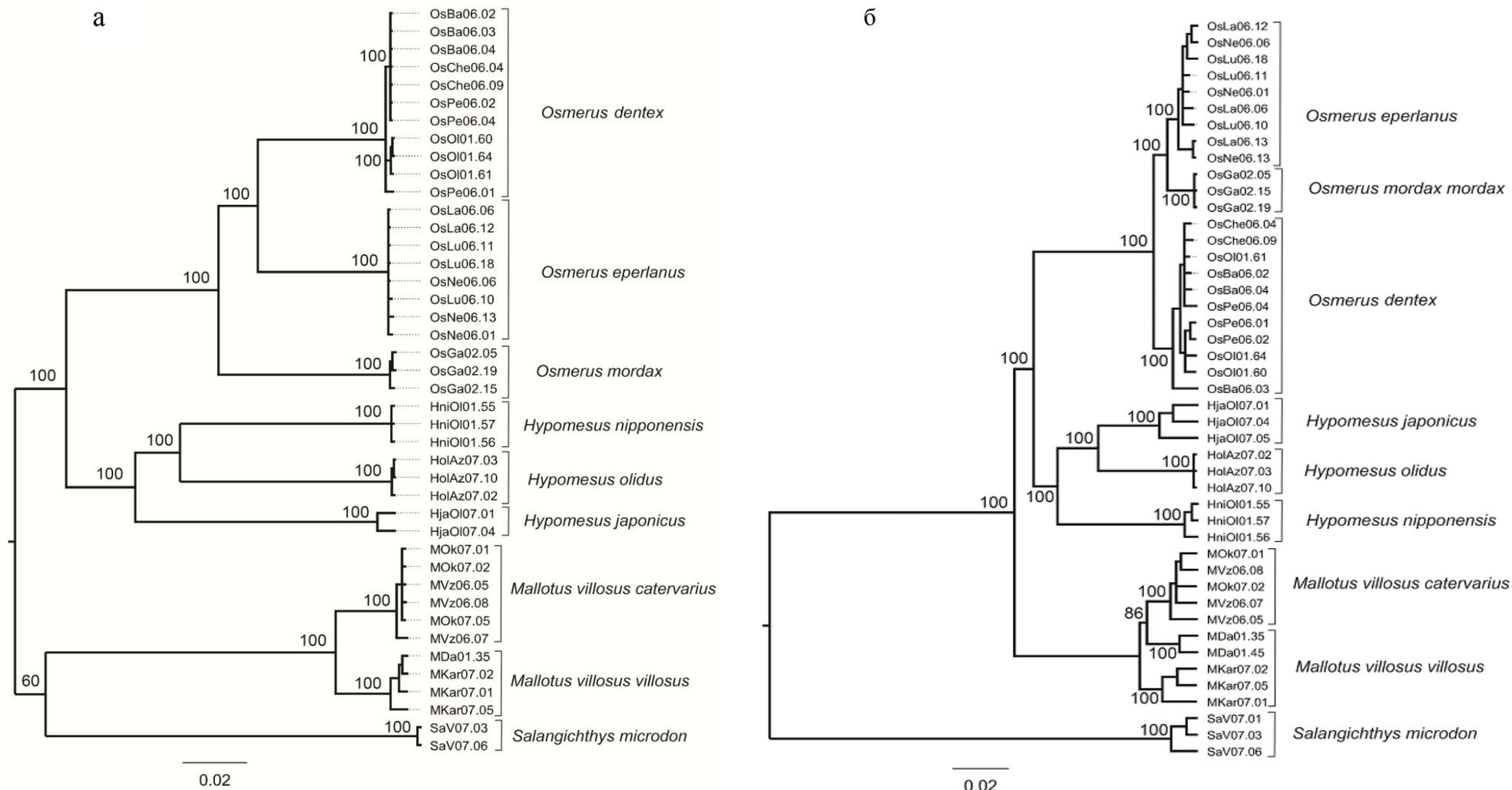


Рис. 4. Филогенетические отношения корюшковых рыб семейства Osmeridae, обитающих в Российских водах по данным Байесовского анализа: а – на основании анализа изменчивости комбинированных нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов *cytb* и *COI* мтДНК; б – на основании изменчивости нуклеотидных последовательностей интрона 1 ядерного гена *gpS7*. Цифрами в точках ветвления показаны значения байесовских апостериорных вероятностей.

Osmerus и *Hypomesus* более близки друг к другу, так как после дивергенции ветви рода *Mallotus* еще некоторое время эволюционируют одним филумом, который позднее дивергирует на две сестринские филетические ветви, соответствующие современным политипичным родам *Osmerus* и *Hypomesus*. Внутри рода *Osmerus* формируются два устойчивых кластера: один из них объединяет особей *O. m. dentex* из тихоокеанского и арктического бассейнов (Японское, Баренцево и Карское моря), второй – *O. eperlanus* из бассейна Балтийского моря, относящегося к Атлантическому океану.

Представители корюшек рода *Hypomesus* на всех дендрограммах образуют монофилетическую группу, объединяющую три отдельных кластера, соответствующих видам *H. olidus*, *H. nipponensis* и *H. japonicus*.

Но при этом, в соответствии с одними дендрограммами первый цикл дивергенции предка рода *Hypomesus* связан с видом *H. nipponensis*, а *H. olidus* и *H. japonicus* эволюционируют еще некоторое время совместно. В соответствии с другими дендрограммами, первым дивергирует *H. japonicus*. В соответствии с третьими, первым от общего предка дивергирует вид *H. olidus*.

Полученные нами результаты не поддерживают филогений, основанных на морфологических данных (Chapman, 1941; McAllister, 1963; Клюканов, 1975, 1977; Johnson, Patterson, 1996 и др.), но в основном хорошо согласуются с выводами, полученными на основании молекулярных данных (Fu et al., 2005; Ilves, Taylor, 2009) и поддерживают монофилетичность родов *Osmeridae*. Однако, существуют противоречия в поддержках точек ветвления филумов родов *Osmerus*, *Hypomesus* и *Mallotus* на некоторых дендрограммах. Исследование Илвес и Тейлора (Ilves, Taylor, 2009), показало, что филогении по молекулярным данным более правдоподобны, по сравнению со всеми не имеющими консенсусного решения морфологическими гипотезами. Картирование морфологических признаков на молекулярную филогению позволило выявить широко распространенную гомоплазию морфологических признаков, являющуюся первопричиной несовпадения выводов, основанных на них (Ilves, Taylor, 2009). На многих полученных нами дендрограммах обращает на себя внимание очень короткая длина ветвей видовых кластеров, что также наблюдается при филогенетических исследованиях, проведенных другими авторами. Известно, что «быстрое» видообразование, проявляющееся в генных деревьях в виде формирования коротких междоузлий, может скрывать истинные родственные отношения между видами, а также может быть фактором, индуцирующим отличающиеся топологии дендрограмм (Maddison, 1997).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование с использованием анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов внутривидовой генетической изменчивости мойвы *Mallotus villosus catervarius* – представителя монотипичного рода *Mallotus* и корюшек *Osmerus eperlanus* и *Osmerus mordax dentex* из политипичного рода *Osmerus* выявило ряд как отличительных, так и общих особенностей. При анализе вариабельных генов (A6/A8/COIII, ND3/ND4L/ND4 и ND5/ND6) у мойвы были обнаружены высокие показатели генетического разнообразия. Оценка географической подразделенности полиморфизма ДНК с помощью критерия F_{ST} , χ^2 и тестирование выборок методом AMOVA показали, что основная часть внутривидовой изменчивости мтДНК мойвы обусловлена различиями между особями внутри единой панмиктической популяции.

Тестирование степени генетической дифференциации популяций видов *Osmerus mordax dentex* и *Osmerus eperlanus* также показало крайне низкую популяционную структурированность у первого и полное ее отсутствие между исследованными популяциями у второго. Высокие значения гаплотипического разнообразия при низких значениях нуклеотидного у мойвы, европейской и тихоокеанской корюшек свидетельствуют о быстром росте численности их популяций, которое они испытывают в настоящее время (Nei et al., 1975).

Общей особенностью внутривидовой организации мойвы, европейской и азиатской корюшек является очень слабая популяционно-генетическая структурированность. Несмотря на то, что статистически значимые различия иногда обнаруживаются на некоторых уровнях популяционной организации, нуклеотидная дивергенция между выборками и величины мер генетической дифференциации имеют очень низкие значения, в результате чего корреляции между географическим расстоянием и генетической дивергенцией не наблюдается ни у одного из исследованных видов. Высокое гаплотипическое разнообразие мойвы и радиальные структуры генеалогий ее гаплотипов с одним и тем же центральным гаплотипом, указывают на то, что в недавнем историческом прошлом мойва Охотского моря испытала значительное падение эффективной численности в результате прохождения через «бутылочное горлышко» и в настоящий момент находится в состоянии экспоненциального роста. Низкий уровень полиморфизма *O. eperlanus* объясняется, скорее всего, частичной потерей генетического разнообразия у исследуемых популяций, возникающей под воздействием климатических и антропогенных факторов, которые также обуславливают относительно частое прохождение данными популяциями «бутылочного горлышка» (Сендек и др., 2005).

Результаты анализов филогенетических отношений между видами семейства Osmeridae (NJ, MP и Байесовский) поддержали мнение других исследователей о его подразделенности на три монофилетических рода:

Mallotus, *Osmerus* и *Hypomesus*, и согласуются как с морфологическими (McAllister, 1963; Клюканов, 1975, 1977; Johnson, Patterson, 1996 и др.), так и с молекулярно-генетическими данными (Fu et al., 2005; Ilves, Taylor, 2009).

При шкалировании уровней дивергенции мтДНК между парами близких видов, принадлежащих к семействам Cyprinidae, Osmeridae и Salmonidae, выявлено, что для корюшковых рыб семейства Osmeridae характерны наиболее высокие показатели дивергенции среди всех анализируемых таксонов (Брыков и др., 2010). Сравнивая периоды интенсивного видообразования с глобальными палеоклиматическими изменениями в истории Земли, можно сделать вывод о том, что процессы видообразования, связанные с дивергенцией филетических линий в разных монофилетических группах, занимающих общие исторические ареалы, часто приходится на сходные интервалы времени. Сопоставление времени дивергенции между видами, рассчитанного с использованием “молекулярных часов”, выявляет совпадение периодов радиации в таксонах с палеогеологическими и палеоклиматическими глобальными изменениями в историческом прошлом Северной Пацифики. По мнению Ильвес и Тейлора (Ilves, Taylor, 2008), скорость дивергенции у видов морских рыб может составлять 1.77%. Основываясь на палеогеологических данных, они предлагают следующий эволюционный сценарий для корюшковых рыб: климатический оптимум в миоцене (25–15 млн. лет назад) позволил широко расселиться предковым формам по всей Северной Пацифике. В этот же период произошло возникновение первых двух видов рода *Hypomesus* (*H. olidus* – *H. japonicus*). Около 15 млн. лет назад климатические условия стали меняться в сторону похолодания, формирование Восточно-Антарктического ледового щита и фрагментация ареалов привели к изоляции форм и видообразованию. Дивергенция родов *Osmerus* и *Mallotus* произошла позднее, предположительно между 5.4 и 4.0 млн. лет назад, а дивергенция видов внутри рода *Osmerus* отнесена к промежутку 3.0–2.4 млн. лет назад или к среднему плиоцену (Taylor, Dodson, 1994).

Наши данные, так же как и данные других исследователей (Taylor, Dodson, 1994; Ilves, Taylor, 2008), выявили широкий временной интервал дивергенции между видами корюшковых рыб семейства Osmeridae. Вероятно, такой интервал значений определяется гомоплазией генетических признаков, которая может быть значительной (Брыков и др., 2010).

ВЫВОДЫ

1. Выявленные низкие значения нуклеотидной изменчивости и генетической дифференциации выборок мойвы *Mallotus villosus catervarius* из четырех локальных популяций Охотского моря свидетельствуют о том, что все они входят в состав единой панмиктической популяции.

2. Высокое гаплотипическое разнообразие и радиальные структуры генеалогий гаплотипов с одним и тем же центральным гаплотипом АВ указывают на то, что в недавнем историческом прошлом мойва *Mallotus villosus catervarius* Охотского моря испытала значительное падение эффективной численности в результате эффекта «бутылочного горлышка» и в настоящий момент находится в состоянии экспоненциального роста.

3. Высокий уровень межвидовой дивергенции (12.94%) европейской *Osmerus eperlanus* и азиатской *Osmerus mordax dentex* корюшек сопровождается низкой внутривидовой дивергенцией (0.049% – *O. m. dentex*, 0.001% – *O. eperlanus*).

4. Подтверждены единство происхождения тихоокеанских и европейских популяций *Osmerus mordax dentex* и монофилетичность политипичного рода *Osmerus*.

5. Исследование вероятных филогенетических связей методами NJ, MP и Байесовским показало, что филум рода *Mallotus* первым отделился от общего гипотетического предка корюшковых рыб и является сестринским по отношению к кладе *Osmerus* – *Hypomesus*.

6. Проведенные исследования установили сестринские отношения между *O. dentex* и *O. eperlanus* и базальное положение *O. mordax* внутри рода *Osmerus*. Неустойчивое положение *H. olidus* в рамках рода *Hypomesus* предположительно связано с высокой скоростью нуклеотидных замен и высоким уровнем гомоплазии исследованных генов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ***Публикации в рецензируемых журналах из списка рекомендованного ВАК:***

1. Скурихина Л.А., Олейник А.Г., Ковпак Н.Е. Изменчивость митохондриальной ДНК тихоокеанской мойвы (*Mallotus villosus catervarius*) Охотского моря по данным PCR-RFLP анализа // Генетика. 2008. Т. 44, № 7. С. 929–937.
2. Скурихина Л.А., Кухлевский А.Д., Олейник А.Г., Ковпак Н.Е. Анализ филогенетических отношений корюшковых рыб (Osmeridae) по данным изменчивости гена цитохрома *b* // Генетика. 2010. Т. 46, № 1. С. 79–91.

Публикации в материалах конференции:

3. Скурихина Л.А., Олейник А.Г., Ковпак Н.Е. PCR-RFLP-анализ митохондриальной ДНК мойвы *Mallotus villosus catervarius* Охотского моря // Международная конференция «Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб». С-Петербург, 10–12 сентября 2008 г.: Тезисы докладов. Спб.: Изд-во ГосНИОРХ, 2008. С. 74–76.
4. Ковпак Н.Е., Скурихина Л.А., Кухлевский А.Д., Олейник А.Г. Филогения корюшковых рыб (Osmeridae) по данным анализа изменчивости гена цитохрома *b* // V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 21–28 июня 2009 г.): Тезисы докладов. М., 2009. Ч. 2. С. 166.
5. Kovpak N.E., Skurikhina L.A., Kухlevsky A.D. Phylogenetic relationships of Osmeridae family fishes of Russia by mitochondrial and nuclear DNA sequencing // International Conference on Evolutionary Ecology of Fishes Diversification, Adaptation and Speciation, November 23–25, 2009, Berlin (Germany): Book of Abstracts. Berlin, 2009. P. 112.

КОВПАК

НАТАЛЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ОТНОШЕНИЯ КОРЮШКОВЫХ РЫБ РОССИИ**

АВТОРЕФЕРАТ