

# Mitochondrial DNA Sequence Variation, Demographic History, and Population Structure of Amur Sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869

S. V. Shedko<sup>a</sup>, I. L. Miroshnichenko<sup>a</sup>, G. A. Nemkova<sup>a</sup>,  
V. N. Koshelev<sup>b</sup>, and M. B. Shedko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia  
e-mail: shedko@biosoil.ru

<sup>b</sup>Khabarovsk Branch of the Pacific Research Fisheries Center, Khabarovsk, 680000 Russia

Received June 23, 2014; in final form, September 4, 2014

**Abstract**—The variability of the mtDNA control region (D-loop) was examined in Amur sturgeon endemic to the Amur River. This species is also classified as critically endangered by the IUCN Red List of Threatened species. Sequencing of 796- to 812-bp fragments of the D-loop in 112 sturgeon collected in the Lower Amur revealed 73 different genotypes. The sample was characterized by a high level of haplotypic (0.976) and nucleotide (0.0194) diversity. The identified haplotypes split into two well-defined monophyletic groups, BG ( $n = 39$ ) and SM ( $n = 34$ ), differing (HKY distance) on average by 3.41% of nucleotide positions with an average level of intragroup differences of 0.54 and 1.23%, respectively. Moreover, the haplotypes of the SM groups differed by the presence of a 13–14 bp deletion. Most of the specimens (66 out of 112) carried BG haplotypes. Overall, the pattern of pairwise nucleotide differences and the results of neutrality tests, as well as the results of tests for compliance with the model of sudden demographic expansion or with the model of exponential growth pointed to a past significant increase in the number of Amur sturgeon, which was most clearly manifested in the analysis of data on the BG haplogroup. The constructed Bayesian skyline plots showed that this growth began about 18–16 thousand years ago. At present, the effective size of the strongly reduced (due to overfishing) population of Amur sturgeon may be equal to or even lower than it was before the beginning of this growth during the Last Glacial Maximum. The presence in the mitochondrial gene pool of Amur sturgeon of two haplogroups, their unequal evolutionary dynamics, and, judging by scanty data, their unequal representation in the Russian and Chinese parts of the Amur River basin point to the possible existence of at least two distinct populations of Amur sturgeon in the past.

DOI: 10.1134/S102279541502012X

## INTRODUCTION

The family Acipenseridae comprises an ancient group of fish that dates back to the Mesozoic and is still widely, albeit patchy, distributed in the water bodies of Northern Hemisphere [1]. The fishes of this family play an important role in the ecosystems and have great commercial and aesthetic value.

The Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 is one of the seven species of sturgeon found in the Pacific comprising a specific monophyletic group of Acipenseridae, the Pacific group [2, 3]. The range of Amur sturgeon is limited to the Amur River basin. This is a large fish that can reach almost three meters long and more than a hundred kilograms weight [4]. By type of feeding, the Amur sturgeon is a bottom-eating fish, feeding mainly on aquatic insect larvae, mollusks, and (rarely) small fish [5]. Most of the Amur sturgeons feed in the mainstream of Amur River and its major tributaries. Some individuals come into the brackish waters of the Amur Liman for feeding. There are single findings in waters with marine salinity [6]. Amur stur-

geons spawn exclusively in fresh water, usually in the mainstream of Amur River. This species was formerly widely distributed throughout the basin of the Amur River, from the Onon and Argun rivers up to Amur Liman. However, it is presently found in significant quantities only in the Lower Amur (below the confluence of the Ussuri River) [7]. Because of its valuable nutritional qualities, Amur sturgeon was long subjected to extensive legal and illegal fishing, which led to a significant drop in its number by the middle of the last century [5]. From 1958 to the present commercial and sport fishing of the Amur sturgeon is banned in the Russian part of the Amur River basin. In the Chinese part of the basin, its harvest has never ceased, and the volume of its catch, by contrast, only increased in the second half of the last century [8]. Since 1986, the Amur sturgeon is included on the Red List of the International Union for Conservation of Nature (IUCN Red List of Threatened Animals) as a vulnerable species. Because of the steady decline in the number of Amur sturgeon, it received the status of an

endangered species in 1996 and in 2010 was given the status critically endangered species [9].

The objective of this study was to analyze the variability of the mitochondrial DNA control region in Amur sturgeon from Lower Amur. As a result of using this highly polymorphic marker, a kind of genetic portrait of a population of *A. schrenckii*, constructed based on the analysis of samples from the region where this species until recently was more or less numerous, was obtained. This portrait will be useful not only for laying the bases for monitoring Amur sturgeon genetic diversity and environmental protection measures but as a primer for further studies of its population structure and evolutionary history.

## MATERIALS AND METHODS

Material on the Amur sturgeon was collected during a scientific control catch conducted by the Khabarovsk branch of TINRO center in the lower reaches of Amur River (the region of the city of Nikolayevsk-on-Amur, about 53°7' N, 140°40' E). in May–June 2009 ( $n = 41$ ), August–September 2009 ( $n = 43$ ), and in September 2010 ( $n = 27$ ). In addition, the alcohol-fixed fin piece from one individual of Amur sturgeon, accidentally caught in the Ulbansky Bay of Okhotsk Sea (53°32' N, 137°19' E) in September 2009, was obtained from the fishermen. The samples were taken by means of noninvasive technique (a small piece of skin on the back edge of pectoral fin was cut off and then placed in 96% alcohol).

The body length in 112 studied sturgeons ranged from 32 to 182 cm ( $115.8 \pm 38.6$ ) and had a bimodal distribution. In 33 individuals, the body length was less than 100 cm ( $61.7 \pm 17.6$ ;  $\text{lim} = 32\text{--}96$ ), it was equal to or greater than this threshold and in 79 individuals ( $138.5 \pm 15.4$ ,  $\text{lim} = 100\text{--}182$ ).

In addition to the samples taken from wild, 16 Amur sturgeon individuals (12 underyearlings and four yearlings) obtained from the Anyuiskiy hatchery (Nanai raion of Khabarovsk krai) in August 2008 were also analyzed. Previously, these individuals were used in the study of the karyotype structure of Amur sturgeon [10].

Total DNA was isolated by the standard phenol-chloroform method using proteinase K. The full-length sequence of the mtDNA control region (D-loop) was amplified using primers LproF and DL651 [11], specific to its flanking genes for transfer RNA (tPHK-Pro and tPHK-Phe, respectively).

Amplifications were performed on the Biometra Tprofessional thermal cycler (Biometra, Germany) in 25  $\mu\text{L}$  of a reaction mixture including 0.1 to 0.2  $\mu\text{g}$  of total DNA; 2.5  $\mu\text{L}$  buffer (60 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 25 mM KCl; 10 mM 2-mercaptoethanol; 0.1% Triton X-100), 0.5  $\mu\text{L}$  of deoxynucleotide triphosphate mixture from 10 mM solution; 2.5  $\mu\text{L}$  of both primers (Biosset, Novosibirsk, Russia) from their

2  $\mu\text{M}$  solutions; 2 units of *Taq* polymerase (SibEnzym, Novosibirsk, Russia); and deionized water.

Polymerase chain reaction was performed according to the protocol including initial denaturation (94°C for 120 s), followed by 30 cycles of amplification (94°C for 45 s; 52°C for 30 s; 72°C for 60 s); and final extension (72°C for 480 s). The amplification products were purified by means of reprecipitation and sequenced using the Big Dye Terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems, United States) with primers DL651, AHR, and SchF [11]. The reaction products were separated on an ABI Prizm 3130 automated analyzer (Applied Biosystems, United States/Hitachi, Japan) at the Institute of Biology and Soil Science, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences (Vladivostok). The ABI chromatograms were arranged into contigs in programs of the Staden software package [12].

Multiple alignment of the obtained nucleotide sequences was performed in the MAFFT v. 6.859 software program [13] and by the method of iterative refinement, FFT-NS-i.

The main variables characterizing the variability of the obtained D-loop sequences, including the observed ( $h$ ) number of haplotypes, the number of polymorphic (segregating) nucleotide positions ( $S$ ), the total number of variable positions ( $PI$ ,  $S$ , plus indels), the number of singletons ( $si$ ), haplotypic ( $H$ ) and nucleotide ( $\pi$ ,  $\rho$  distance) diversity, and others, were determined with the use of the FaBox v. 1.4 utility suite [14] and the Arlequin v. 3.5.1.3 software program [15].

The BIONJ tree was built with the PAUP 4.0b10 software program [16] and the HKY nucleotide substitution model, with an account of the main features of the D-loop evolution, including unequal proportions of the four types of nucleotides and different transition and transversion rates. The mtDNA control region sequences from related species of sturgeon, white sturgeon *A. transmontanus* (AB042837, AF184108, and X54348), and Dabry's sturgeon *A. dabryanus* (AY510085) from the GenBank/NCBI database were used as outgroup.

The assumption regarding the selective neutrality of the observed DNA polymorphism was verified through a battery of tests considering various aspects of this variability. These tests were represented by the Ewens–Watterson test [17, 18] developed from the infinite alleles model and tests based on the infinite sites model (Tajima's  $D$  [19], Fay and Wu's  $H$  [20], Fu's  $F_s$  [21], and Kelly's  $Z_nS$  [22] tests).

The Ewens–Watterson test was performed in the Arlequin software program and other tests were performed in the DnaSAM software program [23]. In the latter case, the null distribution of the statistics was generated by the Monte Carlo procedure with 10000 pseudo-random coalescent simulations.

During the investigation, it was demonstrated that the D-loop variants found in the Amur sturgeon formed two clearly defined groups of haplotypes (hap-

logroups BG and SM, see below). Because of this, in addition to the analysis of summarized data, we examined each of these haplogroups separately.

It is known that each of the tests mentioned is more or less sensitive to the previous demographic history of a population [19, 21, 22, 24, 25]. Because of this, the deviation of the observed DNA polymorphism pattern from the expected, based on the theory of neutrality, may actually be caused not by the action of selection but by the recent population decline or growth.

Possible changes in the Amur sturgeon population size over time (demographic history) were assessed by the following approaches. First, it was established whether the mismatch distribution pattern of the Amur sturgeon mtDNA haplotypes was multimodal (corresponds to the case of a demographically stable population) or unimodal (reflecting a recent sharp increase in the population size) [26].

Then, the model of sudden demographic expansion [27] was tested with the Arlequin software program. In this case, the significance of the statistics tested, i.e., the sum of squared deviations between the observed and expected mismatch distribution patterns (*SSD*), was evaluated using a parametric bootstrap approach with 10000 pseudo-random replicates.

Next, a relatively simple model of exponential population growth was tested. The parameters of this model ( $\theta$ , the population parameter,  $2N_{ef}\mu$ , where  $N_{ef}$  is the effective female population size and  $\mu$  is the nucleotide substitution rate per site per generation;  $g$  is the exponent of the population growth rate) were determined using two approaches, the maximum likelihood method [28] and Bayesian inference [29]. In the first case, the Fluctuate v. 1.4 software program [28] was used. The search settings were empirical nucleotide frequencies; a transition-to-transversion ratio of 37; and random starting tree. The analysis consisted of 30 short chains (50000 generations each), with sampling of every 50th generation; followed by 20 long chains (500000 generations each), with sampling of every 50th generation. Starting  $\theta$  was an estimate calculated based on the number of polymorphic (segregating) sites. In the second case, the BEAST v. 1.7.5 software program [30] was used with the nucleotide substitution model being HKY and a relaxed molecular clock with uncorrelated lognormal distribution of nucleotide substitution rates along the tree branches. The analysis was run for 10 million cycles, with sampling every 1000th (burn-in was the first 10% of cycles). Summation of the results of the Bayesian analysis was performed in the Tracer v. 1.5 software program. In both cases, the model was recognized as adequate if the null value did not fall into the 95% confidential (or plausible) interval of the population growth rate exponent ( $g$ ).

Finally, in addition to simple parametric models, the most flexible approach, a skyline plot, was used [31]. This method is based on an analysis of the pattern of the reconstructed genealogy of the DNA sequences

in the sample and provides an opportunity to explore the history of changes in the population size without the need for a priori constraints on the possible patterns of its size changes through time. The Bayesian skyline-plot method takes into account the uncertainty that inevitably accompanies the computation of the DNA sequence genealogy in the sample (in terms of topology and the position of coalescent events over the time scale), and at the same time this method makes it possible to evaluate the parameters of sequence evolution models, the genealogy of these sequences, and the demographic history of the population from which they were derived [32].

Bayesian skyline plots were built using the BEAST software program [30] with the settings as follows. The nucleotide substitution model was HKY. The number of groups combining relatively close coalescences (chosen on the basis of computing Bayes factor for their different numbers) was two for haplogroup BG and four for haplogroup SM and the total sample. The molecular clock mode was represented by a relaxed clock with uncorrelated lognormal distribution rates of nucleotide substitutions along the tree branches. The Bayesian analysis run length depended on how quickly the effective sample sizes (more than 200) were achieved for each of the model parameters. These values for the BG and SM haplogroups, as well as for the total sample, constituted 16, 10, and 24 million cycles, respectively, sampling every 1000th (burn-in was the first 10% of the total number of cycles). When constructing Bayesian skyline plots, we used an mtDNA control region evolutionary rate estimate equal to  $1.2 \times 10^{-7}$  substitutions per nucleotide position per year per lineage. It is the middle value for the range of estimates ( $1.1 \times 10^{-7}$  to  $1.3 \times 10^{-7}$ ) calculated for the corresponding mtDNA region of white sturgeon (phylogenetically closest species to the Amur sturgeon) based on the number of substitutions accumulated in one of its populations after the release of Fraser River from the ice shield/shell 10 to 12 thousand years ago [33]. As a result, the parameter characterizing the population size was expressed as the product of the effective female population size by the generation length ( $N_{ef}T$ ).

## RESULTS

The structure of the mtDNA control region in the investigated specimens of Amur sturgeon is not principally different from the one that was established for this species using other sturgeon samples [11, 34]. Part of the D-loop adjacent to the tRNA-Pro gene (its 3' end) consists of blocks of tandemly arranged 82-bp repeats, each of which contains the *TAS II* (termination-associated sequence) element at its 5' end. It is followed by one truncated (39-bp) copy, which lacks a part of the repeat bearing the *TAS II* element. Next is the main part of the D-loop.

The examined D-loop region includes the last full and truncated copy of the repetitive element (121 bp in total), as well as the rest of the D-loop (675 to 691 bp), which is adjacent to the tRNA-Phe gene and contains the *TAS III* and *CSB I–III* (conserved sequence block) elements. Thus, in different samples, the total length of the control region (CR) fragment involved in the analysis ranged from 796 to 812 bp.

Overall, in 128 specimens of Amur sturgeon, 74 different CR variants were identified (Fig. 1). These variants differed either in single nucleotide substitutions and indels, or (pairs SCH4–5 and SCH30–31) only in indels.

In the specimens obtained from natural conditions ( $n = 112$ ), a total of 73 haplotypes (SCH1–73) were identified.

In the Amur sturgeon individuals taken from Anyuysk fish hatchery ( $n = 16$ ) and subjected earlier [10] to karyotype analysis, a total of four haplotypes were identified. Of these, 12 individuals carried haplotypes SCH7 (eight underyearlings), SCH34 (three yearling), and SCH23 (one yearling). The remaining four individuals (yearlings) had haplotype SCHK, which was not detected in samples from the natural population of Amur sturgeon. Thus, it can be argued that the karyotyped Amur sturgeon specimens were the descendants of at least four different females. Note that the basic karyotype characteristics of these individuals were homogeneous [10].

In the mtDNA CR from about 40% of the examined individuals (50 out of 128), relatively large deletions ranging in size from 13 to 14 bp (from nucleotide position 543 to 556 in the array of aligned sequences, Fig. 1) were identified. This deletion was located immediately downstream of the *CSB I* region. The sizes of other indels were much smaller and constituted one (four cases) or two (single case) nucleotide positions. Other mutations in the CR fragment of interest were represented by single nucleotide substitutions affecting a total of 73 nucleotide positions. Most of these mutations were transitions, while substitutions of transversion type were observed only in three nucleotide positions.

Haplotypes differing in the presence/absence of the 13–14-bp deletion were also different in a large number (about 26, on average) of point nucleotide substitutions and thereby formed the two groups referred to as haplogroups SM (SCH40–73 and SCHK, with deletion) and BG (SCH1–39, without deletion).

In Amur sturgeon, variable positions in the mtDNA CR were found to be distributed nonrandomly (Fig. 2). Most of the single nucleotide substitu-

tions were observed in the initial part of the analyzed mtDNA fragment, in the region of repetitive elements (positions 1–120) and the D-loop *TAS III* region (positions 121–200 in the array of aligned sequences), which accounted for the mode of this distribution, as in the case of BG and SM haplotypes. It is interesting that the preserved 3' half of the last repetitive element copy (segment 81–120) was about two times more variable than the corresponding 3' part of the next to last (full) copy of the 82-bp repeat (segment 1–40). Another region of single nucleotide substitution concentration was the 5' end of D-loop in the area of the *CSB I–III* elements. Moreover, if in of BG haplotypes, variable positions were distributed more or less randomly, they formed a distinct mode in their distribution SM haplotypes with a 481–520 segment (Fig. 2). At the same time, it should be noted that haplogroups BG and SM were generally homogeneous regarding the distribution of variable positions ( $P = 0.548$ , Fischer's exact test).

Comparison of the haplotype frequencies in Amur sturgeon samples taken in different seasons (May–June 2009, August–September 2009, September 2010) that used an exact nonparametric test of population differentiation [35] showed their homogeneity ( $P = 0.803$ ). A similar result was obtained when using Wright's  $F$ -statistic or molecular analysis of variance [36],  $F_{ST} = -0.004$  ( $P = 0.898$ ) and  $\Phi_{ST} = -0.005$  ( $P = 0.458$ ).

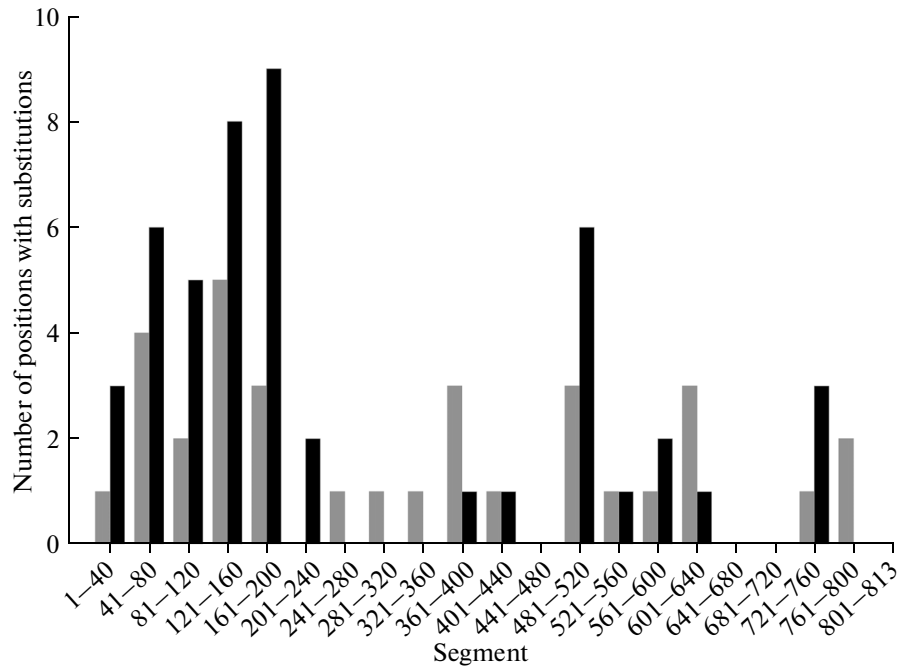
Samples grouped by year (2009 and 2010) were also homogeneous: exact test,  $P = 0.251$ ;  $F_{ST} = -0.001$  ( $P = 0.554$ ), and  $\Phi_{ST} = 0.013$  ( $P = 0.213$ ).

A comparison of two size groups of Amur sturgeon (body length 32–96 cm and 100–182 cm) also did not reveal their heterogeneity: exact test,  $P = 0.680$ ,  $F_{ST} = -0.004$  ( $P = 0.857$ ), and  $\Phi_{ST} = -0.017$  ( $P = 0.990$ ).

Standard indices characterizing the sequence variation of the mtDNA CR fragment examined in wild-caught Amur sturgeons are shown in the table (nos. 1–11). The values of most estimates obtained for haplogroup SM appeared to be higher than those calculated for haplogroup BG. The differences between these haplogroups in the levels of haplotypic diversity (0.985 versus 0.938, which is statistically significant,  $Z = -1.85$ ,  $P = 0.032$ ), as well as in the values of  $\theta_h$  and  $\theta_H$  calculated, which is based on the number of haplotypes in the sample and their diversity, deserve special interest. Apparently, the reason for these differences is the relatively high frequency of haplotype SCH34, which is about three times higher than what is expected according to the Ewens sampling theory [17], if one takes into account the model of infinite number of alleles in the conditions of their selective

**Fig. 1.** Variable positions in the mtDNA D-loop of Amur sturgeon (numbering was performed relative to the first position of the last full copy of the 82-nucleotide repeat), haplotypes and their frequencies in the samples from natural and artificial (figures in brackets) populations.





**Fig. 2.** Distribution of variable positions (ordinate) over 40-nucleotide segments of the mtDNA D-loop fragment of the examined Amur sturgeon. Black and gray mark the estimates obtained for the haplotypes of SM and BG groups, respectively.

neutrality and the genetic drift influence—16 versus six. This suggestion is supported by the finding that an artificial reduction in the absolute number of haplotypes to the expected value (from 16 to 6) leads to complete leveling of the differences between haplogroups SM and BG for the  $H$ ,  $\theta_h$ , and  $\theta_H$  indices (the values of these indices for haplogroup BG become equal to 0.982, 55.6, and 52.1, respectively).

The high frequency of haplotype SCH34 causes a statistically significant ( $P < 0.000$ ) excess of homozygosity detectable by the Ewens–Watterson test [17, 18], not only in the case haplogroup BG alone but also in the analysis of the combined data (table). It should be noted that an artificial reduction of the number of haplotype SCH34 from 16 to 6 halved the homozygosity estimate for haplogroup SH and for the total sample ( $EW = 0.036$  and  $EW = 0.018$ , respectively), bringing them into agreement with the theoretically expected values ( $P = 0.750$  and  $P = 0.592$ , respectively).

Analysis of the mtDNA CR variability patterns in the samples of Amur sturgeon by other neutrality tests led to the following results.

Tajima's test, when considering haplogroup BG, revealed a significant excess of mutations characterized by low frequencies,  $D = -1.74$ ,  $P = 0.014$ . For haplogroup SM, the value of the  $D$ -statistic was also less than zero ( $\theta_\pi < \theta_s$ ); however, the absolute value was small, and this departure from the model of neutral polymorphism was not statistically significant. Since the total sample is represented by a mixture of haplotypes from two quite distinct haplogroups, anal-

ysis of this sample yielded the expected positive value ( $\theta_\pi > \theta_s$ ) of  $D$  statistics. However, even in this configuration of the test, the assumption of the selectively neutral nature of the observed polymorphism was not rejected.

The results of the application of Fay and Wu's  $H$  test [20] were equivocal, as they were heavily dependent upon the outgroup used (the latter is necessary for the identification of derived mutations). On the example of BG and SM haplogroups, it can be seen that the more remote the outgroup was, the greater was the value of  $H_{FW}$  statistics and the more likely was the achievement of statistical significance of the test (see the table).

The results of the  $Z_{nS}$  test [22] generally repeated the pattern obtained using Tajima's test. Statistically significant departure from the model of neutral polymorphism was observed only in the analysis of haplogroup BG. The values of  $Z_{nS}$  statistics calculated for haplogroup SM and the total sample were consistent with those expected in case of the model validity. Note that the  $Z_{nS}$  values obtained for the latter two groups did not differ from each other but were higher than the value of the  $Z_{nS}$  statistics calculated for haplogroup BG by 3.5 and 5 times, respectively. These data indicate that the groups examined were different with respect to the shape of the haplotype genealogy [22].

According to Fu's  $F_s$  test [21], a highly statistically significant ( $P < 0.000$ ) excess of recent mutations was characteristic of all three grouping variants of the Amur sturgeon specimens (see the table).

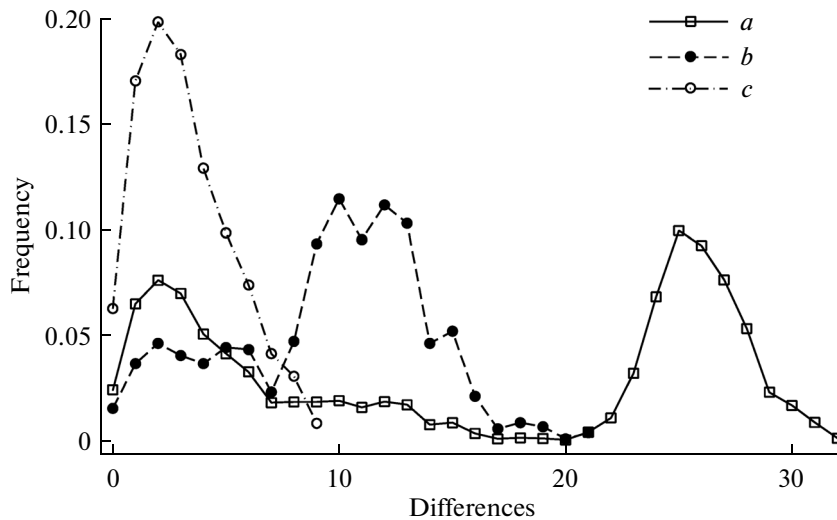
Indices characterizing D-loop variability in two groups of Amur sturgeon isolated based on the type of the mtDNA haplotype and in their total sample, 1 to 11; results of neutrality tests, 12 to 16; results of testing for compliance with the model of sudden demographic expansion [27], 17, 18; and the main parameters of the exponential population growth model, calculated by the maximum likelihood approach (19, 20) [28] and Bayesian inference (21, 22) [29]

No.	Statistic <sup>1</sup>	BG-haplogroup ( $n = 66$ )	SM-haplogroup ( $n = 46$ )	Total sample ( $n = 112$ )
1	$L$	812	799	813
2	$S$	33	48	73
3	$PI$	36	52	92
4	$si$	13	15	16
5	$h$	39	34	73
6	$H$	$0.938 \pm 0.024$	$0.985 \pm 0.008$	$0.976 \pm 0.009$
7	$\theta_h$ (95% CI)	39.2 (24.1–64.0)	57.4 (31.1–108.7)	89.8 (61.1–133.0)
8	$\theta_H$	$13.6 \pm 6.0$	$61.8 \pm 33.4$	$38.9 \pm 15.3$
9	$\theta_S$	$6.93 \pm 2.14$	$10.92 \pm 3.40$	$13.80 \pm 3.60$
10	$\theta_\pi$	$3.21 \pm 1.86$	$9.52 \pm 4.94$	$15.75 \pm 7.84$
11	$\theta_c$ (95% CI)	0.024 (0.016–0.035)	0.034 (0.023–0.052)	0.059 (0.044–0.076)
12	$EW(P)$	0.076 (0.000)	0.037 (0.490)	0.033 (0.000)
13	$D(P)$	-1.74 (0.014)	-0.51 (0.345)	0.35 (0.716)
14	$H_{FW}(P)$	-0.78 (0.142) <sup>2</sup>	-0.11 (0.289) <sup>3</sup>	–
		-3.27 (0.008) <sup>4</sup>	-1.51 (0.065) <sup>5</sup>	–
		-6.52 (0.000) <sup>6</sup>	-3.80 (0.002) <sup>6</sup>	-3.59 (0.008) <sup>6</sup>
15	$Z_{nS}(P)$	0.02 (0.001)	0.07 (0.060)	0.10 (0.421)
16	$F_s(P)$	-37.51 (0.000)	-17.39 (0.000)	-36.57 (0.000)
17	$\tau$ (95% CI)	1.70 (0.59–6.41)	12.98 (7.24–17.42)	42.31 (17.65–50.76)
18	$SSD(P)$	0.00075 (0.814)	0.00626 (0.434)	0.03056 (0.002)
19	$\theta_g$	$0.100 \pm 0.017$	$0.076 \pm 0.011$	$0.079 \pm 0.008$
20	$g$	$1896.9 \pm 138.0$	$455.2 \pm 70.1$	$209.4 \pm 33.1$
21	$\theta_g$ (95% HPD)	0.108 (0.034–0.262)	0.076 (0.030–0.144)	0.088 (0.052–0.138)
22	$g$ (95% HPD)	1785.8 (754.4–3093.9)	461.2 (158.7–860.1)	263.7 (88.0–513.8)

<sup>1</sup> Interpretation of the designations:  $L$ , the length of aligned sequence array;  $S$ , number of positions with nucleotide substitutions;  $PI$ , total number of variable positions ( $S$  plus indels);  $si$ , the number of singletons (the sites with nucleotide substitutions found in single individuals from the sample);  $h$ , the number of haplotypes;  $H$ , haplotypic diversity;  $\theta_{h/H/S/\pi}$ , population parameter  $2N_{ef}(\nu)$  ( $N_{ef}$ , effective female population size;  $\nu$ , nucleotide substitution rate/nucleon/generation), calculated based on the number of haplotypes ( $h$ ) in the sample, their diversity ( $H$ ), the number of segregating sites ( $S$ ), or pairwise nucleotide differences ( $\pi$ ), respectively;  $EW$ , Ewens–Watterson test [17, 18];  $D$ , Tajima’s test [19];  $H_{FW}$ , Fay and Wu’s  $H$  test [20], in normalized form [25];  $Z_{nS}$ , Kelly’s test;  $F_s$ , Fu’s  $F_s$  test [21];  $\tau$ , time in mutational units,  $2\nu T$  ( $\nu$ , nucleotide substitution rate/nucleon/generation,  $T$ , number of generations passed since demographic expansion);  $SSD$ , sum of square deviations between the observed and expected mismatch distribution patterns in the model of sudden demographic expansion;  $\theta_{c/g}$ , population parameter  $2N_{ef}\mu$  ( $N_{ef}$ , effective female population size, and  $\mu$ , nucleotide substitution rate/site/generation), calculated based on the haplotype coalescence analysis in the conditions of stable in size ( $\theta_c$ ) or growing according to the exponential model ( $\theta_g$ ) population;  $g$ , exponent of the population growth;  $\pm$ , standard deviation; CI, confidence interval; HPD, highest posterior density interval;  $P$ ,  $p$  value (the probability of obtaining a test statistic equal to or more extreme than the observed, given that the null hypothesis is true). <sup>2–6</sup> Results of  $H_{FW}$  test obtained using as outgroup: haplotype SCH35 (<sup>2</sup>) and SCH55 (<sup>3</sup>), haplogroup SM (<sup>4</sup>), haplogroup BG (<sup>5</sup>), or haplotypes of *A. transmontanus* (<sup>6</sup>).

The mismatch distribution between pairs of haplotypes from haplogroup BG was unimodal with the mode at the beginning of the scale (Fig. 3). The mode of this distribution obtained for haplotypes of haplogroup SM was shifted towards higher values (10 and 12). In this case, its shape can also be characterized as unimodal but

with some reservations, since an additional peak, coinciding in its position with the mismatch distribution pattern in haplogroup BG, is shown in the left part of the distribution (Fig. 3). In the total sample, the mismatch distribution in the mtDNA haplotypes was bimodal with the modes in the region of values of 2 and 25.



**Fig. 3.** Frequency distributions of pairwise nucleotide differences obtained for the total sample (*a*) and for the SM (*b*) and BG (*c*) groups of the Amur sturgeon mtDNA haplotypes separately.

It is well known that unimodal distribution of pairwise differences can be the signature of recent rapid population growth [26]. The results of testing a sudden stepwise demographic expansion [27] fit this model when haplogroups BG and SM were tested separately. In this model, the size of haplogroup BG, expressed in terms of population parameter  $\theta$ , in the recent past ( $\tau = 1.7$ ) increased from two to 3560. For haplogroup SM, the calculations showed that this population growth was not so vast (in  $\theta$  units the group size increased from 0 to 34), and it occurred much earlier ( $\tau = 13$ ). However, for the total sample, the model was found to be invalid and was rejected at a high ( $P = 0.002$ ) level of significance.

Two approaches to the analysis of the mtDNA haplotype coalescence (maximum likelihood [28], and Bayesian [29]) led to almost the same values of basic parameters of the model of exponential population growth (table). Furthermore, this model was found to be valid regardless of the grouping options of the Amur sturgeon specimens. In the use of the maximum likelihood approach (in this case, confidence limits were evaluated using triple standard deviation) and the Bayesian analysis, the confidence intervals of the growth rate exponent ( $g$ ) did not include the zero value.

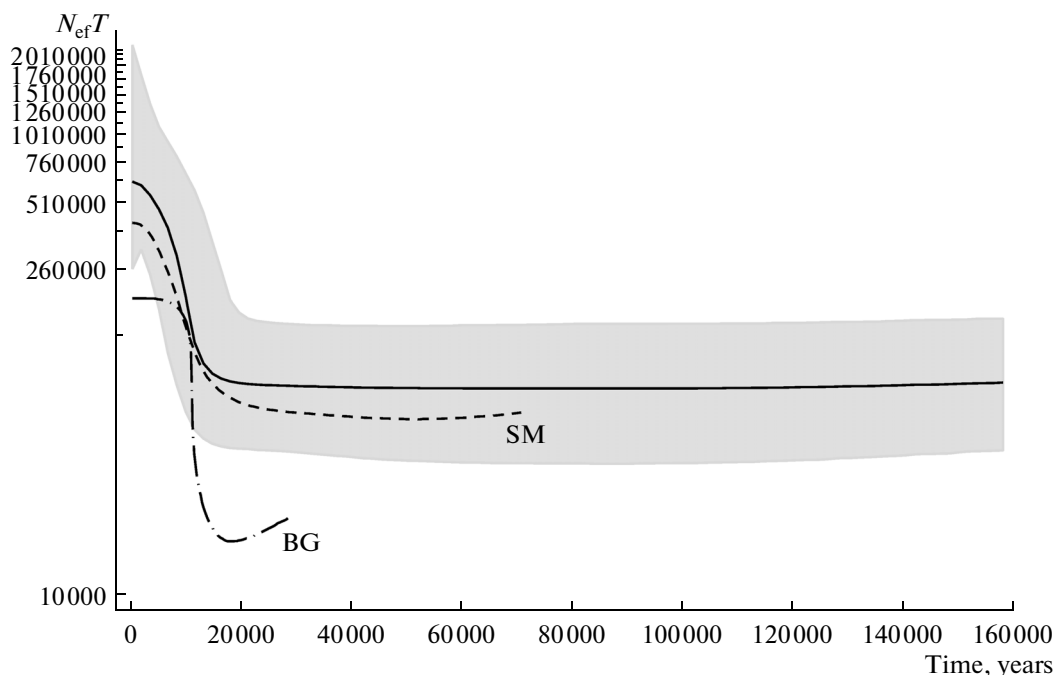
One more approach to investigate the population demographic history based on the nucleotide sequence sample, the Bayesian skyline plot [32], revealed a sharp increase in the Amur sturgeon population size, which began about 18 to 16 thousand years ago (Fig. 4). The skyline plot built for haplogroup SM generally repeated that for the total sample. The skyline plot for haplogroup BG differed from that for the total sample or haplogroup SM in that its initial level was in the region of significantly lower  $N_{ef}T$  values

(16000–21000 versus 57000–61000). The final value of the  $N_{ef}T$  index for the total sample was found to be 617622 (257950–2421752).<sup>1</sup> For the SM and BG haplogroups, the values of this index constituted 408747 (141145–2218285) and 192255 (111956–353626), respectively.

Analysis of the phylogenetic relationships of the Amur sturgeon mtDNA haplotypes using a neighbor joining technique based on the HKY-distance matrix (Fig. 5) showed that they formed two well-defined clades, supported by 953 (BG) and 992 (SM) out of 1000 bootstrap pseudorandom replicates. These data confirm the validity of the isolation of two mtDNA haplogroups and serve as indirect evidence in favor of the rationality of separate analysis of their genetic characteristics. The average HKY distance between haplogroups BG and SM constituted 3.4% of differing nucleotide positions. The net distance between haplogroups (except the differences within haplogroups) was found to be 2.2%. The average and net distances between the haplotypes of Amur and white (*A. transmontanus*) sturgeons were 2.2 to 2.5 times higher, constituting 7.5 and 5.6% respectively.

Until now, there are no detailed literature data on the mtDNA CR sequence variation in Amur sturgeon from natural habitats. At the same time, the data from two papers [37, 38] describing mtDNA genotyping in 64 individuals of Amur sturgeon taken from four broodstocks maintained at the National Engineering Research Center of Freshwater Fisheries Beijing, China, as well as from the broodstock of sturgeon hatchery in ChongQing, China, were available. These fish stocks were created based on individual fish caught in the Amur River in 1999–2001 [37, 38].

<sup>1</sup> Median and 95% highest posterior density interval.



**Fig. 4.** Bayesian skyline plot for the sample of the Amur sturgeon mtDNA control region sequences, which reflects the  $N_{ef}T$  index change (product of the effective female population size by the generation length, ordinate) over time (abscissa). Solid line is the median, and the blackout segment is the 95% highest posterior density interval of the  $N_{ef}T$  estimates distribution. Long and short dash lines are the median lines obtained for haplogroup BG and SM separately.

Based on the sequencing of relatively short (425 and 451 bp) and partly overlapping D-loop fragments, five haplotypes were revealed in one of these studies [37], and eight haplotypes [38] were revealed in another. The BIONJ tree, designed to position these haplotypes relative to mtDNA haplotypes from the present study and constructed based on the HKY distance matrix calculated from a 330-bp D-loop fragment common for all studies, is shown in Fig. 6. From the figure it can be seen that a total of seven mtDNA haplotypes were identified in Amur sturgeon specimens from Chinese hatcheries. Six of these haplotypes were included in haplogroup BG (found in 54 specimens), and one haplotype was included in haplogroup SM (found in 10 out of 12 sturgeons from the AG2 stock [37]). If this D-loop fragment is supplemented with fragments sequenced in only one of these studies (which in total will constitute the fragment of 536 bp), then the number of these haplotypes will increase from seven to 11 (10 from the BG and one from the SM haplogroup). From here it follows that the broodstocks were established with the progeny of at least 11 different Amur sturgeon females. The ratio of unique SM and BG haplotypes in the Amur sturgeon specimens from Chinese hatcheries (1 : 10) was markedly different from that in our sample, 19 : 18 (calculated over the same 536-bp D-loop fragment). This means that the Amur sturgeon haplotype SM diversity and/or frequency in the Chinese part of the of the Amur River basin (Middle Amur) is much lower than in the Lower

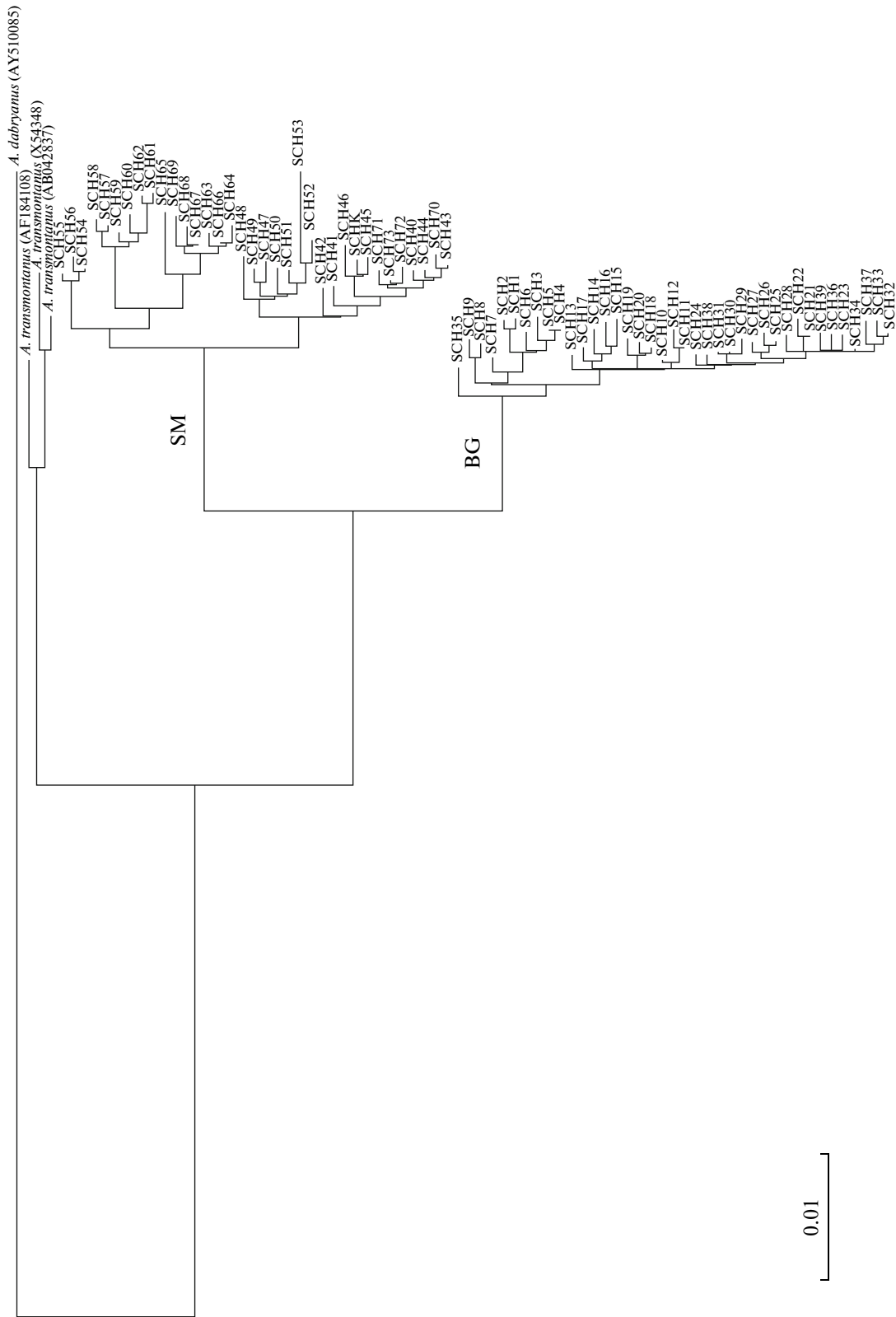
Amur, where the examined sample originated. According to Fisher's exact test, the differences are statistically significant,  $P = 0.016$  (two-tailed test).

## DISCUSSION

Until now, only two of the six species of Acipenseridae living in the Pacific were studied with respect to the mtDNA control region variability at the population level: the Chinese sturgeon *A. sinensis* from the Yangtze River (a 419-bp fragment was analyzed in 106 specimens) [39] and the white sturgeon *A. transmontanus* from the Fraser and Columbia rivers (a 462-bp fragment was analyzed in 27 specimens) [33]. Both species are mostly anadromous. The Chinese sturgeon was previously distributed from the southwest of the Korean Peninsula and Honshu Island in the north to the Pearl River in the south. However, in the last century, the population size of this species strongly decreased, and noticeable amounts of this fish are currently found only in the Yangtze River [40]. The distribution area of white sturgeon includes the west coast of North America from Alaska in the north to the rivers of California in the south, and, in terms of population size, it is in a relatively prosperous state [41].

In Amur sturgeon, the level of mtDNA CR variability generally exceeds that in Chinese sturgeon and white sturgeon.

The haplotypic diversity of the total sample of Amur sturgeon ( $H = 0.976 \pm 0.009$ ) is noticeably ( $Z_{\text{test}} =$



**Fig. 5.** BIONJ tree of the mtDNA haplotypes (SCH1–73, SCHK) of Amur sturgeon and white sturgeon (*A. transmontanus*) based on the HKY distances and rooted with the use of outgroup (*A. dabryanus*).



2.03;  $P = 0.023$ ) higher than that of Chinese ( $H = 0.949 \pm 0.010$ ) [39] and is about the same as that of white sturgeon ( $H = 0.97$ ) [33].

The nucleotide diversity ( $\pi = \theta_\pi/L$ , see interpretation in the table) of the mtDNA control region in the total sample of Amur sturgeon ( $\pi = 0.019 \pm 0.010$ ) is higher than in Chinese ( $\pi = 0.011 \pm 0.006$ ) [39] and white ( $\pi = 0.012$ ) [33] sturgeons.

Estimates of haplotype and nucleotide diversity, calculated separately for haplogroup SM ( $H = 0.985 \pm 0.008$ ,  $\pi = 0.012 \pm 0.006$ ), are at the level of maximum estimates obtained for the total samples of Chinese and white sturgeons.

Both indices are significantly lower in haplogroup BG,  $H = 0.938 \pm 0.024$ ,  $\pi = 0.004 \pm 0.002$ . The level of haplotypic diversity in this haplogroup is about the same as in Chinese sturgeon. As mentioned above, the low level of haplotypic diversity in haplogroup BG is caused only by the excess of the frequency of one of the haplotypes (SCH34). At the same time, in Chinese sturgeon, it is caused by other reasons. According to the data of Ewens–Watterson test [17, 18] (our calculations based on data from [39]), the frequency profile of the mtDNA haplotypes in the Chinese sturgeon is in accordance with the expected ( $EW = 0.061$ ;  $P = 0.469$ ). In the latter case, the low  $H$  value may be caused by a drop in the Chinese sturgeon population size, as it is well known that a reduction in the mtDNA haplotype diversity in such periods is the expected effect (see, for example, [42, 43]).

The reasons for the observed excess in the haplotype SCH34 frequency in Amur sturgeon are not clear. This may be the result of natural selection, genetic drift, or some other factors. The latter include human economic activity, which, in our opinion, could affect genetic composition of the Amur sturgeon.

In 1980s, in the basin of Upper and Middle Amur (upstream of the city of Khabarovsk), Amur sturgeon became so rare that works on its commercial artificial reproduction were begun. In considerable amounts, the release of artificially hatched larvae and juvenile Amur sturgeons began in 1988 when one of the Chinese hatcheries (Qindeli state farm, Tongjiang, Jiamusi) released about 100 thousand Amur sturgeon larvae into Amur River [8]. There is the evidence that a total of 900 thousand larvae and 168 thousand of juvenile Amur sturgeons from this hatchery were released over the next three years into the Amur River [44], and a total of 3600 thousand larvae were released by 1995 [8]. Could this release of hatched juvenile fish have led to the increase in the frequency of Amur sturgeon haplotype SCH34?

As mentioned above, the examined Amur sturgeon individuals could be divided into two size classes, with a body length of less than and more than 100 cm. Based on the known linear growth patterns of the Amur sturgeon from Lower Amur [45], the average age of individuals in the first group can be taken as 7–8

(lim = 2–14) years and 25–26 (lim = 14–37) years in the second group. It can be suggested that the sturgeons from the first group were born mainly in 2001–2003, and sturgeons from the second group were mainly born in 1983–1985.

The SCH34 haplotype frequency in the two groups constituted 0.152 (five out of 33 individuals) in the first group and 0.139 (11 out of 79 individuals) in the second group. According to Fisher's exact test, with respect to this characteristic, the groups were homogeneous ( $P = 1.00$ ). So, in other words, in the Amur sturgeon generations born before the start of the mentioned hatchery works, the frequency of haplotype SCH34 was approximately the same as that in the sturgeons born after. At first glance, this finding can be regarded as evidence that the excess in the haplotype SCH34 frequency in Amur sturgeon is in no way connected with the beginnings of the works on its artificial reproduction in 1980s.

However, the picture is somewhat different if a group of large individuals is examined in more detail. Among the 19 individuals with a body length of more than 150 cm (born, according to our estimates, mainly before 1980), only one specimen ( $AC = 162$  cm) carried haplotype SCH34. At the same time, among the 60 individuals with a body length of more than 100 but less than 150 cm (born, according to our estimates, mainly after 1987) this haplotype was found in ten individuals. That is, that the frequency of this haplotype in the first group was three times less than in the second group, 0.053 versus 0.167. The difference between these groups relative to the frequency of haplotype SCH34 was not statistically significant ( $P = 0.280$ , Fisher's exact test). However, our sample of individuals with the body length of 150 cm is not as large as it could be. If the frequency of haplotype SCH34 is preserved in case of, for example, a four-fold increase of the sample size, then the Fisher's exact test will show statistical significance of these differences ( $P \leq 0.045$ , if in the sample of 76 individuals no more than four fish will carry haplotype SCH34). Therefore, in our view, a more or less definitive answer to the question on the reasons for the observed excess of haplotype SCH34 frequencies in Amur sturgeon can be given only after the study of additional material, primarily individuals born before 1980.

The low nucleotide diversity of the BG mtDNA haplotypes points to their evolutionary youth. It seems likely that all of the existing diversity of haplogroup BG was formed relatively recently, during intensive population growth (this suggestion is supported by the data of Tajima's and Kelly's test, the  $SSD$  and  $g$  values, and the skyline plots). This increase may reflect the recovery of Amur sturgeon from the bottleneck, suitable conditions for which could have exist during the Last Glacial Maximum 26 to 19 thousand years ago. At least, according to our calculations (Fig. 4), the population growth of haplogroup BG began almost

immediately after this period, about 18 to 16 thousand years ago.

In the recent past, the size of haplogroup SM also increased, although not as fast as the size of haplogroup BG. Expansion of haplogroup SM can also be interpreted as a recovery after the end of the period of a population bottleneck. The beginning of this expansion over time almost completely coincided with the beginning of expansion of haplogroup BG (Fig. 4).

The presence in the mitochondrial gene pool of Amur sturgeon of not one (as can be expected for a species, the range of which is restricted to the only river basin) but two mtDNA haplogroups requires explanation. This explanation, in principle, can be relatively simple. This will require us to assume that the population of Amur sturgeon was large in size and that this size remained more or less stable over a relatively long (for about  $2N_{ef}$  and more generations) time. Theoretically, in a sample of alleles from a population in which genetic drift occurs according to the Wright–Fisher neutral model (stable size, panmixia, nonoverlapping generations, and others), approximately half the time required for the allele coalescence falls on the coalescence of the last pair of alleles. In these conditions, and at a suitable mutation rate, formation of the mtDNA clades, causing bi- or multimodal mismatch distribution patterns, is quite the expected result [46, 47]. It is also known that the degree of manifestation of such clades only increases if such a previously stable population (in size) experiences a moderate bottleneck just before the analysis [48].

It should be noted that the condition of panmixia, probably, is not observed in Amur sturgeon, because there are indirect signs indicating its population heterogeneity. First, the overall decline in the Amur sturgeon population size in different parts of the Amur River was different. Specifically, at present, this species is almost absent from the Middle Amur, while its population size is still quite high in the Lower Amur [49]. It is noteworthy that the original population size of Amur sturgeon in Middle Amur was about twice that in the Lower Amur [7]. Another sign may be the difference in the representation of mtDNA haplogroups in Amur sturgeon from the Middle and Lower Amur (see above). Unfortunately, it is still impossible to assess the degree of this differentiation (without the analysis of the samples from Middle Amur).

However, even the presence of certain current Amur sturgeon population structuring can hardly be regarded as a serious argument against the above explanation, since this structuring could not exist in the past. Moreover, in a time scale constituting thousands of generations, even geographically separated populations at certain migrant exchange rates can behave themselves as single entity [47, 50].

Not only the appearance of two mtDNA haplogroups but their differences in the diversity structure and dynamics (see the table and figures) from these

positions are treated as having appeared by chance. Therefore, we can alternatively propose another explanation for the presence of two different mtDNA haplogroups in the mitochondrial gene pool of Amur sturgeon. Namely, it can be suggested that haplogroups BG and SM were formed in geographically isolated and probably ecologically different populations of Amur sturgeon; only in comparatively recent times did they, for whatever reasons, appear together in the population and are now widespread exclusively in the Amur River basin.

This indirectly points to the unusually high nucleotide diversity of the mtDNA CR in the total sample of Amur sturgeon ( $\pi = 0.019 \pm 0.010$ ). This nucleotide diversity value is high not only when compared with those for other species of Pacific sturgeon but also when compared with the level of the D-loop variability observed, for example, in the total sample of Siberian sturgeon *A. baerii* from the Ob, Yenisei, and Lena river basins and Lake Baikal ( $\pi = 0.010 \pm 0.006$ , calculated from the data of [51]) or in the total samples of short-nose sturgeon *A. brevirostrum* ( $\pi = 0.011 \pm 0.006$ , calculated from the data of [52]) and Atlantic sturgeon ( $\pi = 0.011 \pm 0.007$ , calculated from the data of [53]) from various localities widely spaced over the Atlantic coast of North America.

Based on the level of D-loop nucleotide diversity, the Amur sturgeon is close to beluga, *Huso huso*, stellate sturgeon, *A. stellatus*, and Russian sturgeon, and *A. gueldenstaedtii*, the total samples of which from the basins of the Black, Azov, and Caspian seas are characterized by an extremely high level of mtDNA CR variability ( $\pi = 0.022 \pm 0.011$ ,  $\pi = 0.018 \pm 0.009$ , and  $\pi = 0.037 \pm 0.019$ , respectively) [54]. It is assumed that such high nucleotide diversity of the mtDNA CR may indicate the existence of morphologically hardly distinguishable populations among these sturgeon species [54]. In this respect, it should be noted that earlier, based on external morphological characters, each of these species was divided into subspecies or even into separate species.

Therefore, one of the highest nucleotide diversity levels of mtDNA CR among sturgeons can be regarded as an indirect sign of the past existence of two or more distinct populations of Amur sturgeon. The distribution of seven out of eight sturgeon species living in the Pacific is confined to the large river basins [55]. At present in the basins of the Sea of Okhotsk and the Sea of Japan, there are no other rivers comparable in size with the Amur River and therefore suitable for Amur sturgeon. However, such a river system could have existed in the past [56].

In this case, different representations of the two mtDNA haplogroups in Amur sturgeon from the Middle and Lower Amur can be interpreted as a reflection of the relatively recent (less than 18–16 thousand years ago) massive invasion into the gene pool of a native population of Amur sturgeon, which had originally, for

example, only BG haplotypes, of the haplotypes from another, presently already extinct (or absorbed by the first population) population. In this case, the distribution of alien (SM, in this variant) haplotypes could be limited mainly to the Lower Amur.

If this individual (distributed outside the Amur River basin) population previously existed, then it most likely was characterized by anadromous lifestyle. Single findings of Amur sturgeon individuals outside of the Amur River basin in the euhaline waters near the Hokkaido Island [6] and in Ulbansky Bay (present study, the specimen with haplotype SCH7) indicate that the stage of feeding in marine waters in the past could have been normal for the life cycle of Amur sturgeon. This becomes even more probable when considering the fact that the closest sister species to Amur sturgeon, the white sturgeon, has a mostly anadromous lifestyle. It can be suggested that the differences in the ecology of these populations led to differences in the diversity structure and dynamics of haplogroups BG and SM.

This explanation of the composition and other properties of the present-day mitochondrial gene pool of Amur sturgeon, as a result of mixing of its earlier independent populations, seems quite plausible. However, the preference of this explanation over the alternative, considering the revealed pattern as a result of the joint action of genetic drift and mutations in single large and stable in size population, without additional studies (especially the analysis of samples from other parts of the Amur basin and genotyping of the so-called brown and gray morphs [7] of Amur sturgeon), seems to be premature.

In conclusion, we have attempted to compare the current population size of Amur sturgeon with the long-term effective size of its population based on the female data.

According to the latest assessment [49] obtained by the results of selective sampling of Amur sturgeon carried out in different parts of Middle and Lower Amur (with the help of the area method), the total number of mature individuals in the modern population of Amur sturgeon is about 22000 pcs. Then, with a female to male ratio of 1 : 2 [9, 49], the total number of mature females in the population is about 7333 pcs. Each of these females is involved in reproduction, usually every two to four years [4, 7, 9]. From here it follows, that the number of females participating in spawning is about 1833–3666 pcs.

If the average age of mature females (about 27 years [49]) is taken for the Amur sturgeon generation length, then, according to Bayesian skyline plot (Fig. 4), the long-term effective female population size in the recent past was  $617622/27 = 22874$  (9553–89695) pcs. About 20 thousand years ago, it was  $82664/27 = 3602$  (1588–6190) pcs. From this it follows that in the modern population of Amur sturgeon the number of spawning females is an order of magnitude smaller

than the effective female population existing in the previous period of time, and it is about the same order as that during the Last Glacial Maximum, when the population of Amur sturgeon experienced a phase of low numbers.

It is known that the variance of the number of descendants is one of the main factors why the effective population size is considerably lower than the actual population size (the total number of reproductively relevant individuals in the population) [57]. For Amur sturgeon, this factor certainly exists, since the females of this species are characterized by high individual fecundity, along with the wide range of its variation, from hundreds of thousands to more than a million eggs [7, 44]. Therefore, the effective number of females in the modern population of Amur sturgeon seems to be lower than the number of females participating in spawning. Hence, it can be argued that current population of Amur sturgeon, if it has not dropped below the lower limit of natural fluctuations of its effective population size, is on the edge of overcoming it. In this regard, the inclusion of Amur sturgeon in the IUCN Red List of Threatened Species into the group of species with an extremely high risk of extinction in nature (Critically Endangered) is quite justified.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences (grant no. 12-I-P30-04).

#### REFERENCES

1. Bemis, W.E., Findeis, E.K., and Grande, L., An overview of Acipenseriformes, *Environ. Biol. Fishes*, 1997, vol. 48, pp. 25–71.
2. Ludwig, A., Belfiore, N., and Pitra, C., Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*), *Genetics*, 2001, vol. 158, pp. 1203–1215.
3. Krieger, J., Hett, A.K., Fuerst, P.A., et al., The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited, *J. Appl. Ichthyol.*, 2008, vol. 24, suppl. 1, pp. 36–45.
4. Soldatov, V.K., The study of acipenserids of Amur River, *Mater. Poznaniyu Russ. Rybolov.*, 1915, vol. 3, no. 12, pp. 96–415.
5. Nikol'skii, G.V., *Ryby basseina Amura (Itogi Amurskoi ikhtologicheskoi ekspeditsii, 1945–1949 gg.)* (Fishes of Amur Basin (Results of the Amur Ichthyological Expedition)), Moscow: Akad. Nauk SSSR, 1956.
6. Omoto, N., Maebayashi, M., Hara, A., et al., Gonadal maturity in wild sturgeons, *Huso dauricus*, *Acipenser mikadoi* and *A. schrenckii* caught near Hokkaido, Japan, *Environ. Biol. Fishes*, 2004, vol. 70, no. 4, pp. 381–391.
7. Krykhtin, M.L. and Svirskii, V.G., Endemic sturgeons of the Amur River: kaluga, *Huso dauricus*, and Amur

- sturgeon, *Acipenser schrenckii*, *Environ. Biol. Fishes*, 1997, vol. 48, pp. 231–239.
8. Wang, Y. and Chang, J., Status and conservation of sturgeons in Amur River, China: a review based on surveys since the year 2000, *J. Appl. Ichthyol.*, 2006, vol. 22, suppl. 1, pp. 44–52.
  9. Ruban, G. and Qiwei, W., *Acipenser schrenckii*, in *IUCN 2013: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2*, 2013. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed June 3, 2014.
  10. Vasil'ev, V.P., Vasil'eva, E.D., Shedko, S.V., and Novomodny, G.V., How many times has polyploidization occurred during acipenserid evolution? New data on the karyotypes of sturgeons (Acipenseridae, Actinopterygii) from the Russian Far East, *J. Ichthyol.*, 2010, vol. 50, no. 10, pp. 950–959.
  11. Mugue, N.S., Barmintseva, A.E., Rastorguev, S.M., et al., Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification, *Russ. J. Genet.*, 2008, vol. 44, no. 7, pp. 793–798.
  12. Staden, R., Beal, K.F., and Bonfield, J.K., The Staden package, 1998, *Methods Mol. Biol.*, 2000, vol. 132, pp. 115–130.
  13. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T., MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, *Nucleic Acids Res.*, 2002, vol. 30, pp. 3059–3066.
  14. Villesen, P., FaBox: an online toolbox for fasta sequences, *Mol. Ecol. Notes*, 2007, vol. 7, no. 6, pp. 965–968.
  15. Excoffier, L. and Lischer, H.E.L., Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Mol. Ecol. Res.*, 2010, vol. 10, no. 3, pp. 564–567.
  16. Swofford, D.L., *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods): Version 4*, Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
  17. Ewens, W.J., The sampling theory of selectively neutral alleles, *Theor. Popul. Biol.*, 1972, vol. 3, no. 1, pp. 87–112.
  18. Watterson, G.A., The homozygosity test of neutrality, *Genetics*, 1978, vol. 88, no. 2, pp. 405–417.
  19. Tajima, F., Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism, *Genetics*, 1989, vol. 123, no. 3, pp. 585–595.
  20. Fay, J.C. and Wu, C.I., Hitchhiking under positive Darwinian selection, *Genetics*, 2000, vol. 155, no. 3, pp. 1405–1413.
  21. Fu, Y.X., Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection, *Genetics*, 1997, vol. 147, no. 2, pp. 915–925.
  22. Kelly, J.K., A test of neutrality based on interlocus associations, *Genetics*, 1997, vol. 146, no. 3, pp. 1197–1206.
  23. Eckert, A.J., Liechty, J.D., Tarse, B.R., et al., DnaSAM: software to perform neutrality testing for large datasets with complex null models, *Mol. Ecol. Res.*, 2010, vol. 10, pp. 542–545.
  24. Watterson, G.A., The homozygosity test after a change in population size, *Genetics*, 1986, vol. 112, no. 4, pp. 899–907.
  25. Zeng, K., Fu, Y.-X., Shi, S., and Wu, C.-I., Statistical tests for detecting positive selection by utilizing high-frequency variants, *Genetics*, 2006, vol. 174, no. 3, pp. 1431–1439.
  26. Rogers, A. and Harpending, H., Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences, *Mol. Biol. Evol.*, 1992, vol. 9, no. 3, pp. 552–569.
  27. Schneider, S. and Excoffier, L., Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA, *Genetics*, 1999, vol. 152, no. 3, pp. 1079–1089.
  28. Kuhner, M.K., Yamato, J., and Felsenstein, J., Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent, *Genetics*, 1998, vol. 149, no. 1, pp. 429–434.
  29. Drummond, A., Nicholls, G., Rodrigo, A., and Solomon, W., Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data, *Genetics*, 2002, vol. 161, pp. 1307–1320.
  30. Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., and Rambaut, A., Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7, *Mol. Biol. Evol.*, 2012, vol. 29, no. 8, pp. 1969–1973.
  31. Pybus, O.G., Rambaut, A., and Harvey, P.H., An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies, *Genetics*, 2000, vol. 155, no. 3, pp. 1429–1437.
  32. Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., and Pybus, O.G., Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences, *Mol. Biol. Evol.*, 2005, vol. 22, no. 5, pp. 1185–1192.
  33. Brown, J.R., Beckenbach, A.T., and Smith, M.J., Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*), *Mol. Biol. Evol.*, 1993, vol. 10, no. 2, pp. 326–341.
  34. Wang, W., Hua, Z., Hu, H.-X., et al., Heteroplasmy in mtDNA control region and phylogenetics of five sturgeons, *Zool. Res.*, 2009, vol. 30, no. 5, pp. 487–496.
  35. Raymond, M. and Rousset, F., An exact test for population differentiation, *Evolution*, 1995, vol. 49, no. 6, pp. 1280–1283.
  36. Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M., Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics*, 1992, vol. 131, no. 2, pp. 479–491.
  37. Niu, C.-J., Hu, H.-X., Luo, J., and Li, C., Genetic diversity in the reserved parent fish broodstocks of *Asipenser schrenckii* and *Huso dauricus*, *J. Fish. China*, 2010, vol. 34, no. 12, pp. 1795–1799.
  38. Wang, W., Zhu, H., and Hu, H.-X., Genetic diversity of the reserved broodstocks in four species of sturgeon, *Chin. J. Zool.*, 2012, vol. 47, no. 1, pp. 105–111.
  39. Zhang, S.M., Wang, D.Q., and Zhang, Y.P., Mitochondrial DNA variation, effective female population size

- and population history of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, *Conserv. Genet.*, 2003, vol. 4, no. 6, pp. 673–683.
40. Qiwei, W., *Acipenser sinensis*, in *IUCN 2013: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2*, 2013. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed June 3, 2014.
  41. Duke, S., Down, T., Ptolemy, J., et al., *Acipenser transmontanus*, in *IUCN 2013: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2*, 2013. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed June 3, 2014.
  42. Weber, D.S., Stewart, B.S., and Lehman, N., Genetic consequences of a severe population bottleneck in the Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi*), *J. Hered.*, 2004, vol. 95, no. 2, pp. 144–153.
  43. Johnson, J.A., Dunn, P.O., and Bouzat, J.L., Effects of recent population bottlenecks on reconstructing the demographic history of prairie-chickens, *Mol. Ecol.*, 2007, vol. 16, no. 11, pp. 2203–2222.
  44. Wei, Q., Ke, F., Zhang, J., et al., Biology, fisheries and conservation of sturgeons and paddlefish in China, *Environ. Biol. Fishes*, 1997, vol. 48, pp. 241–255.
  45. Koshelev, V.N., Mikheev, P.B., Litovchenko, Zh.S., et al., Age and growth of the Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) from Amur River, *Izv. Tikhookean. Inst. Rybov. Okeanogr.*, 2009, vol. 159, pp. 136–147.
  46. Slatkin, M. and Hudson, R.R., Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations, *Genetics*, 1991, vol. 129, no. 2, pp. 555–562.
  47. Marjoram, P. and Donnelly, P., Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution, *Genetics*, 1994, vol. 136, no. 2, pp. 673–683.
  48. Hein, J., Schierup, M.H., and Wiuf, C., *Gene Genealogies, Variation and Evolution: A Primer in Coalescent Theory*, Oxford Univ. Press, 2005.
  49. Koshelev, V.N., Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 (distribution, biology, artificial reproduction), *Extended Abstract of Cand. Sci. Dissertation*, Vseross. Nauchno-Issled. Inst. Rybov. Okeanogr., Moscow, 2010.
  50. Allendorf, F.W., Isolation, gene flow and genetic differentiation among populations, in *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Plant and Animal Populations*, Schonewald, C.M., Chambers, S.M., MacBryde, B., and Thomas, W.L., Eds., New York: Blackburn, 1983, pp. 51–66.
  51. Doukakis, P., Birstein, V.J., Ruban, G.I., and DeSalle, R., Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species, *Acipenser baerii* and *A. stellatus*, *Mol. Ecol.*, 1999, vol. 8, pp. 117–127.
  52. Grunwald, C., Stabile, J., Waldman, J., et al., Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences, *Mol. Ecol.*, 2002, vol. 11, pp. 1885–1898.
  53. Waldman, B.J.R., Grunwald, C., Stabile, J., and Wirgin, I., Impacts of life history and biogeography on the genetic stock structure of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*, gulf sturgeon *A. oxyrinchus desotoi*, and shortnose sturgeon *A. brevirostrum*, *J. Appl. Ichthyol.*, 2002, vol. 18, pp. 509–518.
  54. Doukakis, P., Birstein, V.J., and DeSalle, R., Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*, *A. stellatus*, and *Huso huso*) based on mitochondrial DNA analysis, *J. Appl. Ichthyol.*, 2005, vol. 21, pp. 457–460.
  55. Bemis, W.E. and Kynard, B., Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history, *Environ. Biol. Fishes*, 1997, vol. 48, pp. 167–183.
  56. Lindberg, G.U., *Krupnye kolebaniya urovnya okeana v chetvertichnyi period: biogeograficheskie obosnovaniya gipotezy* (Large-Scale Fluctuations of Sea Level in the Quaternary Period: Hypothesis Based on Biogeographical Evidence), Leningrad: Nauka, 1972.
  57. Frankham, R., Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review, *Genet. Res.*, 1995, vol. 66, no. 2, pp. 95–107.

Translated by N. Maleeva

УДК 575.17+575.13:597.442

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК, ИСТОРИЧЕСКАЯ ДЕМОГРАФИЯ И ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА АМУРСКОГО ОСЕТРА *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869

© 2015 г. С. В. Шедько<sup>1</sup>, И. Л. Мирошниченко<sup>1</sup>, Г. А. Немкова<sup>1</sup>, В. Н. Кошелев<sup>2</sup>, М. Б. Шедько<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения  
Российской академии наук, Владивосток 690022  
e-mail: shedko@biosoil.ru

<sup>2</sup>Хабаровский филиал Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра,  
Хабаровск 680000

Поступила в редакцию 23.06.2014 г.

Исследована изменчивость контролирующего участка (D-петли) мтДНК у амурского осетра — эндемика р. Амур, находящегося в Красном списке МСОП (IUCN) в статусе вида с крайне высоким риском вымирания в природе (Critically Endangered). Секвенирование 796–812 пн D-петли у 112 осетров, собранных в Нижнем Амуре, выявило 73 различных гаплотипа. Выборка имела высокий уровень гаплотипического (0.976) и нуклеотидного (0.0194) разнообразия. Найденные гаплотипы распались на две хорошо выраженные монофилетические группировки — VG ( $n = 39$ ) и SM ( $n = 34$ ), различавшиеся (НКУ-дистанция) в среднем по 3.41% нуклеотидных позиций при среднем внутри-групповом уровне отличий в 0.54 и 1.23%, соответственно. Гаплотипы SM-группы отличались, кроме того, наличием делеции размером 13–14 пн. Большинство образцов (66 из 112) несли VG-гаплотипы. Форма распределения попарных нуклеотидных различий, результаты тестов на нейтральность, на соответствие модели внезапной демографической экспансии или модели экспоненциального роста в совокупности указали на произошедший в прошлом существенный рост численности популяции амурского осетра, наиболее отчетливо проявившийся при рассмотрении данных по VG-гаплогруппе. Построенные байесовские контурные диаграммы (скайлайны) показали, что этот рост начался около 18–16 тыс. лет назад. В настоящее время эффективная численность сильно сократившейся из-за перелома популяции амурского осетра может быть равна или даже меньше той, что была до начала указанного роста — во время последнего ледникового максимума. Наличие в митохондриальном геноме амурского осетра двух гаплогрупп, их неодинаковая эволюционная динамика и, судя по ограниченным данным, неравная представленность в российской и китайской частях бассейна р. Амур указывают на возможное существование в прошлом как минимум двух отдельных его популяций.

DOI: 10.7868/S0016675815020125

Семейство Acipenseridae — древняя группа рыб, ведущая свое начало с мезозоя и до сих пор широко, хотя и мозаично, распространенная в водоемах Северного полушария [1]. Рыбы этого семейства играют важную роль в экосистемах, а также имеют большую промысловую и эстетическую ценность.

Амурский осетр *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 — один из семи видов осетров, распространенных в бассейне Тихого океана и составляющих особую монофилетическую группировку Acipenseridae — “тихоокеанскую” [2, 3]. Ареал амурского осетра ограничен бассейном р. Амур. Это крупная рыба, способная достигать почти трех метров длины и более полутора сотен килограммов веса [4]. По типу питания амурский осетр — бентофаг, потребляющий в основном личинок водных насекомых, моллюсков, а также (реже) мелких рыб [5]. Основная масса его особей нагу-

ливается в русле Амура и его основных притоках. Часть особей амурского осетра для нагула выходит в солоноватые воды Амурского лимана. Известны единичные находки в водах с морской соленостью [6]. Размножается исключительно в пресной воде — как правило, в самом русле р. Амур. Ранее был широко распространен по всему бассейну Амура — от Онона и Аргуни до Амурского лимана, но сейчас в заметных количествах встречается лишь в Нижнем Амуре (ниже впадения р. Уссури) [7].

Из-за своих ценных пищевых качеств амурский осетр издавна подвергался нещадному легальному и нелегальному промыслу, который привел к существенному падению его численности уже к середине прошлого века [5]. В российской части бассейна Амура с 1958 г. и до сих пор промышленный и спортивный лов амурского осетра находится под запретом. В китайской ча-

сти бассейна его добыча никогда не прекращалась, и во вторую половину прошлого века объемы его вылова, напротив, только выросли [8]. С 1986 г. амурский осетр включен в Красный список Международного Союза Охраны Природы (IUCN Red List of Threatened Animals) как вид, находящийся в уязвимом (vulnerable) состоянии. Из-за неуклонного снижения численности амурского осетра в 1996 г. получил статус вида, находящегося в опасности (Endangered), а в 2010 г. — статус вида с крайне высоким риском вымирания (Critically Endangered) [9].

В задачу настоящей работы входило исследование изменчивости контролирующего региона митохондриальной ДНК у амурского осетра из Нижнего Амура. В результате с помощью этого высокополиморфного маркера был получен своеобразный генетический “портрет” популяции *A. schrenckii*, составленный на основе анализа выборок из района, где этот вид до последнего времени был более или менее многочислен. Этот “портрет” будет полезен не только для закладки основ мониторинга генетического разнообразия амурского осетра, а также природоохранных мероприятий, но и как затравка для дальнейших исследований его популяционной структуры и эволюционной истории.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал по амурскому осетру был собран в ходе научного контрольного лова, проведенного Хабаровским филиалом ТИНРО-центра в нижнем течении р. Амур (район г. Николаевск-на-Амуре, примерно 53°7' с.ш., 140°40' в.д.) в мае—июне 2009 г. ( $n = 41$ ), августе—сентябре 2009 г. ( $n = 43$ ) и сентябре 2010 г. ( $n = 27$ ). Кроме того, заспиртованный кусок плавника одного экземпляра амурского осетра, случайно пойманного в Ульбанском заливе Охотского моря (53°32' с.ш., 137°19' в.д.) в сентябре 2009 г., был получен от рыбаков. Образцы отбирались неинвазивным способом (срезался небольшой кусочек кожи по задней кромке грудного плавника, который затем помещался в 96%-ный спирт).

Длина тела ( $AC$ ) у 112 исследованных осетров варьировала в пределах 32–182 см ( $115.8 \pm 38.6$ ) и имела двухвершинное распределение. У 33 особей длина тела была менее 100 см ( $61.7 \pm 17.6$ ,  $lim = 32-96$ ), а у 79 особей — равна или больше этого порога ( $138.5 \pm 15.4$ ,  $lim = 100-182$ ).

Кроме выборок, взятых из естественных условий, были также проанализированы 16 особей амурского осетра (12 сеголетков и 4 годовика), взятых на Анюйском рыбозаводном заводе (Нанайский район Хабаровского края) в августе 2008 г. Ранее эти особи были использованы в исследовании структуры кариотипа амурского осетра [10].

Тотальная ДНК была выделена стандартным фенол-хлороформным способом с использованием протеиназы К. Полноразмерная последовательность контролирующего региона мтДНК (D-loop) была амплифицирована с помощью праймеров LproF и DL651 [11], специфичных к фланкирующим его генам транспортной РНК (тРНК-Pro и тРНК-Phe соответственно).

Амплификацию проводили на термоциклере Biometra Tprofessional (“Biometra”, Германия) в 25 мкл реакционной смеси, включавшей 0.1–0.2 мкг тотальной ДНК, 2.5 мкл буфера (60 mM трис-HCl, pH 8.5; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 mM KCl; 10 mM 2-меркаптоэтанола; 0.1% тритона X-100), 0.5 мкл суммы дезокситрифосфатов из 10 mM раствора, по 2.5 мкл обоих праймеров (“Биоссет”, Новосибирск) из их 2 мкМ растворов, 2 е.а. Taq-полимеразы (“СибЭнзим”, Новосибирск) и деионизированную воду.

Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей схеме: начальная денатурация (94°C — 120 с), 30 циклов амплификации (94°C — 45 с, 52°C — 30 с, 72°C — 60 с) и достройка цепей (72°C — 480 с). Продукты амплификации очищали переосаждением и секвенировали с помощью набора Big Dye Terminator версии 3.1 (“Applied Biosystems”, США) при использовании праймеров DL651, ANR и SchF [11]. Продукты реакции разделяли на автоматическом анализаторе ABI Prizm 3130 (“Applied Biosystems”, США/“Hitachi”, Япония) на базе Биолого-почвенного института ДВО РАН (г. Владивосток). ABI-хроматограммы собирали в контиги с помощью программ из пакета Staden [12].

Множественное выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей осуществлено с помощью программы MAFFT v. 6.859 [13] методом итерационного уточнения — FFT-NS-i.

Основные показатели, характеризующие изменчивость полученных последовательностей D-петли — наблюдаемое ( $h$ ) число гаплотипов, число полиформных (сегрегирующих) нуклеотидных позиций ( $S$ ), общее число варибельных позиций ( $PI$ ,  $S$  плюс индели), число синглтонов ( $si$ ), гаплотипическое ( $H$ ) и нуклеотидное ( $\pi$ ,  $p$ -дистанция) разнообразие, и другие — определены с помощью набора утилит FaBox v. 1.4 [14] и программы Arlequin v. 3.5.1.3 [15].

BIONJ-дерево строили с помощью программы RAUP 4.0b10 [16] при использовании модели нуклеотидных замещений НКУ, учитывающей основные особенности эволюции D-петли — неодинаковые доли четырех типов нуклеотидов и разную скорость транзиций и трансверсий. В качестве внешней группы использовали последовательности контролирующего региона мтДНК близких видов осетров — белого *A. transmontanus*

(AB042837, AF184108 и X54348) и осетра Дабри *A. dabryanus* (AY510085), взятые из Genbank/NCBI.

Проверку селективной нейтральности наблюдаемого ДНК-полиморфизма осуществляли с помощью батареи тестов, рассматривающих различные аспекты этой изменчивости: теста Ювенса–Воттерсена [17, 18], разработанного в рамках модели бесконечно большого числа аллелей, а также тестов, в основе которых лежит модель бесконечно большого числа сайтов – Таджимы [19], *H*-теста Фей и Ву [20], *F<sub>s</sub>*-теста Фу [21] и теста Келли [22].

Тест Ювенса–Воттерсена выполнен в программе Arlequin, остальные – в программе Dna-SAM [23]. В последнем случае нулевое распределение статистик генерировалось методом Монте-Карло в 10000 псевдослучайных симуляциях процесса коалесценции.

Поскольку в процессе исследования выяснилось, что обнаруженные у амурского осетра варианты D-петли формируют две четко очерченные группы гаплотипов (BG- и SM-гаплогруппы – см. ниже), то в дополнение к анализу суммарных данных нами также проводилось рассмотрение каждой из этих гаплогрупп по отдельности.

Известно, что каждый из перечисленных тестов в той или иной степени чувствителен к предшествующей демографической истории популяции [19, 21, 22, 24, 25]. Поэтому выявляемые ими отклонения от ожидаемой, согласно теории нейтральности, картины ДНК-полиморфизма на самом деле могут быть вызваны не действием отбора, а недавним падением или наоборот ростом численности популяции.

Вероятный характер изменения численности популяции амурского осетра во времени (исторической демографии) анализировали с использованием следующих подходов. Прежде всего была установлена форма распределения попарных нуклеотидных различий мтДНК-гаплотипов амурского осетра – многовершинная (соответствует случаю демографически стабильной популяции) или одновершинная (свидетельствует о недавнем резком увеличении численности популяции) [26].

Затем с помощью программы Arlequin была проверена модель внезапной одноступенчатой демографической экспансии [27]. При этом значимость тестируемой статистики – суммы квадратов отклонений между наблюдаемым и ожидаемым распределением попарных нуклеотидных различий (*SSD*) – оценивали на основе 10000 псевдослучайных реплик параметрического бутстрэпа.

Следующей была проверена сравнительно простая модель – модель экспоненциального роста численности популяции. Ее параметры ( $\theta$  – популяционный параметр  $2N_{ef}\mu$ , где  $N_{ef}$  – эффективная численность самок в популяции, а  $\mu$  – скорость нуклеотидных замещений/сайт/поко-

ление;  $g$  – показатель скорости роста популяции) определяли двумя способами – с использованием метода максимального правдоподобия [28] и байесовского подхода [29]. В первом случае использовали программу Fluctuate v. 1.4 [28] при следующих условиях поиска указанных параметров: частоты нуклеотидов – эмпирические, отношение числа транзиций к числу трансверсий – 37; стартовое дерево – случайное; анализ состоял из 30 коротких цепей протяженностью по 50000 циклов с отбором каждого 50-го, затем следовали 20 длинных цепей протяженностью по 500000 циклов с отбором каждого 50-го. В качестве начальной  $\theta$  бралась оценка, рассчитанная исходя из числа полиморфных (сегрегирующих) сайтов. Во втором случае использовали программу BEAST v. 1.7.5 [30] при условиях: модель нуклеотидных замещений – НКУ; модель молекулярных часов – варьирующие (не строгие) часы с некоррелированным логнормальным распределением скоростей нуклеотидных замен по ветвям дерева; протяженность анализа – 10 млн циклов с отбором каждого тысячного (burn-in – первые 10% циклов). Суммирование результатов байесовского анализа проводили с помощью программы Tracer v. 1.5. В обоих случаях модель признавалась адекватной, если нулевое значение не попадало в 95%-ный доверительный (или правдоподобный) интервал показателя скорости роста популяции ( $g$ ).

Наконец, в дополнение к простым параметрическим моделям использовался наиболее гибкий подход – метод контурной диаграммы (скайлайна) [31]. Этот метод базируется на анализе паттерна реконструированной генеалогии последовательностей ДНК в выборке и дает возможность исследовать историю изменения размера популяции без необходимости введения априорных ограничений на возможные модели поведения ее численности во времени. Байесовский скайлайн учитывает ту неопределенность, которая неизбежно сопровождает вычисление генеалогии последовательностей ДНК в выборке (в плане ее топологии и расположения событий коалесценции вдоль шкалы времени) и позволяет оценивать одновременно параметры модели эволюции нуклеотидных последовательностей, генеалогии последних, а также демографическую историю популяции, из которой они получены [32].

Байесовские скайлайны строили с помощью программы BEAST [30] при следующих условиях. Модель нуклеотидных замещений – НКУ. Число групп, объединяющих относительно близкие коалесценции (подобрано на основе вычислений байесовского фактора для различного их числа), – две для BG-гаплогруппы и четыре для SM-гаплогруппы или суммарной выборки. Модель молекулярных часов – варьирующие (не строгие) часы с некоррелированным логнормальным распределением скоростей нуклеотидных замен по ветвям

дерева. Общая протяженность байесовского анализа зависела от скорости достижения необходимого эффективного числа выборочных точек (более 200) для каждого из параметров модели и составила для ВG- и SM-гаплогрупп, а также суммарной выборки соответственно 16, 10 или 24 млн циклов с отбором из них каждого тысячного (burn-in – первые 10% от их общего числа). При построении байесовских скайлайнов мы использовали оценку скорости эволюции контролирующего региона мтДНК, равную  $1.2 \times 10^{-7}$  замен на нуклеотидную позицию/год/линию. Она является средней для интервала оценок ( $1.1 \times 10^{-7}$ – $1.3 \times 10^{-7}$ ), рассчитанных для соответствующего участка мтДНК у белого осетра (филогенетически ближайший к амурскому осетру вид), исходя из числа замещений, накопленных одной из его популяций после высвобождения р. Фрейзер из-под ледникового щита/панциря 10–12 тыс. лет назад [33]. В результате искомый параметр, характеризующий размер популяции, оказался выражен в виде произведения эффективной численности самок в популяции на продолжительность поколенения ( $N_{ef}T$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Структура контролирующего региона мтДНК исследованных особей амурского осетра принципиально не отличалась от той, что была установлена для этого вида на другом материале [11, 34]. Часть D-петли, прилегающая к гену тРНК-Pro (ее 3'-конец), состоит из блока тандемно организованных 82 пн повторов, каждый из которых содержит *TAS II* (termination-associated sequence) элемент на его 5'-конце. За ним следует одна неполная (39 пн) копия, у которой отсутствует часть повтора, несущая *TAS II* элемент. Далее расположена основная часть D-петли.

Проанализированная область D-петли включала в себя последнюю полную, а также усеченную копию повторяющегося элемента (121 пн в сумме), а также всю оставшуюся часть D-петли (675–691 пн), прилегающую к гену тРНК-Phe и содержащую *TAS III* и *CSB I–III* (conserved sequence block) элементы. Таким образом, общая длина задействованного в анализе фрагмента контрольного региона (КР) у разных образцов составила от 796 до 812 пн.

Всего у 128 образцов амурского осетра было выявлено 74 различных варианта КР (рис. 1), различавшихся либо точечными нуклеотидными замещениями и инделями, либо (пары SCH4–5 и SCH30–31) только инделями.

У особей, полученных из естественных условий ( $n = 112$ ), в общей сложности было идентифицировано 73 гаплотипа – SCH1–73.

У особей амурского осетра, взятых на Анюском рыбопроизводном заводе ( $n = 16$ ) и подвергнутых ранее [10] кариотипированию, было выявлено четыре гаплотипа. Из этих особей 12 несли гаплотипы SCH7 (8 сеголетков), SCH34 (три годовика) и SCH23 (один годовик), а остальные четыре (сеголетки) – гаплотип SCHK, который в выборках из природной популяции амурского осетра обнаружен не был. Таким образом, можно утверждать, что кариотипированные особи амурского осетра были потомками как минимум четырех различных самок. Укажем, что по основным характеристикам кариотипов эти особи оказались однородны [10].

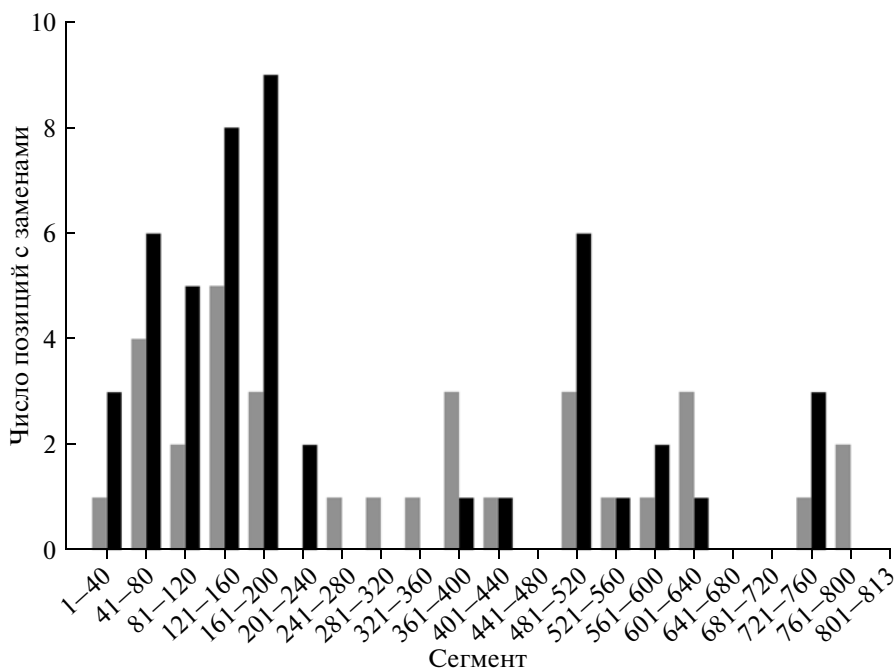
Примерно у 40% исследованных особей (у 50 из 128) в КР мтДНК наблюдалась сравнительно крупная делеция длиной от 13 до 14 пн (позиции с 543-й по 556-ю в массиве выравненных последовательностей – рис. 1), которая располагалась непосредственно позади *CSB I* участка. Размер других инделей был намного меньше и составлял одну (в четырех случаях) либо две (единственный случай) нуклеотидные позиции. Остальные мутации в рассматриваемом фрагменте КР были представлены точечными нуклеотидными замещениями, затронувшими, в общей сложности, 73 нуклеотидные позиции. При этом большинство из них составили транзиции, а замещения по типу трансверсий наблюдались лишь в трех нуклеотидных позициях.

Гаплотипы, различающиеся по присутствию/отсутствию 13–14 пн делеции, различались также большим числом (около 26 в среднем) точечных нуклеотидных замещений и составили таким образом две группы, именуемые далее как SM (SCH40–73 и SCHK – с делецией) и ВG (SCH1–39 – без делеции) гаплогруппы.

Вариабельные позиции в КР мтДНК амурского осетра оказались распределены неравномерно (рис. 2). Основная масса точечных нуклеотидных замещений наблюдалась в начальной части проанализированного фрагмента мтДНК – в районе расположения повторяющихся элементов (позиции 1–120), а также *TAS III* участка D-петли (позиции 121–200 массива выравненных последовательностей), на который пришлась мода этого распределения как в случае ВG, так и в случае SM гаплотипов. Любопытно, что сохранившаяся 3'-половина последней копии повторяющегося элемента (сегмент 81–120) оказалась примерно в

**Рис. 1.** Вариабельные позиции во фрагменте D-петли мтДНК амурского осетра (нумерация произведена относительно первой позиции последней полной копии 82-нуклеотидного повтора), гаплотипы и их встречаемость в выборках из природы или (цифры в скобках) искусственных условий.





**Рис. 2.** Распределение переменных позиций (ось ординат) по 40-нуклеотидным сегментам исследованного фрагмента D-петли мтДНК амурского осетра. Серая и черная заливки маркируют оценки, полученные для ВГ и SM групп гаплогрупп соответственно.

2 раза более изменчива, чем соответствующая 3'-часть предпоследней (полной) копии 82 пн повтора (сегмент 1–40). Другой областью сгущения точечных нуклеотидных замещений был 5'-конец D-петли в районе расположения элементов *CSB I–III*. При этом если в случае ВГ-гаплогрупп переменные позиции были распределены здесь более или менее равномерно, то в случае SM-гаплогрупп они образовали отчетливую моду в их распределении – сегмент 481–520 (рис. 2). Тем не менее отметим, что в целом по распределению переменных позиций ВГ и SM гаплогрупп оказались однородны ( $P = 0.548$ , точный критерий Фишера).

Сравнение частот гаплогрупп в выборках амурского осетра, взятых в разные сезоны (май–июнь 2009 г., август–сентябрь 2009 г., сентябрь 2010 г.), с помощью точного непараметрического теста популяционной дифференциации [35] показало их однородность ( $P = 0.803$ ). Аналогичный результат получен при использовании  $F$ -статистики Райта или дисперсионного анализа молекулярной изменчивости [36] –  $F_{ST} = -0.004$  ( $P = 0.898$ ) и  $\Phi_{ST} = -0.005$  ( $P = 0.458$ ).

Выборки, сгруппированные по годам (2009 и 2010 гг.), также оказались однородны: точный тест –  $P = 0.251$ ,  $F_{ST} = -0.001$  ( $P = 0.554$ ) и  $\Phi_{ST} = 0.013$  ( $P = 0.213$ ).

Сравнение двух размерных групп амурского осетра (длина тела 32–96 см и 100–182 см) также не выявило их гетерогенности: точный тест –  $P =$

$= 0.680$ ,  $F_{ST} = -0.004$  ( $P = 0.857$ ) и  $\Phi_{ST} = -0.017$  ( $P = 0.990$ ).

Стандартные показатели, характеризующие изменчивость последовательностей рассматриваемой области КР мтДНК у образцов амурского осетра, полученных из естественных условий, даны в таблице (пп. № 1–11). По большинству из них оценки, полученные для SM-гаплогруппы, оказываются выше таковых, рассчитанных для ВГ-гаплогруппы. Примечательны различия гаплогрупп по уровню гаплогруппического разнообразия (0.985 против 0.938, что статистически значимо –  $Z = -1.85$ ,  $P = 0.032$ ), а также по значениям  $\theta_h$  и  $\theta_H$ , рассчитанным, соответственно, исходя из числа гаплогрупп в выборке и их разнообразия. Судя по всему, причиной этих различий является относительно высокая встречаемость гаплогруппы SCH34, которая примерно в 3 раза выше той, что ожидается согласно выборочной теории Ювенса [17] при принятии модели неограниченного числа аллелей в условиях их селективной нейтральности и действия случайного генетического дрейфа – 16 против 6. Подтверждением этому служит то, что искусственное снижение абсолютной численности данного гаплогруппы до расчетной (с 16 до 6) приводит к полному нивелированию различий между SM и ВГ гаплогруппами по показателям  $H$ ,  $\theta_h$  и  $\theta_H$  (их значения для ВГ-гаплогруппы становятся равными соответственно 0.982, 55.6 и 52.1).

Показатели, характеризующие изменчивость D-петли в двух группах особей амурского осетра, выделенных по типу мтДНК-гаплогрупп, а также в их суммарной выборке, взятой из естественных условий – № 1–11; результаты проверки этой изменчивости на нейтральность – № 12–16; результаты тестирования модели внезапной ступенчатой демографической экспансии [27] – № 17–18; а также основные параметры модели экспоненциального роста численности популяции, рассчитанные при использовании метода максимального правдоподобия (№ 19–20) [28] или байесовского подхода (№ 21–22) [29]

№	Параметр <sup>1</sup>	BG-гаплогруппа ( $n = 66$ )	SM-гаплогруппа ( $n = 46$ )	Суммарная выборка ( $n = 112$ )
1	$L$	812	799	813
2	$S$	33	48	73
3	$Pl$	36	52	92
4	$si$	13	15	16
5	$h$	39	34	73
6	$H$	$0.938 \pm 0.024$	$0.985 \pm 0.008$	$0.976 \pm 0.009$
7	$\theta_h$ (95% CI)	39.2 (24.1–64.0)	57.4 (31.1–108.7)	89.8 (61.1–133.0)
8	$\theta_H$	$13.6 \pm 6.0$	$61.8 \pm 33.4$	$38.9 \pm 15.3$
9	$\theta_S$	$6.93 \pm 2.14$	$10.92 \pm 3.40$	$13.80 \pm 3.60$
10	$\theta_\pi$	$3.21 \pm 1.86$	$9.52 \pm 4.94$	$15.75 \pm 7.84$
11	$\theta_c$ (95% CI)	0.024 (0.016–0.035)	0.034 (0.023–0.052)	0.059 (0.044–0.076)
12	$EW(P)$	0.076 (0.000)	0.037 (0.490)	0.033 (0.000)
13	$D(P)$	–1.74 (0.014)	–0.51 (0.345)	0.35 (0.716)
14	$H_{FW}(P)$	–0.78 (0.142) <sup>2</sup> –3.27 (0.008) <sup>4</sup> –6.52 (0.000) <sup>6</sup>	–0.11 (0.289) <sup>3</sup> –1.51 (0.065) <sup>5</sup> –3.80 (0.002) <sup>6</sup>	– – –3.59 (0.008) <sup>6</sup>
15	$Z_{nS}(P)$	0.02 (0.001)	0.07 (0.060)	0.10 (0.421)
16	$F_s(P)$	–37.51 (0.000)	–17.39 (0.000)	–36.57 (0.000)
17	$\tau$ (95% CI)	1.70 (0.59–6.41)	12.98 (7.24–17.42)	42.31 (17.65–50.76)
18	$SSD(P)$	0.00075 (0.814)	0.00626 (0.434)	0.03056 (0.002)
19	$\theta_g$	$0.100 \pm 0.017$	$0.076 \pm 0.011$	$0.079 \pm 0.008$
20	$g$	$1896.9 \pm 138.0$	$455.2 \pm 70.1$	$209.4 \pm 33.1$
21	$\theta_g$ (95% HPD)	0.108 (0.034–0.262)	0.076 (0.030–0.144)	0.088 (0.052–0.138)
22	$g$ (95% HPD)	1785.8 (754.4–3093.9)	461.2 (158.7–860.1)	263.7 (88.0–513.8)

<sup>1</sup> Расшифровка обозначений:  $L$  – длина массива выравненных последовательностей;  $S$  – число позиций с нуклеотидными заменами;  $Pl$  – общее число переменных позиций ( $S$  плюс индели);  $si$  – число синглтонов (сайтов с нуклеотидными заменами, встречающихся в выборке лишь у единичных образцов);  $h$  – число гаплогрупп;  $H$  – гаплогруппическое разнообразие;  $\theta_h/H/S/\pi$  – популяционный параметр  $2N_{ef}v$  ( $N_{ef}$  – эффективная численность самок в популяции,  $v$  – скорость нуклеотидных замещений/нуклеон/поколение), рассчитанный, исходя, соответственно, из числа гаплогрупп ( $h$ ) в выборке, их разнообразия ( $H$ ), числа сегрегирующих сайтов ( $S$ ) или попарных нуклеотидных различий ( $\pi$ );  $EW$  – тест Ювенса–Воттерсена [17, 18];  $D$  – тест Таджиджи [19];  $H_{FW}$  –  $H$ -тест Фей и Ву [20] в нормализованной форме [25];  $Z_{nS}$  – тест Келли [22];  $F_s$  –  $F_s$ -тест Фу [21];  $\tau$  – время в мутационных единицах,  $2vT$  ( $v$  – скорость нуклеотидных замещений/нуклеон/поколение,  $T$  – число поколений, прошедших с момента демографической экспансии);  $SSD$  – сумма квадратов отклонений между наблюдаемым и ожидаемым распределением попарных нуклеотидных различий в модели внезапной демографической экспансии;  $\theta_{c/g}$  – популяционный параметр  $2N_{ef}\mu$  ( $N_{ef}$  – эффективная численность самок в популяции,  $\mu$  – скорость нуклеотидных замещений/сайт/поколение), рассчитанный на основе анализа коалесценции гаплогрупп в условиях численно стабильной ( $\theta_c$ ) или растущей согласно экспоненциальной модели ( $\theta_g$ ) популяции;  $g$  – показатель скорости роста популяции;  $\pm$  – стандартное отклонение; CI – доверительный интервал; HPD – интервал наивысшей апостериорной плотности;  $P$  –  $p$ -значение (вероятность получения тестовой статистики, равной или более экстремальной, чем наблюдаемая, при условии справедливости нулевой гипотезы).

<sup>2–6</sup> Результаты  $H_{FW}$ -теста, полученные при использовании в качестве внешней группы гаплогрупп SCH35 (<sup>2</sup>) и SCH55 (<sup>3</sup>), SM-гаплогруппы (<sup>4</sup>), BG-гаплогруппы (<sup>5</sup>) или гаплогрупп *A. transmontanus* (<sup>6</sup>).

Высокая частота гаплогруппы SCH34 обуславливает статистически значимый ( $P < 0.000$ ) эксцесс гомозиготности, выявляемый с помощью теста Ювенса–Воттерсена [17, 18] не только в случае рассмотрения BG-гаплогруппы в отдельности, но

и при анализе суммарных данных (таблица). Укажем на то, что искусственное снижение численности гаплогруппы SCH34 с 16 до 6 уменьшает в 2 раза оценки гомозиготности как для BG-гаплогруппы, так и для суммарной выборки ( $EW =$

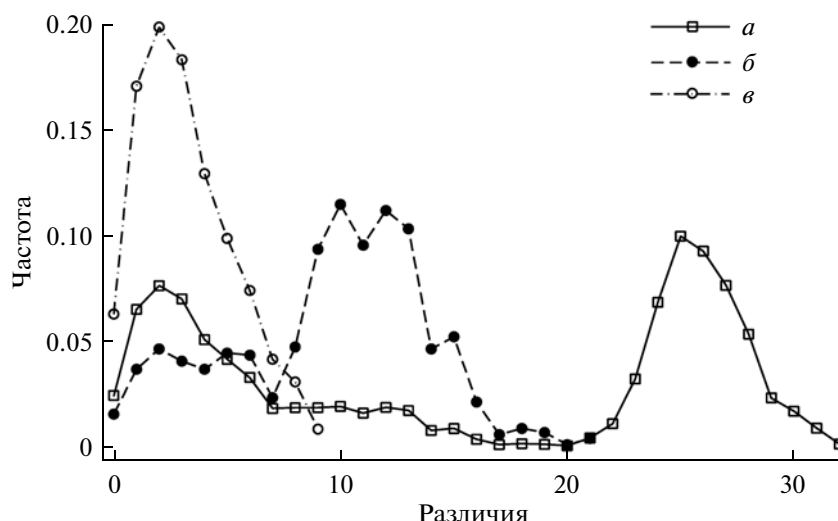


Рис. 3. Частотное распределение попарных нуклеотидных различий, полученное для суммарной выборки (а), а также отдельно для SM (б) или BG (в) групп мтДНК-гаплогрупп амурского осетра.

= 0.036 и  $EW = 0.018$  соответственно) и приводит их в соответствие с теоретически ожидаемыми ( $P = 0.750$  и  $P = 0.592$  соответственно).

Проверка изменчивости КР мтДНК образцов амурского осетра на нейтральность с использованием других тестов привела к следующим результатам.

Тест Таджimy при рассмотрении BG-гаплогруппы выявил существенный избыток мутаций, имеющих низкую частоту:  $D = -1.74$ ,  $P = 0.014$ . В случае SM-гаплогруппы значение  $D$ -статистики было также меньше нуля ( $\theta_\pi < \theta_S$ ), но абсолютное значение составило небольшую величину, и данное отклонение от модели нейтрального полиморфизма оказалось статистически не значимо. Поскольку суммарная выборка представляла собой смесь гаплогрупп из двух хорошо различающихся гаплогрупп, при ее рассмотрении ожидается получено положительное ( $\theta_\pi > \theta_S$ ) значение  $D$ -статистики. Впрочем, и в данной конфигурации проведенного теста допущение о селективно нейтральном характере наблюдаемого полиморфизма отвергнуто не было.

Результаты применения  $H$ -теста Фей и Ву [20] оказались сомнительными, поскольку находились в сильной зависимости от того, какая внешняя группа была использована (последняя необходима для выявления продвинутых мутаций). На примере BG и SM гаплогрупп можно видеть, что чем более удаленной была внешняя группа, тем большим оказывалось значение  $H_{FW}$ -статистики и тем более вероятным было достижение статистической значимости данного теста (см. таблицу).

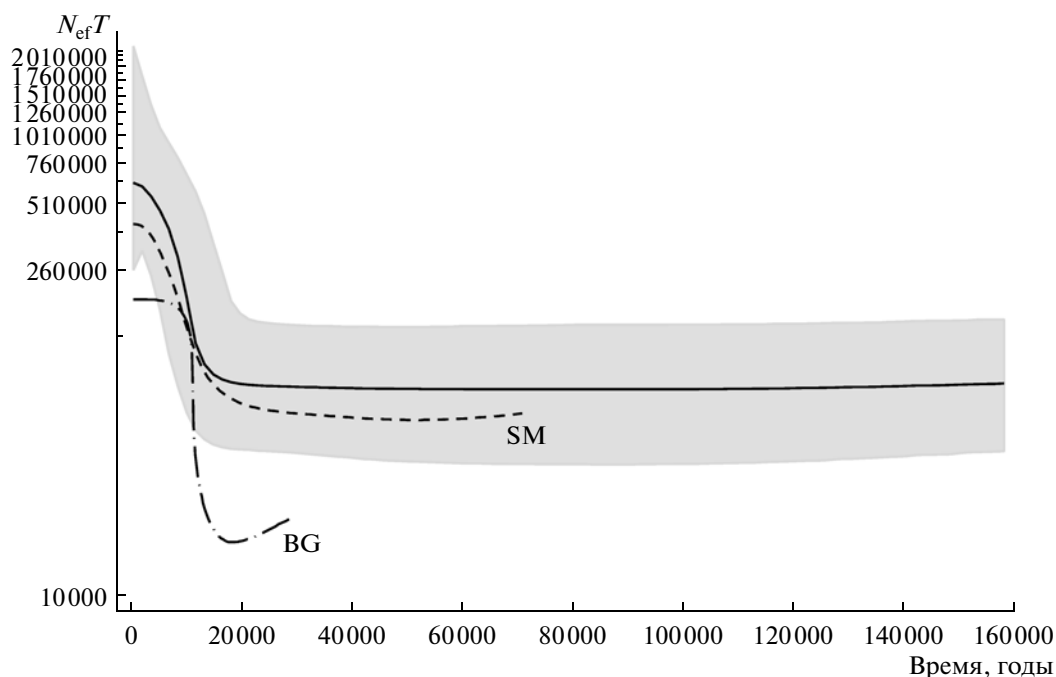
Результаты  $Z_{nS}$ -теста [22] в целом повторили картину, полученную при использовании теста Таджimy. Статистически значимое отклонение

от модели нейтрального полиморфизма выявлено только при рассмотрении BG-гаплогруппы. Значения статистики  $Z_{nS}$ , рассчитанные для SM-гаплогруппы или суммарной выборки, соответствовали тем, что ожидалось в случае справедливости указанной модели. Отметим, что значения  $Z_{nS}$ , полученные для последних двух группировок, мало отличались друг от друга, но были, соответственно, в 3.5 или 5 раз выше статистики  $Z_{nS}$ , рассчитанной для BG-гаплогруппы, что указывает на их различия в плане формы генеалогии гаплогрупп [22].

Согласно  $F_S$ -тесту Фу [21], статистически высоко значимый ( $P < 0.000$ ) избыток недавних мутаций свойствен всем трем вариантам группирования образцов амурского осетра (см. таблицу).

Распределение нуклеотидных различий между парами гаплогрупп из BG-гаплогруппы имело одновершинную форму с модой в начале шкалы (рис. 3). Мода этого распределения, полученного для гаплогрупп из SM-гаплогруппы, была смещена в сторону больших значений (10 и 12). В этом случае его форму также можно охарактеризовать как одновершинную, но с некоторой натяжкой, поскольку в левой части распределения намечается дополнительный пик, позиционно совпадающий с кривой распределения попарных нуклеотидных различий в BG-гаплогруппе (рис. 3). При рассмотрении суммарной выборки распределение попарных нуклеотидных различий мтДНК гаплогрупп имело две моды в районе значений 2 и 25.

Хорошо известно, что одновершинное распределение попарных различий может быть признаком недавнего быстрого роста численности популяции [26]. В соответствии с этим находятся результаты тестирования модели внезапной



**Рис. 4.** Байесовская контурная диаграмма (скайлайн), построенная для выборки последовательностей контролирующего региона мтДНК амурского осетра и отражающая изменение показателя  $N_{ef}T$  (произведения эффективной численности самок в популяции на продолжительность поколения, шкала ординат) во времени (шкала абсцисс). Сплошная линия – медиана, а затемненный участок – 95%-ный интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок показателя  $N_{ef}T$ . Длинный и короткий пунктир – медианные линии, полученные, соответственно, для BG и SM гаплогрупп в отдельности.

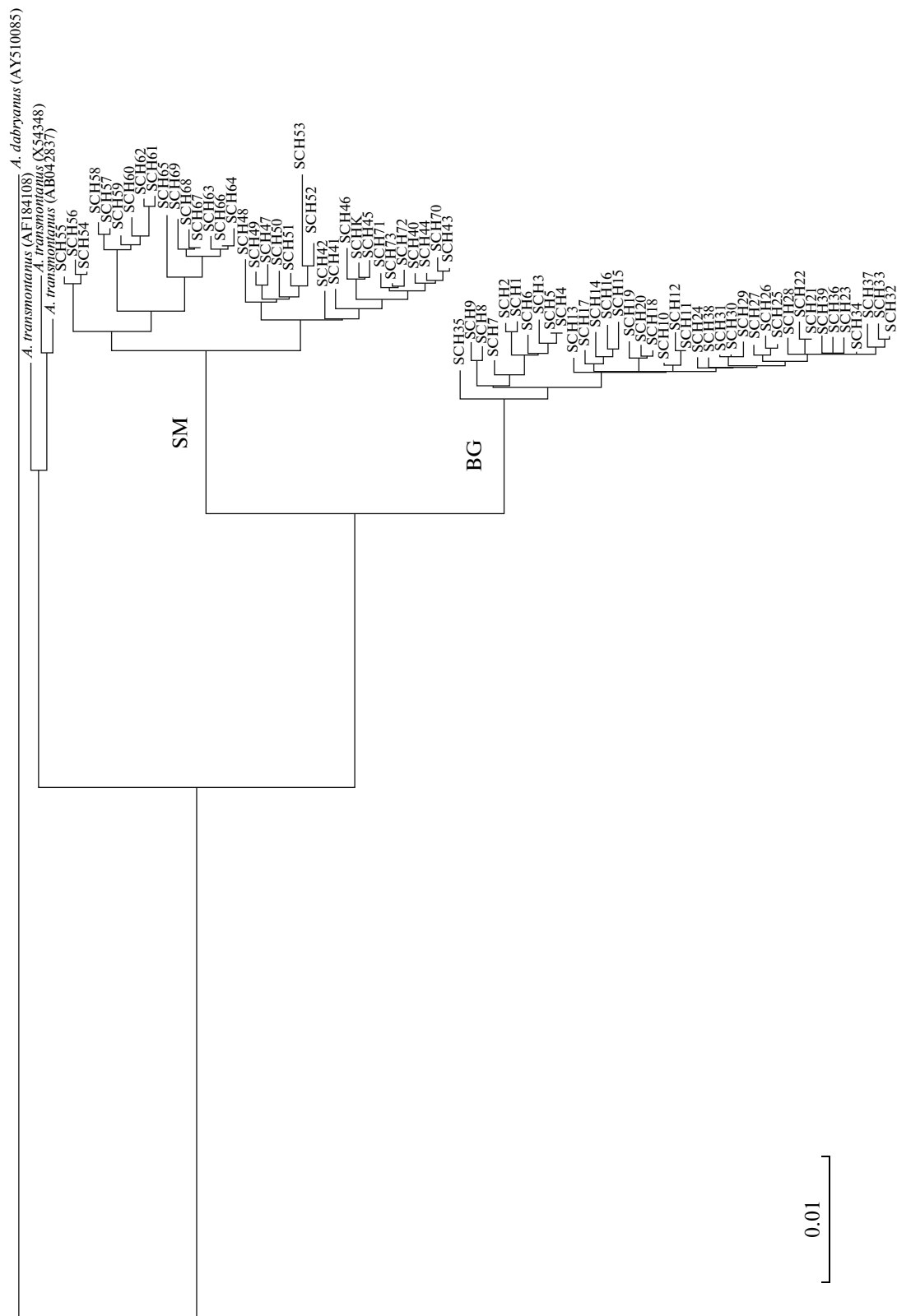
ступенчатой демографической экспансии [27] при рассмотрении BG и SM гаплогрупп в отдельности. В рамках данной модели численность BG-гаплогруппы, выраженная через популяционный параметр  $\theta$ , в недавнем прошлом ( $\tau = 1.7$ ) увеличилась с 2 до 3560. В случае SM-гаплогруппы расчеты показывают, что подобный рост численности был менее масштабным (в единицах  $\theta$  численность увеличилась с 0 до 34) и происходил он намного раньше ( $\tau = 13$ ). Однако в случае рассмотрения суммарной выборки данная модель оказалась несостоятельна и была отвергнута на высоком ( $P = 0.002$ ) уровне значимости.

Два подхода к анализу коалесценции мтДНК-гаплотипов (максимального правдоподобия [28] и байесовский [29]) привели практически к одним и тем же значениям основных параметров модели экспоненциального роста численности (таблица). При этом данная модель оказалась правомерна независимо от вариантов группирования образцов амурского осетра – и при использовании метода максимального правдоподобия (здесь границы доверительного интервала были оценены с помощью утроенного стандартного отклонения), и в случае байесовского анализа доверительные интервалы показателя скорости роста ( $g$ ) не включали в себя нулевое значение.

Еще один метод исследования демографической истории популяции на основе выборки нуклеотидных последовательностей – метод байесовского скайлайна (байесовской контурной диаграммы) [32] – выявил резкое возрастание численности популяции амурского осетра, начавшееся около 18–16 тыс. лет назад (рис. 4). Скайлайн, построенный для SM-гаплогруппы, в целом повторил таковой суммарной выборки. Скайлайн BG-гаплогруппы отличался от скайлайна суммарной выборки или SM-гаплогруппы тем, что его начальный уровень находился в области значительно более низких значений  $N_{ef}T$  (16000–21000 против 57000–61000). Итоговое значение показателя  $N_{ef}T$  для суммарной выборки оказалось равным 617622 (257950–2421752)\*, а в случае SM и BG гаплогрупп – 408747 (141145–2218285) и 192255 (111956–353626), соответственно.

Анализ филогенетических связей мтДНК-гаплотипов амурского осетра методом объединения ближайших соседей на основе матрицы НКУ-дистанций (рис. 5) показал, что они образуют две хорошо выраженные клады, поддержанные в 953 (BG) или 992 (SM) из 1000 псевдослучайных реплик бутстрэпа. Это лишний раз подтверждает

\* Медиана и 95%-ный интервал наивысшей апостериорной плотности.



**Рис. 5.** BIONJ-дерево мтДНК-гаплотипов амурского осетра (SCH1–73, SCHK), белого осетра (*A. transmontanus*), построенное на основе дистанций НКУ и укорененное с использованием внешней группы (*A. dabryanus*).

обоснованность выделения двух мтДНК-гаплогрупп и косвенно свидетельствует в пользу рациональности проведенного рассмотрения их генетических характеристик по отдельности. Средняя НКУ-дистанция между BG и SM гаплогруппами составила 3.4% различающихся нуклеотидных позиций. Чистая (нетто) дистанция между гаплогруппами (за вычетом различий внутри гаплогрупп) оказалась равной 2.2%. Средняя и нетто дистанции между гаплотипами амурского и белого (*A. transmontanus*) осетров были в 2.2–2.5 раза выше – 7.5 и 5.6% соответственно.

До настоящего момента в литературе не имелось каких-либо детальных данных по изменчивости последовательностей КР мтДНК амурского осетра из естественных условий, но были доступны результаты двух работ [37, 38], в которых произведено мтДНК-генотипирование 64 особей амурского осетра, взятых из четырех маточных стад, содержащихся в Государственном Пекинском технологическом научно-исследовательском центре пресноводного рыбного хозяйства (г. Пекин), а также из маточного стада в осетровом рыбозаводном хозяйстве г. Чунцин (Chong-Qing). Основу этих стад составили особи, отловленные в р. Амур в 1999–2001 гг. [37, 38]. По результатам секвенирования сравнительно коротких (425 и 451 пн) и частью перекрывающихся фрагментов D-петли в одной из этих работ выявлено пять [37], а в другой – восемь гаплотипов [38]. BIONJ-дерево, призванное позиционировать эти гаплотипы относительно мтДНК-гаплотипов из настоящей работы и построенное на основе матрицы дистанций НКУ, рассчитанных по общему для всех работ участку D-петли длиной 330 пн, представлено на рис. 6. Из него можно видеть, что у образцов амурского осетра из китайских рыбозаводных хозяйств идентифицировано семь мтДНК-гаплотипов, шесть из которых вошли в состав BG-гаплогруппы (найжены у 54 образцов), а один – в состав SM-гаплогруппы (найден у 10 из 12 осетров из стада AG2 [37]). Если же к этому фрагменту D-петли добавить те участки, которые были секвенированы лишь в одной из этих работ (что в сумме составит фрагмент длиной 536 пн), то тогда таких гаплотипов становится не семь, а 11 (10 из BG-, а один – из SM-гаплогруппы). Отсюда можно предположить, что для закладки маточных стад было использовано потомство как минимум 11 различных самок амурского осетра. Соотношение уникальных SM- и BG-гаплотипов у образцов амурского осетра из китайских рыбозаводных хозяйств (1 : 10) резко отличалось от такового в нашей выборке – 19 : 18 (рассчитано по тому же самому участку D-петли длиной 536 пн). Это означает, что разнообразие и/или частота SM-гаплотипов у амурского осетра в китайской части бассейна Амура (Средний Амур) намного ниже, чем в Нижнем Амуре, откуда проис-

ходит наша выборка. Согласно точному критерию Фишера, различия статистически значимы –  $P = 0.016$  (двусторонний критерий).

## ОБСУЖДЕНИЕ

До настоящего момента лишь для двух из шести видов Acipenseridae, обитающих в бассейне Тихого океана, было проведено исследование изменчивости контролирующего региона мтДНК на популяционном уровне – у китайского осетра *A. sinensis* из р. Янцзы (проанализирован фрагмент 419 пн у 106 образцов) [39] и белого осетра *A. transmontanus* из рек Фрэйзер и Колумбия (проанализирован фрагмент 462 пн у 27 образцов) [33]. Оба вида ведут в основном проходной образ жизни. Китайский осетр ранее был распространен от юго-запада Корейского п-ова и о-ва Хонсю на севере до Жемчужной реки на юге, но в последние столетия численность его сильно уменьшилась, и в настоящее время в заметных количествах он встречается лишь в р. Янцзы [40]. Область распространения белого осетра включает в себя западное побережье Северной Америки от Аляски на севере до рек Калифорнии на юге, и данный вид в плане численности находится в сравнительно благополучном состоянии [41].

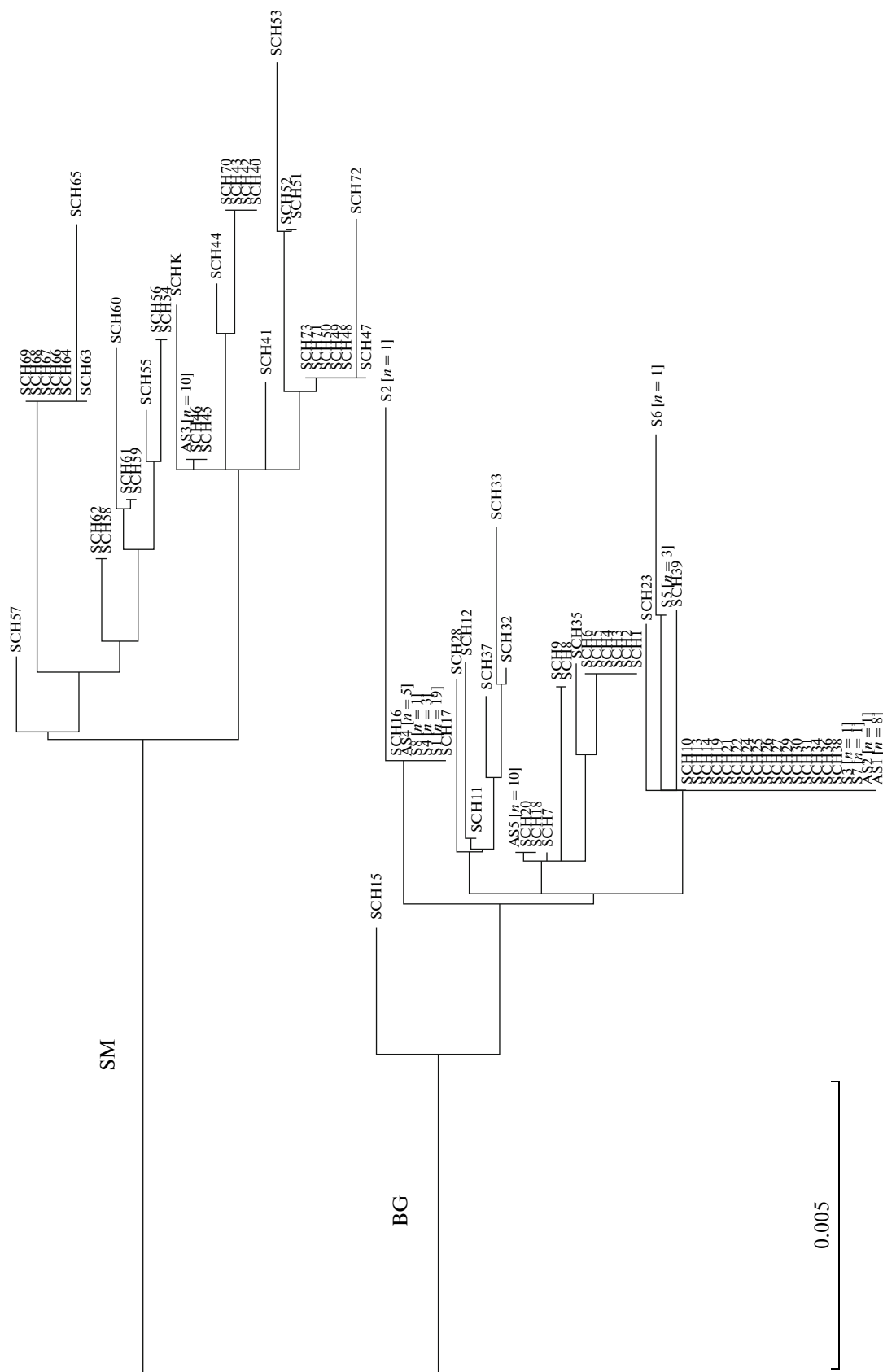
Уровень изменчивости КР мтДНК у амурского осетра в целом превышает таковой как китайского, так и белого осетров.

Гаплотипическое разнообразие суммарной выборки амурского осетра ( $H = 0.976 \pm 0.009$ ) ощутимо ( $Z_{\text{тест}} = 2.03$ ,  $P = 0.023$ ) выше, чем у китайского ( $H = 0.949 \pm 0.010$ ) [39], и примерно такое же, как у белого осетра ( $H = 0.97$ ) [33].

Нуклеотидное разнообразие ( $\pi = \theta_{\pi}/L$ , расшифровку см. в таблице) контролирующего региона мтДНК в суммарной выборке амурского осетра ( $\pi = 0.019 \pm 0.010$ ) выше, чем у китайского ( $\pi = 0.011 \pm 0.006$ ) [39] или белого ( $\pi = 0.012$ ) [33] осетров.

Оценки гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, рассчитанные отдельно для SM-гаплогруппы ( $H = 0.985 \pm 0.008$ ,  $\pi = 0.012 \pm 0.006$ ), находятся на уровне максимальных оценок, полученных для суммарных выборок китайского или белого осетров.

Оба показателя заметно ниже в BG-гаплогруппе –  $H = 0.938 \pm 0.024$ ,  $\pi = 0.004 \pm 0.002$ . Уровень гаплотипического разнообразия в ней примерно такой же, как у китайского осетра. Однако, если низкий его уровень в BG-гаплогруппе обусловлен, как указано выше, исключительно эксцессом частоты одного из гаплотипов (SCH34), то у китайского осетра другими причинами – согласно результатам теста Ювенса–Воттерсена [17, 18] (наши расчеты по данным из работы [39]), частотный спектр мтДНК гаплотипов у китайского



**Рис. 6.** BIONJ-дерево мтДНК-гаплотипов амурского осетра, выявленных в настоящей работе (SCH1–73, SCHK), а также гаплотипов, обнаруженных у особей этого вида, содержащихся в китайских рыборазводных хозяйствах (AS1–5 [37] и S1–8 [38]).

осетра находится в соответствии с ожидаемым ( $EW = 0.061$ ,  $P = 0.469$ ). В последнем случае низкое значение  $H$  может быть вызвано отмеченным выше падением численности китайского осетра, поскольку хорошо известно, что снижение гаплотипического разнообразия мтДНК в такие периоды – ожидаемое явление (см., к примеру, [42, 43]).

Причины наблюдаемого у амурского осетра эксцесса частоты гаплотипа SCH34 не ясны. Это может быть результатом действия естественного отбора, генетического дрейфа или каких-то других факторов. К последним можно отнести и хозяйственную деятельность человека, которая, на наш взгляд, могла сказаться на генетическом составе популяции амурского осетра.

В 80-х годах в бассейне Верхнего и Среднего Амура (выше г. Хабаровск) амурский осетр стал настолько редок, что были развернуты работы по его промышленному искусственному воспроизводству. В заметных количествах выпуск искусственно выведенных личинок и молоди амурских осетровых начался с 1988 г., когда один из китайских рыбопроизводных заводов (Qindeli state farm, Tongjiang, Jiamusi) произвел выпуск в р. Амур порядка 100 тыс. личинок амурского осетра [8]. Имеются данные о том, что за последующие три года с этого завода в р. Амур было выпущено 900 тыс. личинок и 168 тыс. экз. подрощенной молоди амурского осетра [44], а к 1995 г. суммарно – 3600 тыс. личинок [8]. Мог ли выпуск такой, искусственно выращенной, молоди привести к росту встречаемости у амурского осетра гаплотипа SCH34?

Как указано выше, проанализированные нами особи амурского осетра могут быть разбиты на два размерных класса – с длиной тела менее и более 100 см. Основываясь на известных закономерностях линейного роста амурского осетра из Нижнего Амура [45], средний возраст особей в первой группе можно принять равным 7–8 ( $lim = 2–14$ ) годам, а во второй – 25–26 ( $lim = 14–37$ ) годам. Тогда можно предположить, что осетры из первой группы родились в основном в 2001–2003 гг., а из второй – в 1983–1985 гг.

Встречаемость гаплотипа SCH34 в этих двух группах составила 0.152 (у пяти из 33 особей) в первой и 0.139 (у 11 из 79 особей) во второй. Согласно точному критерию Фишера, группы по данному признаку однородны ( $P = 1.00$ ). То есть, другими словами, в поколениях амурского осетра, родившихся до развертывания указанных рыбопроизводных работ, частота гаплотипа SCH34 примерно такая же, как у осетров, родившихся после. На первый взгляд, это можно расценивать как свидетельство того, что эксцесс частоты гаплотипа SCH34 у амурского осетра никоим образом не связан с начавшимися в 80-х годах работами по его искусственному воспроизводству.

Однако картина становится несколько иной, если рассмотреть группу крупных особей более

подробно. Среди 19 особей с длиной тела более 150 см (родившихся, по нашим расчетам, в основном до 1980 г.) лишь один образец ( $AC = 162$  см) имел гаплотип SCH34. В то же время среди 60 особей с длиной тела более 100, но менее 150 см (родившихся, по нашим расчетам, в основном после 1987 г.) данный гаплотип найден у десяти особей. То есть его частота в первой группе оказалась в три раза меньше, чем во второй, – 0.053 против 0.167. Различие этих групп по встречаемости гаплотипа SCH34 статистически не существенно ( $P = 0.280$ , точный критерий Фишера). Однако наша выборка особей с длиной тела более 150 см не столь велика, как хотелось бы, и если при увеличении ее размера, к примеру в 4 раза, частота гаплотипа SCH34 в ней сохранится, то в этом случае точный критерий Фишера будет показывать значимость этих различий ( $P \leq 0.045$ , если в выборке из 76 особей не более четырех будут нести гаплотип SCH34). Поэтому, на наш взгляд, более или менее окончательный ответ на поставленный вопрос о причинах наблюдающегося у амурского осетра эксцесса частоты гаплотипа SCH34 может быть дан только после исследования дополнительного материала и прежде всего особей, родившихся ранее 1980 г.

Низкое нуклеотидное разнообразие ВГ мтДНК-гаплотипов говорит об их эволюционной молодости. Все существующее разнообразие ВГ-гаплогруппы сложилось, по-видимому, в сравнительно недавнее время, когда происходил интенсивный рост ее численности (в пользу последнего свидетельствуют результаты тестов Таджими и Келли, значения показателей  $SSD$  и  $g$ , а также скайлайн). Этот рост может отражать восстановление популяции амурского осетра после ее прохождения через “бутылочное горлышко”, подходящие условия для которого могли существовать во время последнего ледникового максимума (Last Glacial Maximum) – 26–19 тыс. лет назад. По крайней мере, по нашим расчетам (рис. 4), рост численности ВГ-гаплогруппы начался почти сразу же по окончании этого периода – примерно 18–16 тыс. лет назад.

Численность SM-гаплогруппы в недавнем прошлом также увеличивалась, хотя и не так быстро, как численность ВГ-гаплогруппы. Рост численности SM-гаплогруппы также можно интерпретировать как восстановительный после окончания периода прохождения популяции через “бутылочное горлышко”. Начало этого роста по времени практически полностью совпало с началом роста численности ВГ-гаплогруппы (рис. 4).

Само наличие в составе митохондриального генного пула амурского осетра не одной (как можно было бы ожидать у вида, ареал которого ограничен единственным речным бассейном), а двух мтДНК-гаплогрупп требует объяснения. Оно, в принципе, может быть сравнительно простым. Для этого потребуются допустить, что попу-

ляция амурского осетра имела высокую численность, которая оставалась более или менее стабильной на протяжении сравнительно длительного (порядка  $2N_{ef}$  и более поколений) промежутка времени. Теоретически в выборке аллелей из популяции, в которой дрейф генов происходит согласно нейтральной модели Райта–Фишера (стабильная численность, панмиксия, непрерывающиеся поколения и др.), примерно половина времени, необходимого для их коалесценции, будет приходиться на коалесценцию последней пары аллелей. В таких условиях и при соответствующей скорости мутирования формирование мтДНК-клад, вызывающих би- или мультимодальное распределение попарных нуклеотидных различий, — вполне ожидаемый результат [46, 47]. К тому же известно, что степень выраженности таких клад лишь возрастает, если незадолго до момента анализа такая, ранее численно стабильная, популяция проходит через умеренное “бутылочное горлышко” [48].

Укажем на то, что в случае с амурским осетром условие панмиксии, вероятно, не соблюдается, поскольку имеются косвенные признаки, свидетельствующие о его популяционной неоднородности. Это, прежде всего, то, что общее снижение численности амурского осетра в разных частях Амура происходило по-разному, и если в Среднем Амуре в настоящее время амурский осетр практически исчез, то в Нижнем Амуре его численность все еще остается достаточно высокой [49]. Примечательно, что исходно численность амурского осетра в Среднем Амуре примерно в 2 раза превышала таковую в Нижнем Амуре [7]. Другим признаком может быть намечающееся различие в представленности мтДНК-гаплогрупп у амурского осетра из Среднего и Нижнего Амура (см. выше). К сожалению, оценить степень этой дифференциации пока (без анализа выборок из Среднего Амура) не представляется возможным.

Однако даже наличие у амурского осетра некой текущей популяционной структурированности вряд ли может рассматриваться как серьезный аргумент против вышеизложенного объяснения, так как ее могло не быть в прошлом плюс в масштабе времени, составляющем тысячи поколений, даже географически разделенные популяции, при определенных скоростях обмена мигрантами, могут вести себя как единое целое [47, 50].

Другое дело, что не только само появление двух мтДНК-гаплогрупп, но и их различия в структуре и динамике разнообразия (см. таблицу и рисунки) с этих позиций трактуются как случайно возникшие. Поэтому можно в качестве альтернативы выдвинуть другое объяснение присутствия в составе митохондриального генома пула амурского осетра двух различных мтДНК-гаплогрупп. А именно, что ВG- и SM-гаплогруппы сформировались в географически изолированных и, возможно, экологически различных попу-

ляциях амурского осетра и лишь в сравнительно недавнее время по каким-то причинам оказались вместе в популяции, распространенной ныне исключительно в бассейне р. Амур.

Косвенно на это указывает необычно высокое нуклеотидное разнообразие КР мтДНК в суммарной выборке амурского осетра ( $\pi = 0.019 \pm 0.010$ ). Оно велико не только при сравнении с таковым у других видов тихоокеанских осетров, но и при сравнении с уровнем изменчивости D-петли, наблюдающимся, к примеру, в суммарной выборке образцов сибирского осетра *A. baerii* из бассейнов рек Обь, Енисей, Лена и оз. Байкал ( $\pi = 0.010 \pm 0.006$ , рассчитано по данным [51]) или в суммарных выборках короткорылого *A. brevirostrum* ( $\pi = 0.011 \pm 0.006$ , рассчитано по данным [52]) и атлантического ( $\pi = 0.011 \pm 0.007$ , рассчитано по данным [53]) осетров из различных локалитетов, широко разнесенных по всему атлантическому побережью Северной Америки.

По уровню нуклеотидного разнообразия D-петли амурский осетр сближается с белугой *Huso huso*, северюгой *A. stellatus* и русским осетром *A. gueldenstaedtii*, суммарные выборки которых из бассейнов Черного, Азовского и Каспийского морей характеризуются крайне высоким уровнем изменчивости КР мтДНК —  $\pi = 0.022 \pm 0.011$ ,  $\pi = 0.018 \pm 0.009$  и  $\pi = 0.037 \pm 0.019$  соответственно [54]. Полагают, что столь высокое нуклеотидное разнообразие КР мтДНК может сигнализировать о существовании у этих осетров отдельных, морфологически трудно различимых популяций [54]. В связи с этим стоит также указать на то, что ранее, на основании рассмотрения внешнеморфологических признаков, каждый из этих видов разделяли на подвиды или даже разбивали на отдельные виды.

Поэтому один из самых высоких среди осетров уровней нуклеотидного разнообразия КР мтДНК может, на наш взгляд, рассматриваться как косвенный признак существования у амурского осетра в прошлом двух или более отдельных популяций. Распространение семи из восьми обитающих в бассейне Тихого океана видов осетрообразных приурочено к крупным речным бассейнам [55]. Сейчас в бассейне Охотского или Японского морей нет других рек, сопоставимых по площади с р. Амур, и, следовательно, пригодных для обитания в них амурского осетра. Однако не исключено, что такая речная система могла существовать в прошлом [56].

Разную представленность двух мтДНК-гаплогрупп у амурского осетра из Среднего и Нижнего Амура в таком случае можно интерпретировать как отражение сравнительно недавнего (менее 18–16 тыс. лет назад) массивного вторжения в генный пул аборигенной популяции амурского осетра, изначально имевшей, к примеру, лишь ВG-гаплотипы, гаплотипов из другой, к настоящему моменту уже вымершей (или поглощенной

первой), его популяции. При этом распространение “чужих” (SM в данном варианте) гаплотипов могло оказаться ограниченным в основном Нижним Амуром.

Если такая отдельная (распространенная вне бассейна р. Амур) популяция ранее существовала, то ей, скорее всего, был свойствен проходной образ жизни. Единичные находки особей амурского осетра вне бассейна Амура, в условиях полной морской солёности — на о-ве Хоккайдо [6] и в Ульбанском заливе (настоящая работа — образец с гаплотипом SCH7), указывают на то, что стадия нагула в морских водах в прошлом могла быть обычной для жизненного цикла амурского осетра. Это становится еще более вероятным, если учесть, что ближайший сестринский к амурскому осетру вид — белый осетр — ведет в основном анадромный образ жизни. Может быть, именно различия в экологии этих популяций и привели к различиям в структуре и динамике разнообразия BG и SM гаплогрупп.

Такое объяснение состава и других свойств нынешнего митохондриального генного пула амурского осетра — как результата смещения его ранее самостоятельных популяций — выглядит, на наш взгляд, довольно правдоподобно. Тем не менее предпочтение его альтернативному, рассматриваемому выявленную картину как результат совместного действия дрейфа генов и мутирования в условиях одной большой и численно стабильной популяции, без проведения дополнительных исследований (прежде всего — анализа выборок из других частей бассейна Амура и генетического типирования так называемых “коричневой и серой морф” [7] амурского осетра) представляется пока преждевременным.

В завершение мы попытались сопоставить текущую численность амурского осетра с долговременным эффективным размером его популяции, исходя из данных, касающихся самок.

Согласно последней оценке [49], полученной по результатам выборочного учета амурского осетра, произведенного на различных участках Среднего и Нижнего Амура (использовался метод площадей), общее число половозрелых особей в современной популяции амурского осетра составляет около 22000 шт. Тогда, при соотношении полов самки : самцы = 1 : 2 [9, 49], общее число половозрелых самок в ней — около 7333 шт. Каждая из этих самок участвует в размножении обычно раз в 2–4 года [4, 7, 9]. Отсюда число самок, участвующих в нересте, составляет примерно 1833–3666 шт.

Если за продолжительность одного поколения амурского осетра принять средний возраст половозрелых самок (около 27 лет — [49]), то, судя по байесовскому скайлайну (рис. 4), долговременная эффективная численность самок в его популяции в недавнем прошлом составляла  $617622/27 = 22874$  (9553–89695) шт., а около 20 тыс. лет на-

зад —  $82664/27 = 3602$  (1588–6190) шт. Отсюда можно заключить, что в современной популяции амурского осетра число участвующих в нересте самок на порядок меньше эффективного числа самок в его популяции, существовавшей в предшествующий период времени, и примерно одного порядка с таковым во время последнего ледникового максимума, когда популяция амурского осетра претерпевала фазу низкой численности.

Известно, что дисперсия числа потомков — один из основных факторов, приводящих к тому, что эффективный размер популяции оказывается заметно меньше общей численности репродуктивно значимых особей в популяции [57]. В случае амурского осетра этот фактор безусловно существует, так как его самкам свойственна высокая индивидуальная плодовитость, при одновременно довольно широкой амплитуде ее изменчивости — от сотни тысяч до более чем миллиона икринок [7, 44]. Поэтому эффективное число самок в современной популяции амурского осетра, скорее всего, меньше числа самок, участвующих в нересте. Отсюда можно утверждать, что нынешняя популяция амурского осетра если и не вышла за нижний предел естественного колебания своей эффективной численности, то находится на грани его преодоления. В связи с этим включение амурского осетра в Красный список МСОП (IUCN) в статусе вида с крайне высоким риском вымирания в природе (Critically Endangered) представляется вполне оправданным.

Работа выполнена при финансовой поддержке Дальневосточного отделения РАН (грант № 12-И-П30-04).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bemis W.E., Findeis E.K., Grande L. An overview of Acipenseriformes // Environ. Biol. Fishes. 1997. V. 48. P. 25–71.
2. Ludwig A., Belfiore N., Pitra C. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) // Genetics. 2001. V. 158. P. 1203–1215.
3. Krieger J., Hett A.K., Fuerst P.A. et al. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited // J. Appl. Ichthyol. 2008. V. 24. Suppl. 1. P. 36–45.
4. Солдатов В.К. Исследования осетровых Амура // Материалы к познанию русского рыболовства. 1915. Т. 3. Вып. 12. С. 96–415.
5. Никольский Г.В. Рыбы бассейна Амура (Итоги Амурской ихтиологической экспедиции, 1945–1949 гг.). М: Изд-во АН СССР, 1956. 551 с.
6. Omoto N., Maebayashi M., Hara A. et al. Gonadal maturity in wild sturgeons, *Huso dauricus*, *Acipenser mikadoi* and *A. schrenckii* caught near Hokkaido, Japan // Environ. Biol. Fishes. 2004. V. 70. № 4. P. 381–391.
7. Krykhtin M.L., Svirskii V.G. Endemic sturgeons of the Amur River: kaluga, *Huso dauricus*, and Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* // Environ. Biol. Fishes. 1997. V. 48. P. 231–239.

8. Wang Y., Chang J. Status and conservation of sturgeons in Amur River, China: A review based on surveys since the year 2000 // *J. Appl. Ichthyol.* 2006. V. 22. № s1. P. 44–52.
9. Ruban G., Qiwei W. *Acipenser schrenckii* // IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. 2013. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 03 June 2014.
10. Vasil'ev V.P., Vasil'eva E.D., Shedko S.V., Novomodny G.V. How many times has polyploidization occurred during acipenserid evolution? New data on the karyotypes of sturgeons (Acipenseridae, Actinopterygii) from the Russian Far East // *J. Ichthyol.* 2010. V. 50. № 10. P. 950–959.
11. Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Расторгуев С.М. и др. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // *Генетика.* 2008. Т. 44. № 7. С. 913–919.
12. Staden R., Beal K.F., Bonfield J.K. The Staden package, 1998 // *Methods Mol. Biol.* 2000. V. 132. P. 115–130.
13. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 3059–3066.
14. Villesen P. FaBox: an online toolbox for fasta sequences // *Mol. Ecol. Notes.* 2007. V. 7. № 6. P. 965–968.
15. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Res.* 2010. V. 10. № 3. P. 564–567.
16. Swofford D.L. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.
17. Ewens W.J. The sampling theory of selectively neutral alleles // *Theor. Popul. Biol.* 1972. V. 3. № 1. P. 87–112.
18. Watterson G.A. The homozygosity test of neutrality // *Genetics.* 1978. V. 88. № 2. P. 405–417.
19. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics.* 1989. V. 123. № 3. P. 585–595.
20. Fay J.C., Wu C.I. Hitchhiking under positive Darwinian selection // *Genetics.* 2000. V. 155. № 3. P. 1405–1413.
21. Fu Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // *Genetics.* 1997. V. 147. № 2. P. 915–925.
22. Kelly J.K. A test of neutrality based on interlocus associations // *Genetics.* 1997. V. 146. № 3. P. 1197–1206.
23. Eckert A.J., Liechty J.D., Tarse B.R. et al. DnaSAM: software to perform neutrality testing for large datasets with complex null models // *Mol. Ecol. Res.* 2010. V. 10. P. 542–545.
24. Watterson G.A. The homozygosity test after a change in population size // *Genetics.* 1986. V. 112. № 4. P. 899–907.
25. Zeng K., Fu Y.-X., Shi S., Wu C.-I. Statistical tests for detecting positive selection by utilizing high-frequency variants // *Genetics.* 2006. V. 174. № 3. P. 1431–1439.
26. Rogers A., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // *Mol. Biol. Evol.* 1992. V. 9. № 3. P. 552–569.
27. Schneider S., Excoffier L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA // *Genetics.* 1999. V. 152. № 3. P. 1079–1089.
28. Kuhner M.K., Yamato J., Felsenstein J. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent // *Genetics.* 1998. V. 149. № 1. P. 429–434.
29. Drummond A., Nicholls G., Rodrigo A., Solomon W. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data // *Genetics.* 2002. V. 161. P. 1307–1320.
30. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 // *Mol. Biol. Evol.* 2012. V. 29. № 8. P. 1969–1973.
31. Pybus O.G., Rambaut A., Harvey P.H. An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies // *Genetics.* 2000. V. 155. № 3. P. 1429–1437.
32. Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O.G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences // *Mol. Biol. Evol.* 2005. V. 22. № 5. P. 1185–1192.
33. Brown J.R., Beckenbach A.T., Smith M.J. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) // *Mol. Biol. Evol.* 1993. V. 10. № 2. P. 326–341.
34. Wang W., Hua Z., Hu H.-X. et al. Heteroplasmy in mtDNA control region and phylogenetics of five sturgeons // *Zool. Res.* 2009. V. 30. № 5. P. 487–496.
35. Raymond M., Rousset F. An exact test for population differentiation // *Evolution.* 1995. V. 49. № 6. P. 1280–1283.
36. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data // *Genetics.* 1992. V. 131. № 2. P. 479–491.
37. Niu C.-J., Hu H.-X., Luo J., Li C. Genetic diversity in the reserved parent fish broodstocks of *Asipenser schrenckii* and *Huso dauricus* // *J. Fish. China.* 2010. V. 34. № 12. P. 1795–1799.
38. Wang W., Zhu H., Hu H.-X. Genetic diversity of the reserved broodstocks in four species of sturgeon // *Chinese J. Zool.* 2012. V. 47. № 1. P. 105–111.
39. Zhang S.M., Wang D.Q., Zhang Y.P. Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* // *Conserv. Genet.* 2003. V. 4. № 6. P. 673–683.
40. Qiwei W. *Acipenser sinensis* // IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. 2013. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 03 June 2014.
41. Duke S., Down T., Ptolemy J. et al. *Acipenser transmontanus* // IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. 2013. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 03 June 2014.
42. Weber D.S., Stewart B.S., Lehman N. Genetic consequences of a severe population bottleneck in the Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi*) // *J. Hered.* 2004. V. 95. № 2. P. 144–153.

43. Johnson J.A., Dunn P.O., Bouzat J.L. Effects of recent population bottlenecks on reconstructing the demographic history of prairie-chickens // *Mol. Ecol.* 2007. V. 16. № 11. P. 2203–2222.
44. Wei Q., Ke F., Zhang J. et al. Biology, fisheries and conservation of sturgeons and paddlefish in China // *Environ. Biol. Fishes.* 1997. V. 48. P. 241–255.
45. Кошелев В.Н., Мухеев П.Б., Литовченко Ж.С. и др. Возраст и рост амурского осетра *Acipenser schrenckii* реки Амур // *Изв. ТИНРО.* 2009. Т. 159. С. 136–147.
46. Slatkin M., Hudson R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations // *Genetics.* 1991. V. 129. № 2. P. 555–562.
47. Marjoram P., Donnelly P. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution // *Genetics.* 1994. V. 136. № 2. P. 673–683.
48. Hein J., Schierup M.H., Wiuf C. Gene genealogies, variation and evolution: a primer in coalescent theory. USA: Oxford Univ. Press, 2005. 276 p.
49. Кошелев В.Н. Амурский осетр *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 (распределение, биология, искусственное воспроизводство): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ВНИРО, 2010. 24 с.
50. Allendorf F.W. Isolation, gene flow and genetic differentiation among populations // *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Plant and Animal Populations* / Eds Schonewald C.M., Chambers S.M., MacBryde B., Thomas W.L. N.Y.: Blackburn Press, 1983. P. 51–66.
51. Doukakis P., Birstein V.J., Ruban G.I., DeSalle R. Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species, *Acipenser baerii* and *A. stellatus* // *Mol. Ecol.* 1999. V. 8. P. 117–127.
52. Grunwald C., Stabile J., Waldman J. et al. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 1885–1898.
53. Waldman B.J.R., Grunwald C., Stabile J., Wirgin I. Impacts of life history and biogeography on the genetic stock structure of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*, Gulf sturgeon *A. oxyrinchus desotoi*, and shortnose sturgeon *A. brevirostrum* // *J. Appl. Ichthyol.* 2002. V. 18. P. 509–518.
54. Doukakis P., Birstein V.J., DeSalle R. Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*, *A. stellatus*, and *Huso huso*) based on mitochondrial DNA analysis // *J. Appl. Ichthyol.* 2005. V. 21. P. 457–460.
55. Bemis W.E., Kynard B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history // *Environ. Biol. Fishes.* 1997. V. 48. P. 167–183.
56. Лундберг Г.У. Крупные колебания уровня океана в четвертичный период: Биогеографические обоснования гипотезы. Л.: Наука, 1972. 548 с.
57. Frankham R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review // *Genet. Res.* 1995. V. 66. № 2. P. 95–107.

## Mitochondrial DNA Sequence Variation, Demographic History, and Population Structure of Amur Sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869

S. V. Shedko<sup>a</sup>, I. L. Miroshnichenko<sup>a</sup>, G. A. Nemkova<sup>a</sup>,  
V. N. Koshelev<sup>b</sup>, and M. B. Shedko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia  
e-mail: shedko@biosoil.ru

<sup>b</sup>Khabarovsk Branch of the Pacific Research Fisheries Center, Khabarovsk, 680000 Russia

The variability of the mtDNA control region (D-loop) was examined in Amur sturgeon endemic to the Amur River. This species is also classified as critically endangered by the IUCN Red List of Threatened species. Sequencing of 796- to 812-bp fragments of the D-loop in 112 sturgeon collected in the Lower Amur revealed 73 different genotypes. The sample was characterized by a high level of haplotypic (0.976) and nucleotide (0.0194) diversity. The identified haplotypes split into two well-defined monophyletic groups, BG ( $n = 39$ ) and SM ( $n = 34$ ), differing (HKY distance) on average by 3.41% of nucleotide positions upon an average level of intragroup differences of 0.54 and 1.23%, respectively. Moreover, the haplotypes of the SM groups differed by the presence of a 13–14 bp deletion. Most of the samples (66 out of 112) carried BG haplotypes. Overall, the pattern of pairwise nucleotide differences and the results of neutrality tests, as well as the results of tests for compliance with the model of sudden demographic expansion or with the model of exponential growth pointed to a past significant increase in the number of Amur sturgeon, which was most clearly manifested in the analysis of data on the BG haplogroup. The constructed Bayesian skyline plots showed that this growth began about 18 to 16 thousand years ago. At present, the effective size of the strongly reduced (due to overharvesting) population of Amur sturgeon may be equal to or even lower than it was before the beginning of this growth during the Last Glacial Maximum. The presence in the mitochondrial gene pool of Amur sturgeon of two haplogroups, their unequal evolutionary dynamics, and, judging by scanty data, their unequal representation in the Russian and Chinese parts of the Amur River basin point to the possible existence of at least two distinct populations of Amur sturgeon in the past.

English translation of paper is published in “Russian J. Genetics” (2015, vol. 51, no. 2), www.maik.ru.