

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-меркаптоэтанол; 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 сингтонов ( $si$ ), 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 бутстрапа.

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].

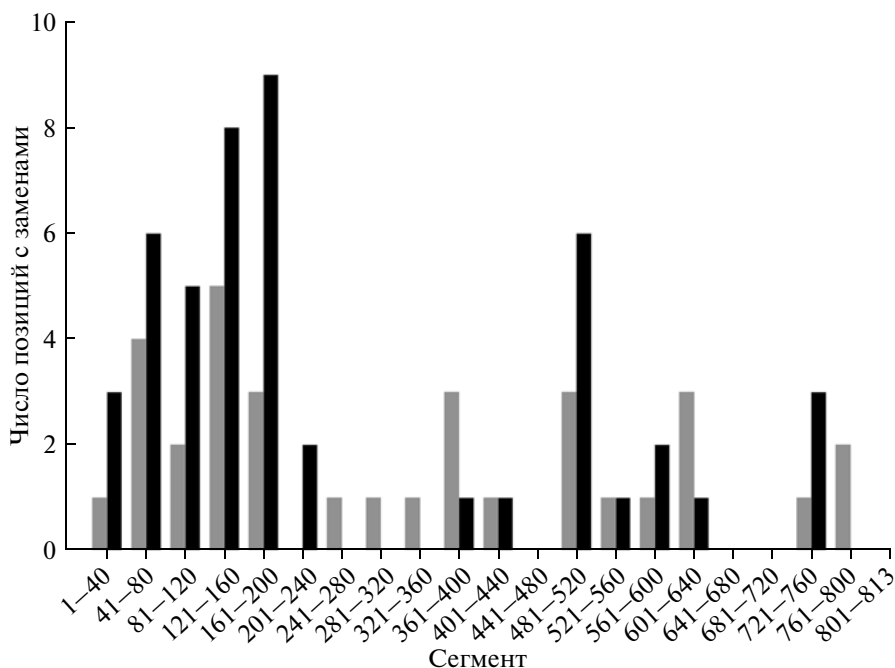
Примерно у 40% исследованных особей (у 50 из 128) в КР мтДНК наблюдалась сравнительно крупная делеция длиной от 13 до 14 пн (позиции с 543-й по 556-ю в массиве выравненных последовательностей – рис. 1), которая располагалась непосредственно позади *CSB I* участка. Размер других инделей был намного меньше 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	$H$	$0.938 \pm 0.024$	$4.985 \pm 0.008$	$0.976 \pm 0.009$
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 ( $EW =$

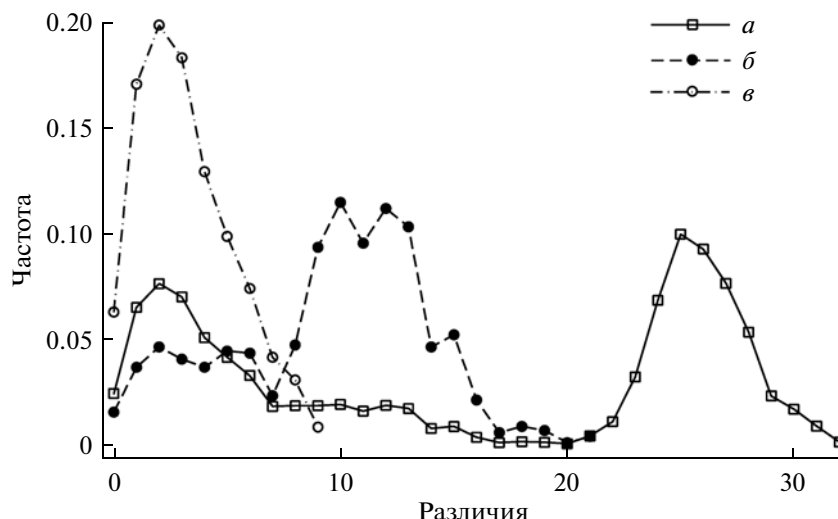


Рис. 3. Частотное распределение попарных нуклеотидных различий, полученное для суммарной выборки (а), а также отдельно для SM (б) или BG (в) групп мтДНК-гаплогрупп амурского осетра.

= 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 Таджимы 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 Таджимы. Статистически значимое отклонение

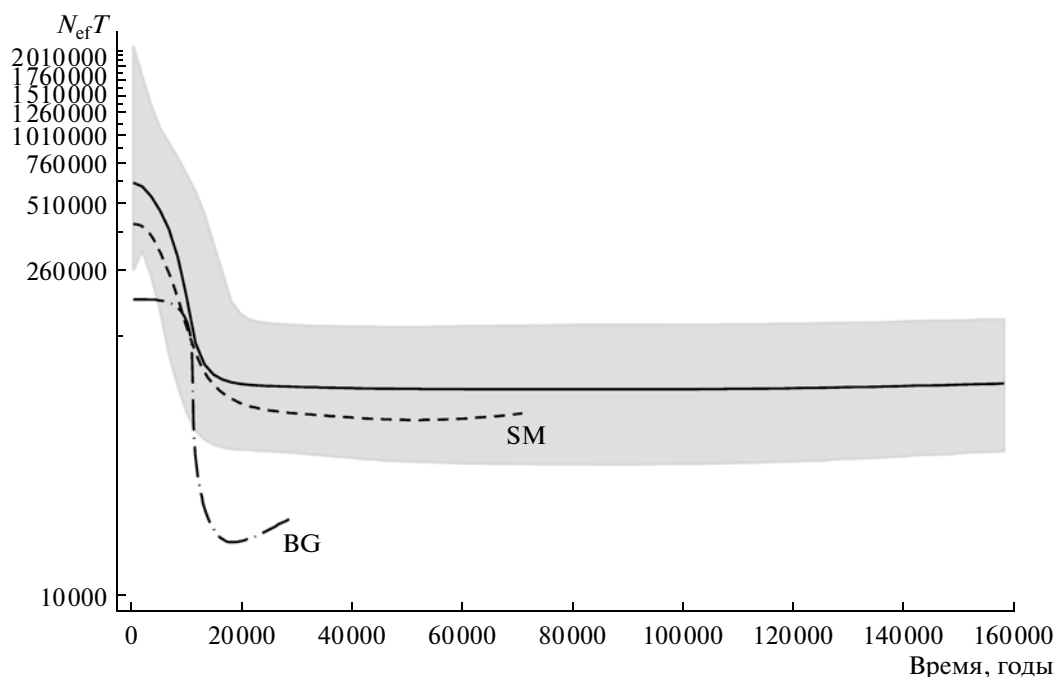
от модели нейтрального полиморфизма выявлено только при рассмотрении BG-гаплогруппы. Значения статистики  $Z_{nS}$ , рассчитанные для SM-гаплогруппы или суммарной выборки, соответствовали тем, что ожидалось в случае справедливости указанной модели. Отметим, что значения  $Z_{nS}$ , полученные для последних 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.

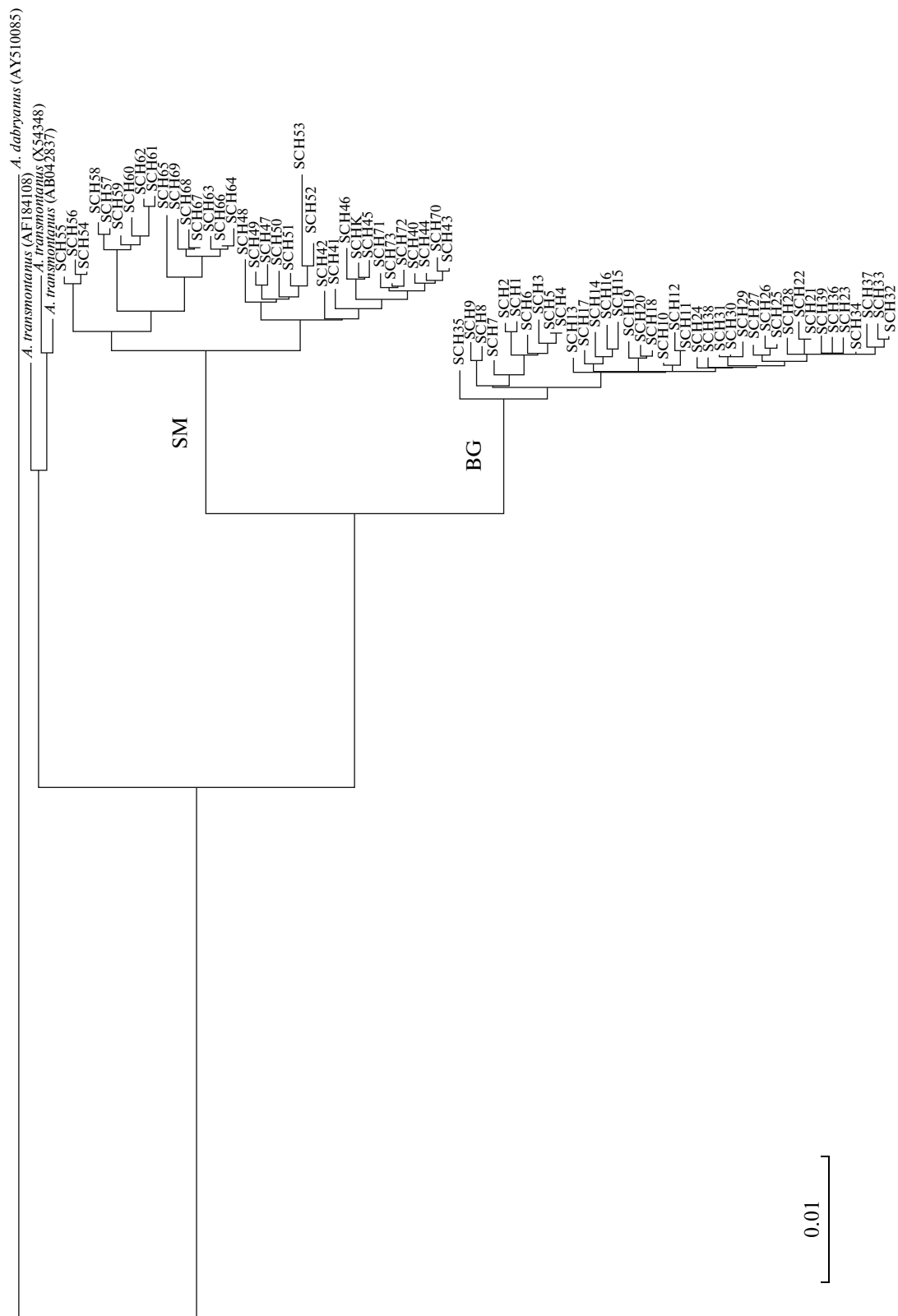
ступенчатой демографической экспансии [27] при рассмотрении BG и SM гаплогрупп в отдельности. В рамках данной модели численность BG-гаплогруппы, выраженная через популяционный параметр  $\theta$ , в недавнем прошлом ( $\tau = 1.7$ ) увеличилась с 2 до 3560. В случае SM-гаплогруппы расчеты показывают, 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 (найлены 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].

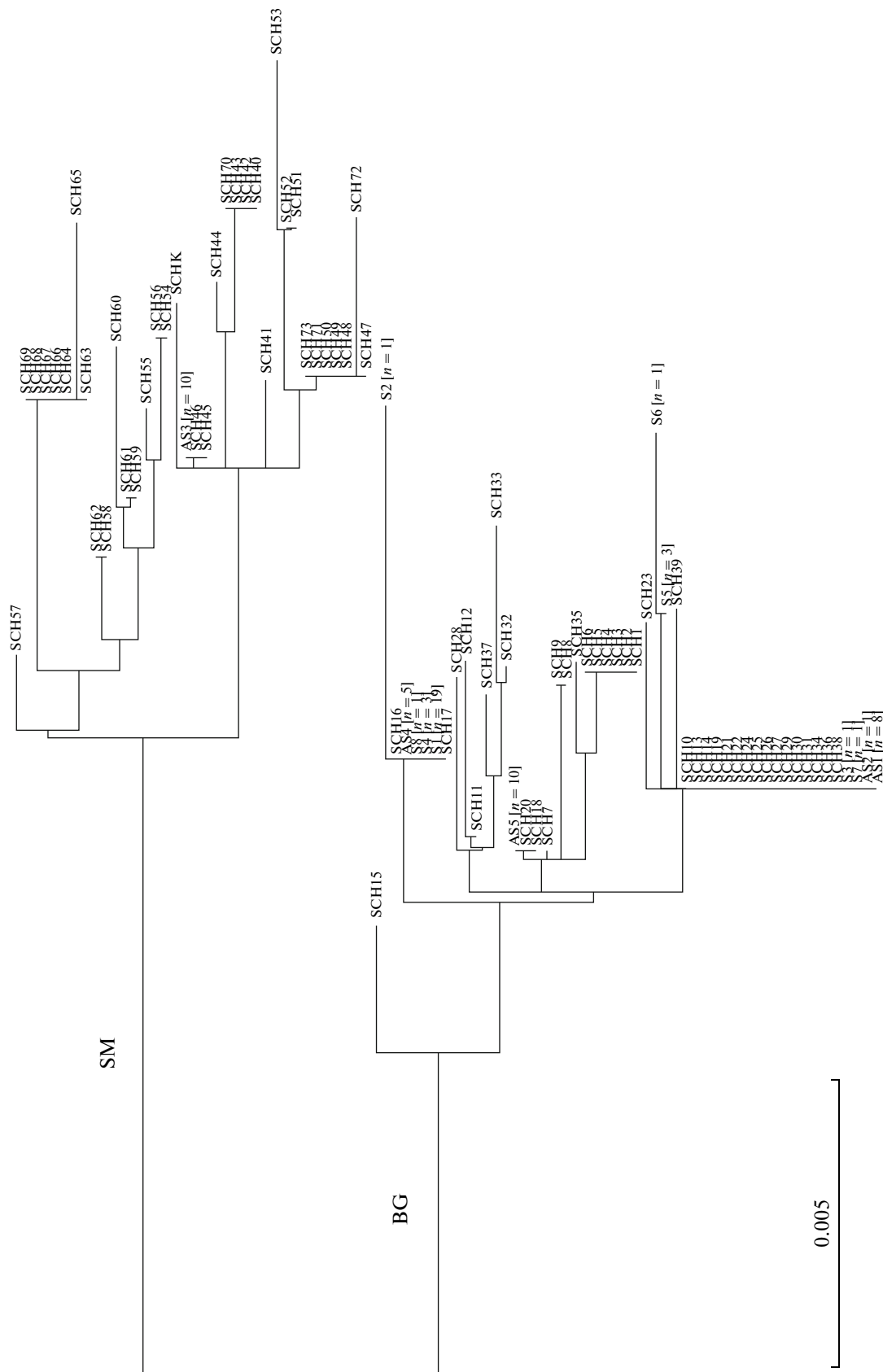
Уровень изменчивости КР мтДНК у амурского осетра в целом превышает таковой как китайского, так и белого осетров.

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-гаплогипов амурского осетра, выявленных в настоящей работе (SCH1–73, SCHK), а также гаплогипов, 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 ВG мтДНК-гаплотипов говорит об их эволюционной молодости. Все существующее разнообразие ВG-гаплогруппы сложилось, по-видимому, в сравнительно недавнее время, когда происходил интенсивный рост ее численности (в пользу последнего свидетельствуют результаты тестов Таджиджи 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 ВG-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 ВG-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 ВG-гаплогруппы (рис. 4).

Само наличие в составе митохондриального генома 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) массивованного 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. № 1. 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.