

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ АМУРСКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER SCHRENCKII* BRANDT, 1869 ПО ДАННЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ 18S РДНК

© К. В. Рожкован,¹ Г. Н. Челомина,¹ С. А. Иванов²

¹ Биолого-почвенный институт ДВО РАН и ² Институт Амуррыбвод, Владивосток;
¹ электронный адрес: chelomina@ibss.dvo.ru

Проведен анализ филогенетических связей амурского осетра *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 с родственными видами по данным секвенирования гена рРНК малой субъединицы рибосом. Для этого была определена полная (1746 п. н.) последовательность 18S рДНК семи индивидуальных клонов *A. schrenckii*. Результаты продемонстрировали высокое сходство мутационного профиля 18S рДНК амурского осетра с таковым североамериканского озерного осетра *A. fulvescens* (данные GenBank). Структурно-функциональный и филогенетический анализы позволили идентифицировать предположительно экспрессируемый вариант, а также таксон-специфическую мутацию (вставка аденина после позиции 658 п. н.) для последовательностей 18S рДНК *A. schrenckii*. Филогенетические реконструкции, выполненные с помощью разных методов (NJ, MP, ML и Bayesian), дали высокую статистическую поддержку монофилии рода *Acipenser* и указали на 1) большую близость амурского осетра со стерлядью, чем с балтийским осетром, что находится в соответствии с классификацией, основанной на эколого-морфологических данных (Artyukhin, 2006); 2) значительную дифференциацию между североамериканским (*A. fulvescens*) и евразийскими (*A. schrenckii*, *A. ruthenus* и *A. sturio*) видами Acipenseridae.

Ключевые слова: 18S рДНК, амурский осетр, филогения, Acipenseriformes.

Принятые сокращения: п. н. — пары нуклеотидов, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ML — максимальное правдоподобие, MP — максимальная парсимония, MST — минимальное спеннинговое дерево, NJ — ближайшее связывание, 18S рДНК — РНК малой субъединицы рибосом.

Осетровые рыбы занимают особое место среди позвоночных в основном благодаря таким уникальным особенностям, как эволюционная древность и относительно низкие скорости эволюции (Bemis et al., 1997; Krieger, Fuerst, 2002). Еще одной особенностью группы является то, что все ныне живущие представители Acipenseriformes занесены в списки СИТЕС (Ludwig, 2008). Основными причинами такого статуса являются загрязнение природной среды обитания осетровых, строительство дамб на нерестовых путях и чрезмерный вылов. Эти факторы также дополняются некоторыми биологическими особенностями осетров: размножение с промежутками до 5 лет, позднее созревание (после 10—15 лет) (Крыхтин, Горбач, 1994; Grunwald et al., 2002), межвидовая и межродовая гибридизация (Крыхтин, Горбач, 1994; Birstein et al., 1997). Одним из необходимых условий для принятия мер по сохранению данной группы рыб является разработка устойчивой филогении. Однако во вопросах классификации осетровых рыб все еще существует множество противоречий; филогенетические исследования, основанные на морфологических данных, не всегда находят подтверждение при использовании молекулярно-генетических подходов (Artyukhin, 2006).

Большинство исследований молекулярной таксономии и филогенетики осетровых рыб проводилось с использованием маркеров митохондриальной ДНК (мтДНК) (Zhang et al., 2000; Ludwig et al., 2001; Birstein et al., 2002;

Peng et al., 2007; Krieger et al., 2008). Результаты этих работ, несмотря на некоторые различия, во многом сходны; это означает, что дополнительные исследования на уровне митохондриальных генов могут и не внести ясности в систематику Acipenseriformes. Следовательно, необходимо использование ядерных генов, хотя их анализ в ряде случаев осложняется высоким уровнемплоидности осетровых рыб: гены Acipenseridae содержат от 120 до 500 хромосом, которые можно ранжировать в серии по $4n-8n-16n$ (Ludwig et al., 2001).

Общепризнанным молекулярным маркером для филогенетических исследований многочисленных групп животных и растений является ядерная 18S рДНК (Luan et al., 2004; Yoon, Kim, 2006; Hines et al., 2007, и др.). Однако осетры оказались в числе видов, геном которых отличается разнообразием аллелей рДНК (Krieger, Fuerst, 2002, 2004; Krieger et al., 2006). Данная особенность затрудняет выяснение реальных взаимоотношений между видами (Buckler et al., 1997; Krieger, Fuerst, 2002), поэтому использование 18S рДНК в филогенетических исследованиях Acipenseridae возможно лишь после предварительного анализа последовательностей (Abouheif et al., 1998; Xia et al., 2003).

Цель нашей работы — поиск надежных молекулярных маркеров для филогенетических исследований рыб семейства Acipenseridae. Основная задача состояла в анализе филогенетических связей амурского осетра *Acipenser*

schrenckii Brandt, 1869 с другими видами осетровых рыб по данным секвенирования полной последовательности 18S рДНК. Сопоставление полученных результатов с филогениями, основанными на других признаках, позволяет считать выбранный маркер вполне эффективным для уточнения взаимоотношений между видами осетровых рыб.

Материал и методика

В работе использовали следующие реактивы: термоильные ДНК-зависимые ДНК полимеразы *Pfu* DNA (Fermentas, Литва); Polymerase и Taq DNA Polymerase (МедиГен, Россия); набор для амплификации длинных фрагментов ДНК Long PCR Enzyme Mix и набор для клонирования продуктов ПЦР InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Литва); набор для секвенирования с BigDye Terminator (Applied Biosystems, США).

Амплификацию полноразмерного гена малой рибосомной субъединицы (около 1800 п. н. у рыб) проводили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров (табл. 1), разработанных для североамериканского озерного осетра *Acipenser fulvescens* (Krieger, Fuerst, 2002), и набора для ПЦР длинных фрагментов ДНК Long PCR Enzyme Mix (Fermentas, Литва). Реакционная смесь для ПЦР состояла из 90 нг геномной ДНК, 5 мкл 10X Long PCR-буфера, 17 мМ MgCl₂, 2.5 мМ dNTP, 1.5 ед. смеси ферментов для длинной PCR и 0.5 мМ каждого праймера. Был использован следующий температурный режим: 94 °C — 3 мин (94 °C — 1 мин, 55 °C — 2 мин, 68 °C — 4 мин) · 35, 72 °C — 15 мин. Продукты амплификации очищали осаждением тремя объемами 96%-ного этилового спирта.

Клонирование полноразмерного гена 18S рРНК осуществляли с использованием набора InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Литва) по инструкции фирмы-производителя. Для приготовления компетентных клеток использовали штамм Dh5α *E. coli*.

Для амплификации клонированных последовательностей 18S рДНК ~2 мм² колонии отбирали стерильным наконечником и вносили в смесь, содержащую 100 мМ Tris-HCl (рН 8.3), 500 мМ KCl, 0.25 мМ каждого dNTP, 0.25 мМ каждого праймера, 1.5 мМ MgCl₂ и 1 ед. смеси Taq/Pfu (для минимизации ошибок при ПЦР). Температурный режим: 95 °C — 3 мин (95 °C — 1 мин, 72 °C — 4 мин) · 35, 72 °C — 40 мин.

Секвенирование выполняли на автоматическом лазерном секвенаторе ABI PRISM 310 на базе БПИ ДВО

РАН. Реакцию секвенирования проводили в 15 мкл реакционной смеси, содержащей около 10 нг плазмидной ДНК со вставкой, 1 пкМ праймера и 2.5 мкл BigDye Terminator v. 3.1 при следующих условиях: 96 °C — 1 мин (96 °C — 30 с, 50 °C — 15 с, 60 °C — 4 мин) · 25. Очистка ПЦР продуктов включала в себя осаждение 70%-ным этанолом.

Сборку и выравнивание последовательностей 18S рДНК, а также расчет генетических дистанций и филогенетические реконструкции (по методу ближайшего связывания NJ, максимальной парсимонии MP, максимального правдоподобия ML и Bayesian) выполняли с использованием пакета программ Mega v. 4 (Tamura et al., 2007), Arlequin v. 3.11 (Excoffier et al., 2006) и MrBayes v. 3.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Выбор оптимальной математической модели для расчета генетических дистанций и филогенетических реконструкций проводили с помощью информационного критерия Akaike (AIC) (Akaike, 1974) в программе Modeltest v. 3.06 (Posada, Crandall, 1998). Кроме собственных данных для филогенетического анализа были использованы последовательности 18S рДНК из GenBank по другим видам рыб: *Acipenser fulvescens* (озерный осетр), *A. sturio* (балтийский осетр), *A. ruthenus* (стерлядь), *Polyodon spathula* (веслонос) и *Oncorhynchus mykiss* (кумжа) как внешняя группа.

Результаты и обсуждение

Для анализа филогенетических связей амурского осетра с другими видами Acipenseridae нами было секвенировано 7 клонов полноразмерных последовательностей 18S рДНК (1746 п. н.), у которых 486-е нуклеотидные участки (позиции 960—1144 п. н. полноразмерного гена) были наименее изменчивы (Челомина и др., 2008). Анализ распределения вставок и делений подтвердил наличие у *A. schrenckii* 6 «горячих точек», т. е. сайтов со вставками (делециями) во всех проанализированных последовательностях, выявленных ранее у *Acipenseriformes* в пределах двух участков 18S рДНК общей длиной 788 п. н. (Krieger et al., 2006). Все без исключения «горячие точки» находятся в вариабельных областях молекулы 18S рРНК. Кроме того, нами обнаружена специфичная для *A. schrenckii* вставка аденина после позиции 658 п. н., не вошедшая в исследованный ранее участок (табл. 2; рис. 1).

Аллельные варианты гена 18S рРНК амурского осетра различались между собой по 14 транзициям, 3 трансверсиям, 9 вставкам, 5 делециям и 2 комплексным мута-

Таблица 2

Распределение вставок и делеций в полноразмерных копиях гена 18S рРНК осетровых рыб

Вид	Нуклеотидная позиция						
	53	265	658	771	840	1366	1696
Af*	+	+		+	+	+	+
As	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. Af — *A. fulvescens*, As — *A. schrenckii*. Позиции пронумерованы согласно последовательности *Polyodon spathula* (GenBank: AF188371). Делекция выделена курсивным шрифтом. Для вставок номер позиции предшествует мутации. Знак «+» обозначает присутствие мутации; звездочка — данные GenBank.

Таблица 1

Список праймеров для амплификации полноразмерного гена 18S рРНК осетров

Название праймера	Последовательность праймера
CRN5A	5'-GGTTGATCCTGCCAGTAG-3'
373C	5'-GATTCCGGAGAGGGAGCCT-3'
892C	5'-GTCAGAGGTGAAATTCTTGG-3'
570	5'-GCTATTGGAGCTGGAATTAC-3'
1262	5'-GAACGGCCATGCACCAC-3'
SSU2	5'-CCGGCCGCCGGATCCTGATCCCTCCGCAG GTTCAC-3'

Рис. 1. Вариабельные сайты полной последовательности гена 18S рРНК амурского осетра.

Psp* — *P. spathula*, As — *A. schrenckii*.

циям (т. е. затрагивающим более 3 нуклеотидов). В целом мутационный профиль 18S рДНК *A. schrenckii* имеет выраженное сходство с таковым у *A. fulvescens* (данные GenBank) (рис. 2). Анализ распределения мутаций между консервативными и вариабельными участками у амурского и озерного осетров также выявил высокое сходство сравниваемых видов. В обоих случаях все основные типы мутаций концентрируются в вариабельных участках; наиболее существенное межвидовое отличие — почти трехкратное преобладание вставок (делеций) у *A. schrenckii* (рис. 3, б).

Используя модель вторичной структуры 18S рРНК американского веслоноса *Polyodon spathula* (Krieger, 2000), ближайшего филогенетического родственника видов *Acipenser*, мы проследили распределение мутаций по функциональным доменам молекулы для каждого из 7 клонов рДНК *A. schrenckii*. Структурно-функциональный анализ не выявил каких-либо мутаций в ключевых структурах, связанных с декодированием, транслокацией и трансляционной точностью (спирали 27, 34, 45, петля 530 и участок C1400 с A- и P-сайтами) анализируемых вариантов 18S рРНК, что предполагает сохранение ими функциональной значимости. Наибольшую важность среди функциональных доменов представляет спираль 27 (P27). По имеющимся литературным данным (Hoerter et al., 2004), H27 является конформационным переключателем, отвечающим за точность трансляции. Кроме этого, спираль 27 выступает как межсубъединичный мост и влияет на функционирование спирали 44, участвующей в распознавании тРНК. Нуклеотидные замены и (или) вставки (делеции) могут негативно влиять на функциональные домены 18S рРНК, что ведет к ошибкам при трансляции или невозможности функционирования рибосомы.

В целом эти результаты показали, что по крайней мере четыре из исследованных клонов (As-1, As-3, As-6 и As-7) потенциально могут быть функциональными генами, так как 1) имеют минимальное число нуклеотидных различий по сравнению с Af-7 — предположительно экспрессируемой последовательностью 18S рДНК *A. fulvescens* (Krieger, Fuerst, 2004), 2) не несут крупных вставок (делеций) и 3) не имеют мутаций в основных функциональных сайтах.

Чтобы определить, какая из клонированных последовательностей наиболее соответствует «требованиям» функционального гена, был дополнительно проведен филогенетический анализ с привлечением имеющихся к настоящему времени данных из GenBank по озерному осетру. MST-реконструкция (рис. 4) свидетельствует о том, что такой последовательностью скорее всего является As-7, по крайней мере по двум причинам. Именно она располагается в центре «звездчатой» структуры, образуемой клонами *A. schrenckii*, что предполагает ее предковость, и только она имеет прямые филогенетические связи с функциональной последовательностью 18S рДНК *A. fulvescens* (Af-7). Поэтому для установления филогенетических связей *A. schrenckii* с другими представителями осетровых рыб мы использовали последовательность As-7. Интересно, что одна из последовательностей 18S рДНК амурского осетра (As-2) на MST-древе оказалась филогенетически более близкой к предполагаемым псевдогенам *A. fulvescens*.

Филогенетические реконструкции, построенные для As-7 (т. е. последовательности, предположительно кодирующей функциональные молекулы 18S рРНК *A. schrenckii*) при помощи разных методов, показали одинаковую топологию. Амурский осетр *A. schrenckii* и стерлядь *A. ruthenus* определяются в них сестринскими таксонами,

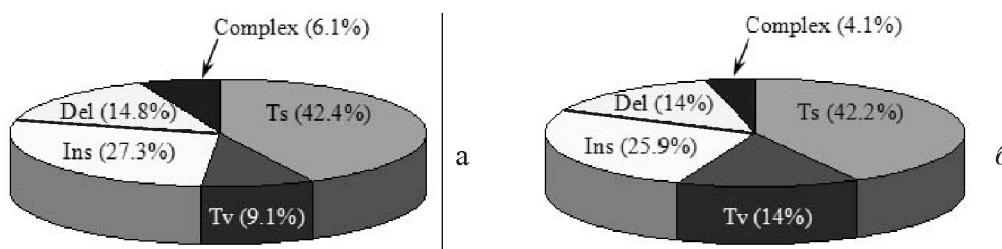


Рис. 2. Мутационный профиль амурского (*a*) и озерного (*b*) осетров.

Ts — транзиции, Tv — трансверсии, Ins — вставки, Del — делеции, Complex — мутации, затрагивающие более трех нуклеотидов.

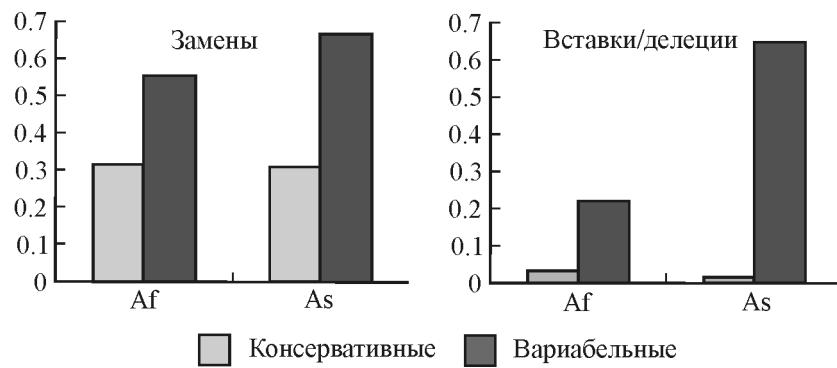


Рис. 3. Распределение нуклеотидного разнообразия между консервативными и вариабельными участками полной последовательности 18S рДНК амурского и озерного осетров.

Значения пересчитаны на 100 нуклеотидов. Af — *A. fulvescens**, As — *A. schrenckii*.

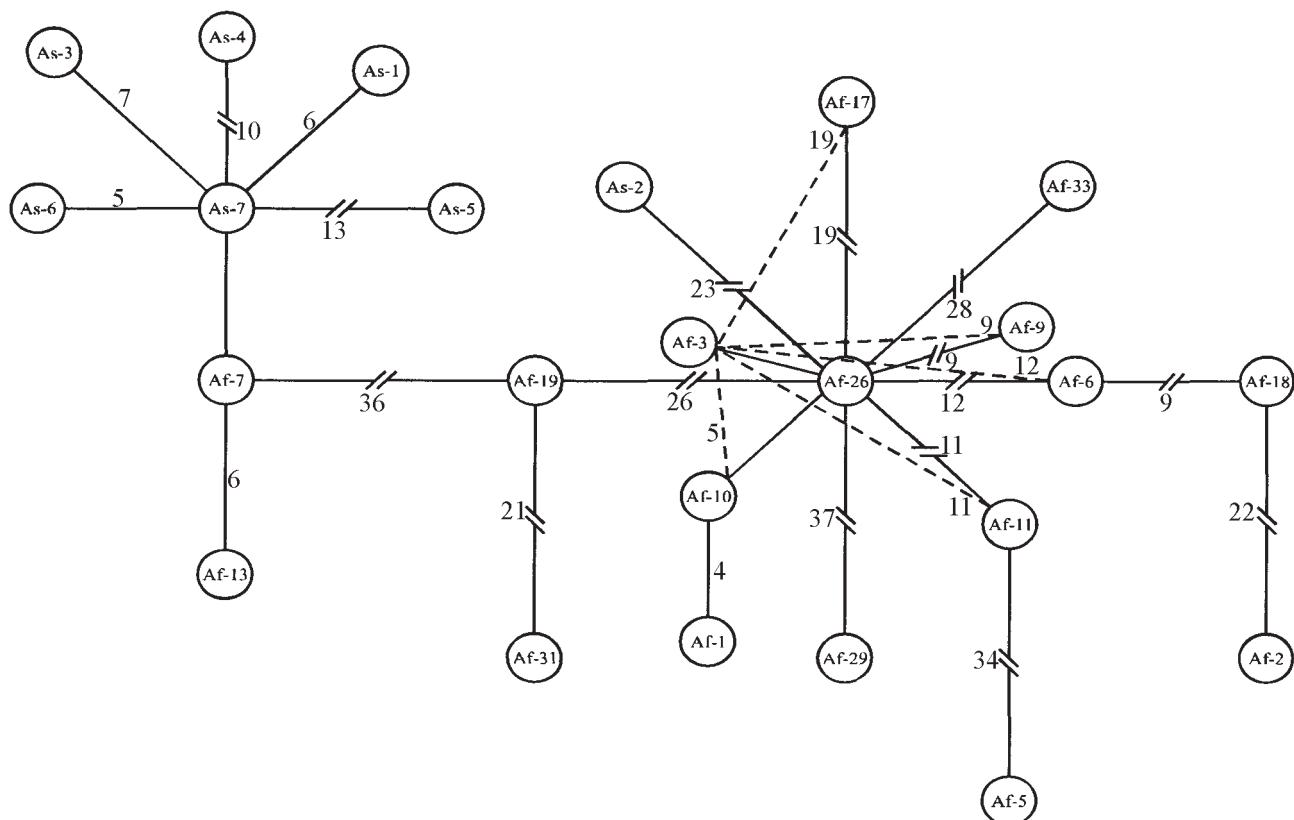


Рис. 4. Минимальное спенниговое древо (MST) амурского и озерного осетров по данным полной последовательности 18S рДНК. Af — *A. fulvescens** (данные GenBank), As — *A. schrenckii*. Штриховой линией показаны альтернативные связи, числа на ветвях указывают количество мутаций, внутри кружков — номера клонов.

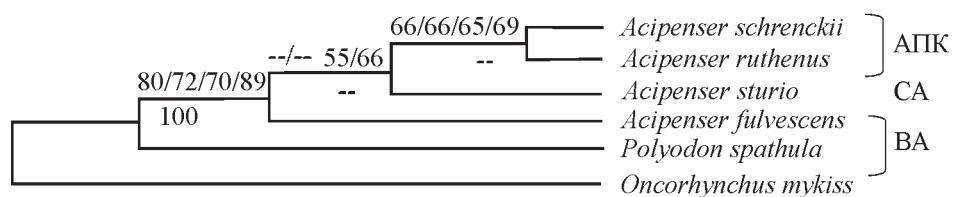


Рис. 5. Филогенетические связи амурского осетра *A. schrenckii* с другими видами Acipenseriformes (данные GenBank) по данным полной последовательности 18S рРНК.

Цифры над узлами дрэва показывают уровень статистической поддержки ветвления (NJ/ME/ML/Bayes-реконструкции), под узлами — для МР; штриховой линией показано, что уровень поддержки ниже 50 %. APK — Адриатическо-Понто-Каспийская, CA — Северо-Атлантическая, BA — Восточно-Американская эндемичные зоны.

от которых последовательно ответвляются *A. sturio*, *A. fulvescens* и *P. spathula* (рис. 5), причем достаточно высокую статистическую поддержку получает лишь монофилия рода осетров *Acipenser*.

Полученные результаты согласуются с данными Арtyukhin (Artyukhin, 1995, 2006), основанными на исследовании морфологии и экологии Acipenseridae. Филогенетические связи осетров, реконструированные по 21 синапоморфии, указывают на близкие отношения между *A. schrenckii* и *A. ruthenus* и большую удаленность этих видов от *A. fulvescens* по сравнению с *A. sturio*. По мнению автора, виды, обитающие в одной эндемичной зоне, являются наиболее близкими, но не обязательно монофилетическими; группы осетровых рыб внутри одной эндемичной зоны могут быть распределены в разные породы. В частности, амурский осетр (Амурская эндемичная зона) и стерлядь (Адриатическо-Понто-Каспийская зона) входят в один подрод *Sterleta*; балтийский осетр (Северо-Атлантическая зона) и озерный осетр (Восточно-Американская эндемичная зона) включены в два разных подрода — *Sturio* и *Dinectus* соответственно.

Иной является топология филогенетических древ, полученных по данным изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК (Ludwig et al., 2001). В ней кластер Acipenseridae разделяется на две монофилетические группы, объединяющие соответственно атлантические и тихоокеанские виды, по отношению к которым *A. sturio* занимает базальное положение. Хотя филогенетические реконструкции, основанные на признаках, имеющих разный тип наследования, совпадают далеко не всегда, мы не исключаем, что с вводом в анализ 18S рДНК дополнительных данных по другим родственным видам океаническая дифференциация осетровых рыб, выявленная при анализе мтДНК, может быть подтверждена. Пока наши данные можно рассматривать как доказательство выраженной географической дифференциации Acipenseridae, подчеркивающее глубокую связь видов осетровых рыб с озерными и речными системами.

Таким образом, филогенетический анализ указывает на достоверную генетическую дифференциацию между видами, обитающими в Северной Америке и Евразии, и более тесные связи амурского осетра со стерлядью, чем с атлантическим осетром. Полученные данные позволяют признать полезным использованием полноразмерных последовательностей 18S рДНК для биogeографических реконструкций и исследований филогенетических связей между видами осетровых рыб.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ДВО РАН «Амурская экспедиция» (проект Амур-7).

Список литературы

- Крыхтин М. Л., Горбач Э. И. 1994. Осетровые рыб Дальнего Востока. Экономическая жизнь Дальнего Востока. 1 (3) : 86—91.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 479 с.
- Челомина Г. Н., Рожкован К. В., Киселев К. В., Иванов С. А., Булгаков В. П. 2008. Множественность аллелей гена ядерной 18S рРНК осетров Амура: гены и псевдогены? Докл. РАН. 420 (2) : 257—260.
- Abouheif E., Zardoya R., Meyer A. 1998. Limitations of Metazoan 18S rRNA Sequence Data: Implications for Reconstructing a Phylogeny of the Animal Kingdom and Inferring the Reality of the Cambrian Explosion. J. Mol. Evol. 47 : 394—405.
- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Trans. Automat. Contr. AC-19 : 716—723.
- Artyukhin E. N. 1995. On biogeography and relationships within the Genus *Acipenser*. Sturgeon Quarterly. 3 : 6—8.
- Artyukhin E. N. 2006. Morphological phylogeny of the Order Acipenseriformes. J. Appl. Ichthyol. 22 : 66—69.
- Bemis W. E., Findeis E. K., Grande L. 1997. An overview of Acipenseriformes. Env. Biol. Fishes. 48 : 25—71.
- Birstein V. J., Doukakis P., DeSalle R. 2002. Molecular phylogeny of Acipenseridae: nonmonophyly of Scaphirhynchidae. Copeia. 2 : 287—301.
- Birstein V. J., Hanner R., DeSalle R. 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. Env. Biol. Fishes. 48 : 127—155.
- Buckler E. S., IV, Ippolito A., Holtsford T. P. 1997. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. Genetics. 145 : 821—832.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2006. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. Institute of Zool. Comp. and Mol. Pop. Gen. Lab. (CMPG). 145 p.
- Grunwald G., Stabile J., Waldman J. R., Gross R., Wirgin I. 2002. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. Mol. Ecol. 11 : 1885—1898.
- Hines H. M., Hunt J. H., O'Connor T. K., Gillespie J. J., Cameron S. A. 2007. Multigene phylogeny reveals eusociality evolved twice in vespid wasps. PNAS. 104 : 3295—3299.
- Hoerter J. A. H., Lambert M. N., Pereira M. J. B., Walter M. G. 2004. Dynamics inherent in helix 27 from *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. Biochemistry. 43 : 14 624—14 636.
- Krieger J. 2000. Molecular phylogenetics and evolution of the North American sturgeon and paddlefish (Order Acipenseriformes). Doc. diss., Ohio State Univ., Columbus, Ohio, USA.
- Krieger J., Fuerst P. A. 2002. Evidence of multiple alleles of the nuclear 18S ribosomal RNA gene in sturgeon. J. Appl. Ichthyol. 18 : 290—297.
- Krieger J., Fuerst P. A. 2004. Characterization of nuclear 18S rRNA gene sequence diversity and expression in an individual lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). J. Appl. Ichthyol. 20 : 433—439.
- Krieger J., Hett A. K., Fuerst P. A., Artyukhin E. N., Ludwig A. 2008. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. J. Appl. Ichthyol. 24 : 36—45.
- Krieger J., Hett A. K., Fuerst P. A., Birstein V. J., Ludwig A. 2006. Unusual intraindividual variation of the nuclear 18S rRNA gene is widespread within the Acipenseridae. J. Hered. 97 : 218—225.
- Luan Y.-X., Yao Y.-G., Xie R.-D., Yang Y.-M., Zhang Y.-P., Yin W.-Y. 2004. Analysis of 18S rRNA gene of *Octostigma sinensis* (Projapygoidea: Octostigmatidae) supports the monophyly of Diplura. Pedobiologia. 48 : 453—459.
- Ludwig A. 2008. Identification of Acipenseriform species in trade. J. Appl. Ichthyol. 24 : 2—19.
- Ludwig A., Belfiore N. M., Pitra C., Svirsky V., Jenneckens I. 2001. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus). Genetics. 158 : 1203—1215.
- Peng Z., Ludwig A., Wang D., Diogo R., Wei Q., He S. 2007. Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes). Mol. Phylogen. Evol. 42 : 854—862.
- Posada D., Crandall K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatic. 14 : 817—818.
- Ronquist F., Huelsenbeck J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19 : 1572—1574.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 10.1093/molbev/msm092.

Xia X., Xie Z., Kjer K. M. 2003. 18S Ribosomal RNA and Tetrapod Phylogeny. *Syst. Biol.* 52 : 283—295.

Yoon S. H., Kim W. 2006. 18S ribosomal DNA sequences provide insight into the phylogeny of patellogastropod limpets (Mollusca: Gastropoda). *Mol. Cells.* 23 : 64—71.

Zhang S.-M., Zhang Y.-P., Zheng X.-Z., Chen Y.-J., Deng H., Wang D.-J., Wei Q.-W., Zhang Y.-W., Nie L., Wu Q.-J. 2000. Molecular phylogenetic systematics of twelve species of Acipenseriformes based on mtDNA ND4L-ND4 gene sequence analysis. *Sci. China (Ser. C)*. 43 : 129—137.

Поступила 25 VII 2008

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF AMUR STURGEON *ACIPENSER SCHRENCKII* BRANDT,
1869 BASED ON 18S RDNA SEQUENCING DATA

K. V. Rozhkovan,¹ G. N. Chelomina,¹ S. A. Ivanov²

¹ Institute of Biology and Pedology Far East Branch of RAS and ² FGU Amurribvod, Vladivostok;
e-mail: ¹ chelomina@ibss.dvo.ru, ² amursturgeon@mail.ru

The analysis of phylogenetic relationships based on 18S rDNA sequences of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 with other acipenseriform species was performed in this study. Complete sequences (1746 b. p.) in seven individual clones of *A. schrenckii* 18S rRNA were determined. Mutation profile of Amur sturgeon 18S rDNA demonstrated high similarity with that of Lake Sturgeon *A. fulvescens*. Both presumably functional sequence and the specific mutation (insertion of adenine after position 658) of Amur sturgeon 18S rDNA were identified by structural-functional analyses. Phylogenetic reconstructions performed using different methods (NJ, MP, ML and Bayesian) support monophyly of the genus *Acipenser* and point to: 1) closer relationships Amur sturgeon with sterlet, than Baltic sturgeon, which is in agreement with Artyukhin's eco-morphological classification (Artyukhin, 1995, 2006); 2) sufficiently high differentiation between North-American (*A. fulvescens*) and Eurasian (*A. schrenckii*, *A. ruthenus* and *A. sturio*) sturgeons.

Key words: 18S rDNA, Amur sturgeon, phylogeny, Acipenseriformes.