

УДК 575.17+575.13:597.442

К ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОМУ ПОРТРЕТУ КАЛУГИ, *Acipenser dauricus* Georgi, 1775: АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ КОНТРОЛИРУЮЩЕГО РЕГИОНА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

© 2015 г. С. В. Шедько, И. Л. Мирошниченко, Г. А. Немкова, М. Б. Шедько

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

Поступила в редакцию 07.11.2014 г.

Исследована изменчивость *D*-петли мтДНК у калуги — эндемика р. Амур, находящегося в Красном списке МСОП (IUCN) в статусе вида с крайне высоким риском вымирания в природе (Critically Endangered). Секвенирование фрагмента (819 пн) *D*-петли у 122 калуг из низовьев р. Амур выявило 27 уникальных гаплотипов. Выборка имела сравнительно низкий уровень гаплотипического (0.927) и нуклеотидного (0.0044) разнообразия. Существенных отклонений от модели нейтрального ДНК-полиморфизма не обнаружено. Форма распределения попарных нуклеотидных различий, результаты проверки простых демографических моделей (внезапной экспансии и экспоненциального роста) в совокупности указали на произошедший в прошлом рост численности калуги. На протяжении последних 2–3 тыс. лет ее популяция, согласно байесовскому скайлайну, удвоилась. Число половозрелых самок в современной популяции калуги и оценка их долговременной эффективной численности (N_{ef}) находятся примерно на одном и том же уровне (~3 тыс. шт.), что подтверждает правомерность отнесения калуги к разряду видов, находящихся под угрозой исчезновения.

DOI: 10.7868/S0016675815080093

Калуга *Acipenser dauricus* Georgi, 1775 — один из самых крупных видов рыб не только среди осетровых (Acipenseridae), но и среди всех пресноводных рыб вообще. Калуга может достигать длины 5 м и более и веса свыше 1000 кг [1]. До недавнего времени рассматривалась в составе рода *Huso* [2]. Калуга, так же как и амурский осетр *A. schrenckii* Brandt, 1869, является эндемиком р. Амур. Ранее была широко распространена по всему бассейну Амура от верховьев до Амурского лимана, но сейчас более или менее обычна лишь в нижнем течении р. Амур [1]. Размножается исключительно в пресной воде — как правило, в русловой части Амура и его притоках. Калуга — ярко выраженный хищник и уже по достижении годовалого возраста переходит на питание преимущественно рыбой [3]. Основная масса калуг в теплое время года нагуливается в солоноватых водах Амурского лимана. Некоторая часть таких особей может выходить и за его пределы в воды с морской соленостью. Нагульные особи калуги обычны в северной части о-ва Сахалин, а по побережью Охотского моря доходят до Тауйской губы и рек западной Камчатки. Известны ее единичные находки на о-вах Хоккайдо и Хонсю (обзор: [4]).

Как и другие виды осетров, калуга издавна [5, 6] служила объектом легального и нелегального промысла. Интенсивность его была такова, что в 1986 г. калуга попала в Красный список Международного союза охраны природы (IUCN Red List of

Threatened Animals) как редкий (Rare) вид. В 1996 г. калуга получила новый статус — вид, находящийся в опасности (Endangered). С 2010 г. рассматривается уже как вид с крайне высоким риском вымирания (Critically Endangered) [7].

В задачу настоящей работы входил анализ изменчивости контролирующего региона (КР, или *D*-петля) митохондриальной ДНК (мтДНК) у калуги из низовьев р. Амур. Был получен своеобразный популяционно-генетический “портрет” *A. dauricus*, составленный на основе анализа выборок, взятых во время сезонных миграций калуги в той части видового ареала, где она наиболее многочисленна. Как и в случае с амурским осетром [8], этот “портрет” может оказаться полезным не только как основа мониторинга генетического разнообразия калуги, а также других природоохранных мероприятий, но и для дальнейших популяционно-генетических и эволюционных исследований этого, во многом уникального, вида осетровых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал по калуге был собран в ходе научно-контрольного лова, проведенного Хабаровским филиалом ТИПРО-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. ($n = 40$), августе—сентябре 2009 г. ($n = 29$), сентяб-

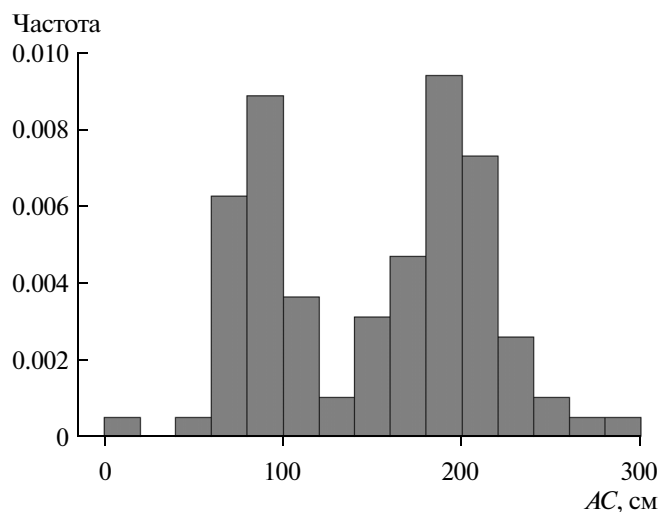


Рис. 1. Частотное распределение длины тела (AC , в см) у исследованных особей калуги.

ре 2010 г. ($n = 26$) и августе 2011 г. ($n = 6$). Кроме того, в анализ включен материал, полученный от одного экземпляра калуги, пойманного в Ульбанском заливе Охотского моря ($53^{\circ}32'$ с.ш. $137^{\circ}19'$ в.д.) в сентябре 2009 г., а также одного экземпляра калуги, отловленного в те же сроки в р. Тугур ($53^{\circ}45'$ с.ш. $136^{\circ}46'$ в.д.). Образцы тканей во всех случаях отбирались неинвазивным способом (срезался небольшой кусочек кожи по задней кромке грудного плавника, который затем помещался в 96%-ный спирт). Дополнительно в анализ был включен материал от 19 экз. замороженных калуг, изъятых сотрудниками МО МВД России “Николаевский-на-Амуре” (г. Николаевск-на-Амуре) в ходе оперативных работ в апреле 2014 г.

У 96 из 122 перечисленных экземпляров была измерена длина тела (расстояние от конца рыла до окончания средних лучей хвостового плавника, AC). Она варьировала в пределах 16–283 см и имела двухвершинное распределение (рис. 1). У 39 особей длина тела была менее 130 см (84.8 ± 20.7 , $\text{lim} = 16\text{--}127$), а у 57 особей была равна или более этого порога (193.8 ± 30.0 , $\text{lim} = 135\text{--}283$). Основываясь на закономерностях линейного роста калуги из Нижнего Амура [9], средний возраст особей в первой группе можно принять равным 6–8, а во второй – 27–28 годам.

Кроме калуг из природной популяции были проанализированы 14 сеголеток, взятых на Анойском рыбообразном заводе (Нанайский район Хабаровского края) в августе 2008 г. Ранее у 11 калуг из этой выборки была исследована структура кариотипа [10, 11].

Выделение, амплификация, секвенирование и сборка последовательностей контролирующего региона мтДНК проводились, как описано ранее [8], за исключением того, что для секвенирования

использовались праймеры собственной разработки – AHR6M (TCCCCACATGCCGAGAATCT) и DauFM (GGGGTAAGGGCAAAACCAGG).

Основные показатели, характеризующие изменчивость полученных последовательностей D -петли, определены с помощью набора утилит FaBox v. 1.4 [12] или в программе Arlequin v. 3.5.1.3 [13].

Филогенетическую сеть, демонстрирующую связи мтДНК-гаплотипов, строили с помощью программы Network v. 4.6.1.2 (Fluxus Technology Ltd.: www.fluxus-engineering.com) по методу редуцированных медиан (reduced median, RM-network) [14].

Проверку полиморфизма D -петли на селективную нейтральность осуществляли с помощью набора тестов, рассматривающих различные аспекты этой изменчивости: теста Ювенса–Воттерсена [15, 16], разработанного в рамках модели бесконечно большого числа аллелей, а также тестов, в основе которых лежит модель бесконечно большого числа сайтов – Таджимы [17], F_s -теста Фу [18] и Келли [19]. Тест Ювенса–Воттерсена выполнен в программе Arlequin, остальные – в программе DnaSAM [20].

Анализ распределения попарных нуклеотидных различий в выборке мтДНК-гаплотипов калуги, а также проверку модели внезапной одноступенчатой демографической экспансии [21] проводили с помощью программы Arlequin.

Параметры модели экспоненциального роста численности популяции (θ – популяционный параметр $2N_{ef}\mu$, где N_{ef} – эффективная численность самок в популяции, а μ – скорость нуклеотидных замещений/сайт/поколение; g – показатель скорости роста популяции) определяли двумя способами – с использованием метода максимального правдоподобия [22] и байесовского подхода [23] с помощью соответственно программ Fluctuate v. 1.4 [22] и BEAST v. 1.7.5 [24] при тех же условиях, что и ранее [8].

Анализ демографической истории популяции калуги методом байесовского скайлайна [25] проводили с помощью программы BEAST в 40 млн циклов так, как описано ранее [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявленная у исследованных особей калуги структура контролирующего региона мтДНК соответствовала той, что была установлена для этого вида ранее [26, 27]. Часть D -петли, прилегающая к гену тРНК-Pro (3'-конец), состоит из блока tandemно организованных 78-пн повторов, каждый из которых содержит $TAS II$ (termination-associated sequence) элемент на его 5'-конце. За ним следует одна неполная (50 пн) копия, у которой отсутствует часть повтора, несущая $TAS II$ элемент. Далее располагается основная часть D -петли.

	11123333334455556777	
	234455615972377891811250237	
	1950326632923145514302808205	
	СТСТТТТТСТGACAAAАСТAGGCTGCG	<i>n</i>
DAU1	..T..C..T.....C.A.....	1
DAU2	T....C.....A.....	1
DAU3	.C...C.....A.....	1
DAU4C.....A.T..GG.....	2
DAU5C...A....GGT.....	1
DAU6A....GG.....	12
DAU7A....GG.-.....	6
DAU8T..G.G..G.....	7
DAU9G.G..G.....	14
DAU10AA.....	13
DAU11AA...T.	1
DAU12G..T...T.A..	1
DAU13G.....	7
DAU14C...G.G.....	4
DAU15G.G.....	1
DAU16A.....A	4
DAU17A.....A...A	3
DAU18	..C.....A.....A...A	1
DAU19G.....TG...	1
DAU20A	3
DAU21	16
DAU22G.....	3
DAU23G.....T....	15
DAU24	..C.....G.....T....	1
DAU25C.....G.....T....	1
DAU26C...A....GG.....	1
DAU27C.....	1

Рис. 2. Вариабельные позиции в фрагменте *D*-петли мтДНК калуги (нумерация произведена относительно первой позиции последней полной копии 78-нуклеотидного повтора), гаплотипы и их встречаемость.

Проанализированный фрагмент *D*-петли включал в себя последнюю полную, а также усеченную копию повторяющегося элемента (128 пн в сумме), а также оставшуюся часть *D*-петли (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 *D*-петли составила 819 пн.

Всего у 122 образцов калуги, полученных из естественных условий, было выявлено 27 различных вариантов КР (рис. 2), различавшихся либо точечными нуклеотидными замещениями и делецией, либо (пара DAU6–7) только делецией.

У особей калуги, взятых на Анюйском рыбо-разводном заводе (*n* = 14) и подвергнутых ранее

[10, 11] кариотипированию, было выявлено два гаплотипа: DAU7 (*n* = 6) и DAU21 (*n* = 8). То есть эти особи были потомками как минимум двух различных самок. Укажем на то, что по основным характеристикам кариотипов эти особи были однородны [10, 11].

Вариабельные позиции в КР мтДНК калуги распределены более или менее равномерно (рис. 3), за исключением двух участков, где частота точечных нуклеотидных замещений выглядела повышенной (позиции 1–80 и 361–400). Согласно точному критерию Фишера, распределения вариабельных позиций в КР мтДНК калуги и амурского осетра не различались (*P* = 0.292).

Сравнение выборок калуги, взятых в разные сезоны или разные годы, с помощью точного не-

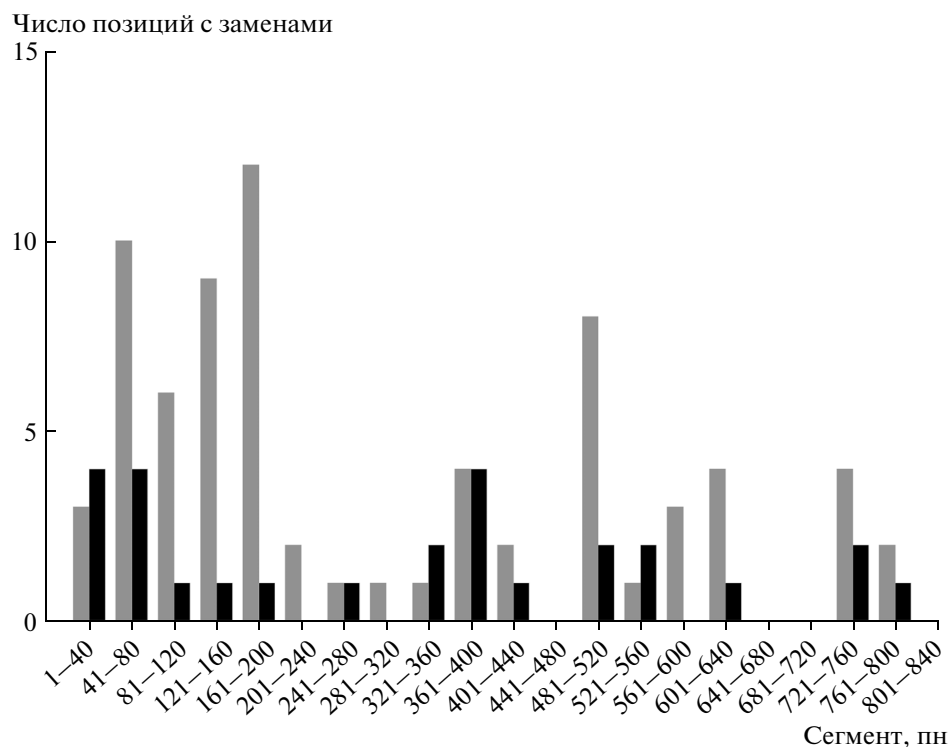


Рис. 3. Распределение вариабельных позиций (ось ординат) по 40-нуклеотидным сегментам исследованного фрагмента *D*-петли мтДНК калуги (настоящая работа, черные столбики) и амурского осетра ([8], серые столбики).

параметрического теста популяционной дифференциации [28], *F*-статистики Райта или дисперсионного анализа молекулярной изменчивости [29] существенных различий не выявило ($P > 0.05$ во всех вариантах группирования).

Сравнение же двух размерных групп калуги (с длиной тела 16–127 см и 135–283 см – см. рис. 1) дало следующую картину. Согласно точному непараметрическому тесту популяционной дифференциации по частотам гаплотипов, различия существенны на пограничном уровне значимости ($P = 0.036$). Из рис. 4 можно видеть, что основной вклад в дифференциацию размерных групп вносят гаплотипы DAU6–10 и DAU23. В то же время по ординарной *F*-статистике Райта или исходя из результатов дисперсионного анализа молекулярной изменчивости размерные группы оказались однородными: $F_{ST} = 0.011$ ($P = 0.098$) и $\Phi_{ST} = 0.002$ ($P = 0.334$) соответственно.

Любопытно, что эти две размерные группы отличались и по уровню гаплотипического разнообразия (H) – 0.938 ± 0.019 и 0.910 ± 0.016 соответственно. Это различие оказалось статистически незначимым ($Z_{\text{тест}} = 1.13$, $P = 0.129$), что, похоже, обусловлено сравнительно высокими значениями стандартного отклонения H , которые, вероятно, вызваны небольшими объемами выборок (39 и 57 соответственно). Если каждое из

отклонений искусственно уменьшить до 0.01 (что возможно при удвоении размера выборок), то в этом случае различие окажется значимым – $Z_{\text{тест}} = 1.99$, $P = 0.023$.

Исследованная выборка калуги характеризовалась в целом низким уровнем изменчивости последовательностей КР мтДНК, оцениваемым как по числу гаплотипов и их разнообразию (виртуальной гетерозиготности), так и по нуклеотидному разнообразию, а также другим показателям (таблица, № 2–11).

Три из четырех задействованных тестов нейтральности (таблица, № 12–14) не выявили существенных отклонений и показали, что популяция калуги находится в равновесном состоянии, когда приток селективно нейтральных мутаций в популяцию уравновешивается их вымыванием вследствие действия дрейфа генов. *F_s*-тест [18] выявил отклонения от модели нейтрального ДНК-полиморфизма, но *p*-значение для этого чрезвычайно либерального теста оказалось довольно велико – 0.016 (обычно при наличии каких-либо отклонений оно составляет менее одной тысячной).

Распределение нуклеотидных различий между парами мтДНК-гаплотипов оказалось одновышинным (рис. 5). Данная форма может свидетельствовать о недавнем быстром росте числен-

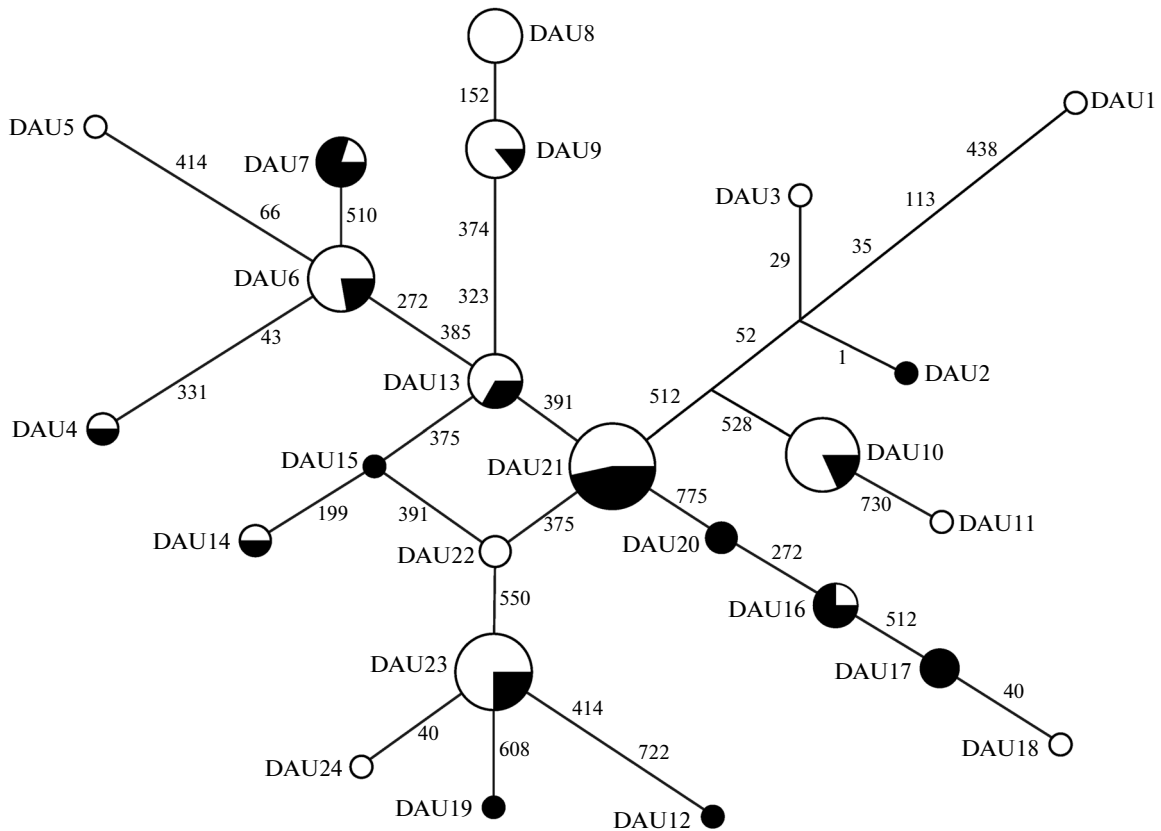


Рис. 4. Филогенетическая сеть (RM-network [14]) мтДНК-гаплотипов, найденных у калуг с длиной тела менее (черные секторы) или более (белые) условного порога в 130 см. Цифры у междоузлий – варьирующие нуклеотидные позиции (см. рис. 2). Размер узла пропорционален представленности (от 1 до 15) того или иного гаплотипа среди 96 особей калуги с учтенной длиной тела.

ности популяции [30]. В соответствии с этим находятся результаты тестирования модели внезапной ступенчатой демографической экспансии [21], показавшие ее правомерность ($P = 0.188$). Согласно этой модели, численность самок в популяции калуги в недавнем прошлом ($\tau = 4.28$) увеличилась в единицах θ ($2N_{ef}v$, где N_{ef} – эффективная численность самок в популяции, v – скорость нуклеотидных замещений/нуклеон/поколение) с 0 до 27.

Состоятельной оказалась и модель экспоненциального роста численности популяции, параметры которой рассчитывались двумя способами – методом максимального правдоподобия и с помощью байесовского анализа (таблица). В обоих случаях границы доверительного интервала для скорости роста (g) не включали в себя нулевое значение¹.

Байесовский скайлайн (рис. 6) показал, что экспоненциальный рост численности (выражен-

ной в данном случае в виде произведения эффективной численности самок в популяции на продолжительность поколения – $N_{ef}T$) начался около 3–2 тыс. лет назад. За этот период времени чис-

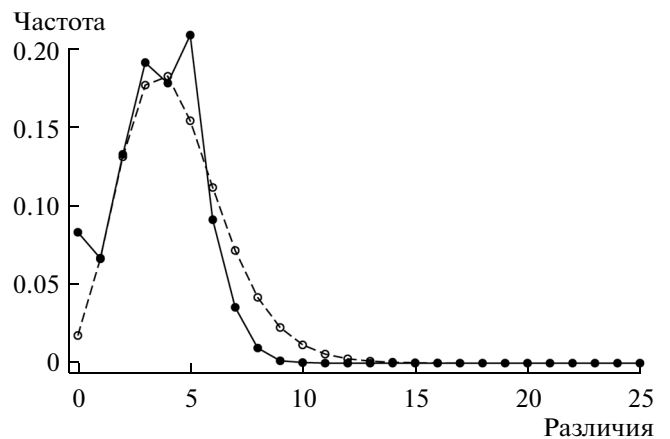


Рис. 5. Наблюдаемое и ожидаемое (в случае демографической экспансии, пунктир) частотное распределение попарных нуклеотидных различий в выборке мтДНК-гаплотипов калуги.

¹ При использовании метода максимального правдоподобия границы доверительного интервала были оценены приблизительно – с помощью утроенного стандартного отклонения.

Показатели, характеризующие изменчивость D -петли в суммарной выборке калуги ($n = 122$), взятой из естественных условий (№ 1–11); результаты проверки этой изменчивости на нейтральность (№ 12–15); результаты тестирования модели внезапной ступенчатой демографической экспансии [21] (№ 16, 17); а также основные параметры модели экспоненциального роста численности популяции, рассчитанные при использовании метода максимального правдоподобия (№ 18, 19) [22] или байесовского подхода (№ 20, 21) [23]

№	Параметр	Значение (± стандартное отклонение)
1	L	819
2	S	27
3	PI	28
4	si	9
5	h	27
6	H	0.927 ± 0.009
7	θ_h (95% CI)	10.4 (6.6–16.2)
8	θ_H	11.23 ± 1.53
9	θ_S	5.02 ± 1.50
10	θ_π	3.57 ± 2.03
11	θ_c (95% CI)	0.008 (0.006–0.016)
12	$EW(P)$	0.080 (0.470)
13	$D(P)$	–0.85 (0.206)
14	$Z_{nS}(P)$	0.04 (0.070)
15	$F_s(P)$	–9.02 (0.016)
16	τ (95% CI)	4.28 (1.88–5.87)
17	$SSD(P)$	0.00537 (0.188)
18	θ_g	0.017 ± 0.003
19	g	818.9 ± 214.4
20	θ_g (95% HPD)	0.017 (0.008–0.032)
21	g (95% HPD)	970.3 (57.16–2319.7)

Примечание. L – длина массива выравненных последовательностей (пн); S – число позиций с нуклеотидными заменами; PI – общее число переменных позиций (S плюс индели); si – число синглтонов (сайтов с нуклеотидными заменами, встречающихся в выборке лишь у единичных образцов); h – число гаплотипов; H – гаплотипическое 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 гаплотипов (h) в выборке, их разнообразия (H), числа сегрегирующих сайтов (S) или нуклеотидного разнообразия (π); EW – тест Ювенса–Воттерсена [15, 16]; D – тест Таджимы [17]; Z_{nS} – тест Келли [19]; F_s – F_s -тест Фу [18]; τ – 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; θ_c/g – популяционный параметр $2N_{ef}\mu$ (N_{ef} – эффективная численность самок в популяции, μ – скорость нуклеотидных замещений/сайт/поколение), рассчитанный на основе анализа коалесценции гаплотипов в условиях численно стабильной (θ_c) или растущей согласно экспоненциальной модели (θ_g) популяции; g – показатель скорости роста популяции; 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).

ленность самок в популяции калуги выросла в 2 раза. До этого, в интервале времени 27–3 тыс. лет назад, она оставалась примерно на одном и том же уровне.

Если за продолжительность одного поколения калуги принять средний возраст половозрелых самок (около 32 лет [31]), тогда долговременную эффективную численность самок (N_{ef}) в популяции калуги можно выразить в абсолютных цифрах: $89832/32 = 2807$ (563–18051) шт. – в последнее время; $40119/32 = 1254$ (499–3376) шт. – около 3 тыс. лет назад.

ОБСУЖДЕНИЕ

Калуга и амурский осетр обитают в одном речном бассейне и живут бок о бок практически на всем протяжении своего жизненного цикла². Поэтому представлялось интересным сравнить этих осетров через призму данных, полученных при анализе изменчивости у них одного и того же участка митохондриального генома.

При сходном размере выборок у калуги, по сравнению с амурским осетром [8] ($n = 122$ против $n = 112$), выявлено меньше позиций с нуклеотидными заменами (27 против 73), меньше уникальных гаплотипов (27 против 73) и обнаружен более низкий уровень гаплотипического разнообразия (0.927 ± 0.009 против 0.976 ± 0.009 ; $Z_{\text{тест}} = 3.96$, $P < 0.001$).

Рассчитанные различными способами значения популяционного параметра θ у калуги (таблица, № 7–11, 18, 20) в 2.7–8.6 раз ниже, чем у амурского осетра [8]. Этот показатель отражает генетическое разнообразие в популяции, складывающееся, в идеале, как баланс между появлением в популяции мутаций и их потерей в результате генетического дрейфа, обратно пропорционального эффективному размеру этой популяции. То есть если принять одинаковую скорость мутирования в КР мтДНК у этих осетров, то можно утверждать, что долговременная эффективная численность самок калуги примерно во столько же (~3–9.5, с поправкой на разную продолжительность поколения) раз меньше таковой амурского осетра.

Тот же вывод следует из сравнения байесовских скайлайнов – на последнем временном отрезке N_{ef} калуги (около 2800 шт.) примерно в 8 раз меньше N_{ef} амурского осетра (около 23000 шт. [8]).

Эти оценки находятся в грубом согласии с результатами расчетов общей численности калуги и амурского осетра, произведенных на основе кон-

² За исключением этапа нагула, когда калуга в массе выходит за пределы солоноватого лимана Амура в воды с морской соленостью, а особи амурского осетра – редко.

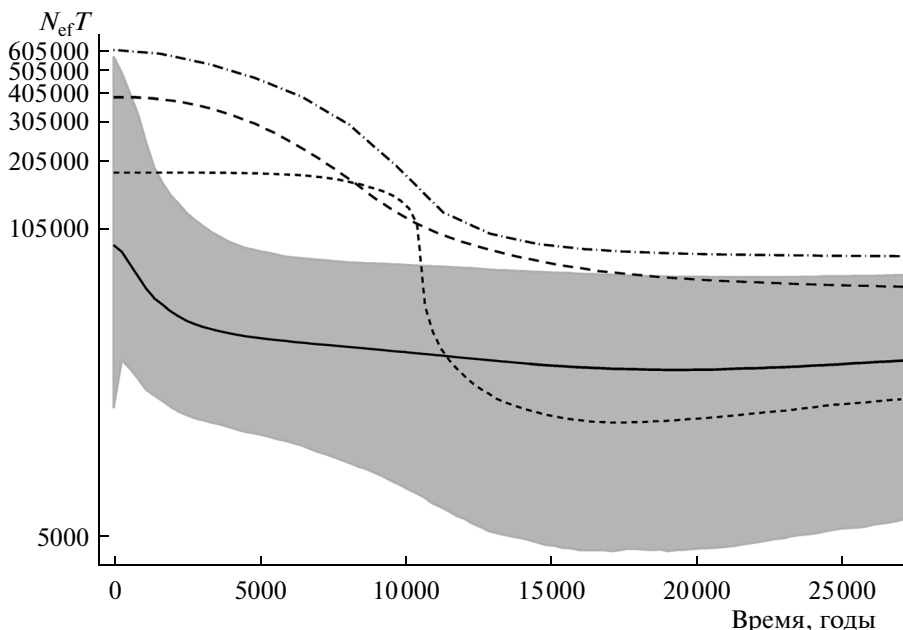


Рис. 6. Байесовская контурная диаграмма (скайлайн), построенная для выборки последовательностей контролирующего региона мтДНК калуги и отражающая изменение показателя $N_{ef}T$ (произведения эффективной численности самок в популяции на продолжительность поколения, шкала ординат) во времени (шкала абсцисс, в годах, обратный отсчет). Сплошная линия – медиана, а затемненный участок – 95%-ный интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок показателя $N_{ef}T$. Пунктир – медианные линии, полученные для VG и SM мтДНК-гаплогрупп амурского осетра (короткий и длинный пунктир соответственно), а также его суммарной выборки (пунктир с точками) (по: [8]).

трольных уловов. По данным, полученным с использованием метода площадей, численность калуги примерно в 4 раза ниже таковой амурского осетра [1].

Примерно такое же их соотношение было, судя по косвенным данным, и в прошлом. Известно [5], что в 1891 г. было добыто примерно по 600 т калуги и амурского осетра. Судя по статистике 1908–1909 гг. относительно веса осетров на рынках Хабаровского объезда, калуга из уловов была в среднем в 4.7 раза тяжелее амурского осетра (63 против 13.5 фунтов [6]). Исходя из равных объемов вылова этих видов в 1891 г. можно заключить, что численность калуги в те годы была примерно в 4.7 раз ниже, чем численность амурского осетра.

Тот факт, что у калуги не было обнаружено филогенетически хорошо обособленных клад мтДНК-гаплотипов, а у амурского осетра такие клады найдены [8], также может быть связан с разным размером их популяций – в большой популяции и само формирование, и сохранение таких клад более вероятно [32].

В отличие от амурского осетра – типичного бентофага, калуга – хищник, занимающий вершину трофической пирамиды в экосистеме

р. Амур. Численность хищников верхнего уровня (top predator) не может быть высокой. Этим скорее всего и определяется различная численность этих видов осетров.

Другое различие калуги и амурского осетра состоит в неодинаковой демографической истории их популяций.

У амурского осетра фаза экспоненциального роста численности началась около 13–12 тыс. лет назад (см. рис. 6). Наиболее быстро увеличивалась численность VG-гаплогруппы, которая уже 9–8 тыс. лет назад вышла на плато. Таким образом, рост численности VG-гаплогруппы в целом можно охарактеризовать как логистический. Похожая, но менее выраженная картина логистического роста наблюдается и при рассмотрении SM-гаплогруппы мтДНК-гаплотипов амурского осетра.

У калуги фаза экспоненциального роста началась, во-первых, намного позже (около 3–2 тыс. лет назад) и, во-вторых, сам масштаб этих изменений оказался не столь значительным. Последним, кстати, и можно объяснить то, что тесты Таджи-мы и Келли, чувствительные, как известно [17, 19], к демографической экспансии, в данном случае на произошедший рост не среагировали. При-

чина описанного различия калуги и амурского осетра по времени демографической экспансии не ясна. Не исключено, что оно также может быть вызвано их разным положением в трофической пирамиде экосистемы Амура. Еще одно различие калуги и амурского осетра заключается в неодинаковом соотношении у них текущей численности половозрелых самок (N_c) и их долговременной эффективной численности (N_{ef}). У амурского осетра, как и у китайского осетра *A. sinensis* [33], N_c заметно меньше N_{ef} (~7333 против ~23000 шт. [8]). У калуги складывается несколько иная картина.

По данным контрольных уловов [1], в конце 80-х годов в Нижнем Амуре насчитывалось около 5000 половозрелых калуг. Примерно такое же их количество было в Среднем Амуре [1]. Всего, таким образом, общее число половозрелых калуг могло составлять около 10000 шт. Тогда, при соотношении полов самки : самцы ~ 1 : 2 [34, 35], примерно одна треть из них (3333 шт.) могла быть представлена половозрелыми самками. С другой стороны, согласно байесовскому скайлайну (см. выше), долговременная эффективная численность самок калуги на последнем отрезке времени равна примерно 2800 шт. То есть у калуги N_c и N_{ef} — вполне сопоставимые величины.

Стоит отметить, что у большинства исследованных на этот счет видов позвоночных животных долговременная эффективная численность самок, оцениваемая по эмпирическим мтДНК-данным, обычно более чем на порядок меньше текущего размера их популяции [36]. Осетры, по видимому, относятся к тем видам, у которых наблюдается либо примерный паритет в значении этих показателей, либо обратное отношение, когда N_{ef} в разы выше N_c (как у некоторых видов китов [37]). Низкая, в сравнении с ожидаемым для данного уровня генетического разнообразия, текущая численность популяции объясняется ее недавним резким сокращением в результате, к примеру, чрезмерно интенсивного промысла [37] или изменения среды обитания [33]. В случае осетров из р. Амур негативное воздействие промысла на их численность могло быть определяющим. С этих позиций разное соотношение N_{ef} и N_c у калуги и амурского осетра можно объяснить тем, что падение N_c у калуги было не таким глубоким, как у амурского осетра. В связи с этим обращает на себя внимание сравнительно низкое гаплотипическое разнообразие, обнаруженное у калуги. Вероятно, при в целом невысокой долговременной эффективной численности калуги, текущее сжатие ее популяции уже начало сказываться на частотном спектре мтДНК-гаплотипов. У амурского осетра, у которого N_{ef} практически на порядок

выше, гаплотипическое разнообразие, судя по всему, все еще остается на прежнем уровне.

В завершение укажем на то, что найденные различия в генетическом разнообразии двух размерных группировок калуги могут сигнализировать о наличии у нее отдельных популяций. В принципе, такая картина может возникать тогда, когда молодежь из разных популяций перемешивается в местах нагула (низовья Амура — как раз такое место), а взрослые особи из разных популяций придерживаются своих территорий. Для того, чтобы убедиться в том, что выявленные различия размерных группировок калуги по спектру гаплотипов не случайны, необходимо привлечение дополнительного материала.

Авторы глубоко признательны Г.В. Новомодному, В.Н. Кошелеву и Т.В. Евтешиной (ФГУП ХФТИНРО, г. Хабаровск) за предоставленную возможность сбора материала, помощь, а также некоторые переданные в наше распоряжение образцы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Дальневосточного отделения РАН (гранты № 12-I-П30-04 и № 15-I-6-079).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Vasil'eva E.D., Vasil'ev V.P., Shedko S.V., Novomodny G.V. The revision of the validity of genus *Huso* (Acipenseridae) based on recent morphological and genetic data with particular reference to the kaluga *H. dauricus* // J. Ichthyol. 2009. V. 49. № 10. P. 861–867.
3. Никольский Г.В. Рыбы бассейна Амура (Итоги Амурской ихтиологической экспедиции, 1945–1949 гг.). М: Изд-во АН СССР, 1956. 551 с.
4. Кошелев В.Н., Черниенко Э.П., Балушкин В.А. и др. Современные данные о распределении и биологии калуги *Acipenser dauricus* и амурского осетра *Acipenser schrenckii* в водах Охотского и Японского морей // Изв. ТИНРО. 2012. Т. 169. С. 3–11.
5. Крюков Н.А. Некоторые данные о положении рыболовства в Приамурском крае // Зап. Приамур. Отд. Импер. Рус. геогр. о-ва. 1894. Т. 1. Вып. 1. С. 1–87.
6. Солдатов В.К. Исследования осетровых Амура // Материалы к познанию русского рыболовства. 1915. Т. 3. Вып. 12. С. 96–415.
7. Ruban G., Qiwei W. *Huso dauricus* // IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. 2014. www.iucnredlist.org. Downloaded on 03 June 2014.
8. Шедько С.В., Мирошниченко И.Л., Немкова Г.А. и др. Изменчивость митохондриальной ДНК, ис-

- торическая демография и популяционная структура амурского осетра, *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 // Генетика. 2015. Т. 51. № 2. С. 200–216.
9. Кошелев В.Н., Михеев П.Б., Шмигирюлов А.П. Возраст и рост калуги *Acipenser dauricus* из устья Амура и его лимана // Вопр. ихтиологии. 2014. Т. 54. № 2. С. 188–199.
 10. Васильев В.П., Васильева Е.Д., Шедько С.В., Новомодный Г.В. Уровень плоидности калуги *Huso dauricus* и сахалинского осетра *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae, Pisces) // Докл. Акад. наук. 2009. Т. 426. № 2. С. 275–278.
 11. 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.
 12. Villesen P. FaBox: an online toolbox for fasta sequences // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. № 6. P. 965–968.
 13. 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.
 14. Bandelt H.J., Forster P., Sykes B.C., Richards M.B. Mitochondrial portraits of human populations using median networks // Genetics. 1995. V. 141. № 2. P. 743–753.
 15. Ewens W.J. The sampling theory of selectively neutral alleles // Theor. Popul. Biol. 1972. V. 3. № 1. P. 87–112.
 16. Watterson G.A. The homozygosity test of neutrality // Genetics. 1978. V. 88. № 2. P. 405–417.
 17. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Genetics. 1989. V. 123. № 3. P. 585–595.
 18. Fu Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // Genetics. 1997. V. 147. № 2. P. 915–925.
 19. Kelly J.K. A test of neutrality based on interlocus associations // Genetics. 1997. V. 146. № 3. P. 1197–1206.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Raymond M., Rousset F. An exact test for population differentiation // Evolution. 1995. V. 49. № 6. P. 1280–1283.
 29. 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.
 30. 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.
 31. Кошелев В.Н., Рубан Г.И. Созревание и плодовитость калуги *Acipenser dauricus* // Вопр. ихтиологии. 2012. Т. 52. № 5. С. 562–570.
 32. Hein J., Schierup M.H., Wiuf C. Gene Genealogies, Variation and Evolution: A Primer in Coalescent Theory. USA: Oxford Univ. Press, 2005. 276 p.
 33. 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.
 34. 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.
 35. 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. Suppl. 1. P. 44–52.
 36. Avise J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press, 2000. 447 p.
 37. Roman J., Palumbi S.R. Whales before whaling in the North Atlantic // Science. 2003. V. 301. № 5632. P. 508–510.

On the Population Genetic Portrait of Kaluga, *Acipenser dauricus* Georgi, 1775: Analysis of Sequence Variation in the Mitochondrial DNA Control Region

S. V. Shedko, I. L. Miroschnichenko, G. A. Nemkova, and M. B. Shedko

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

The variability of the mtDNA D-loop was examined in kaluga endemic to the Amur River, which is classified as critically endangered by the IUCN Red List of Threatened species. Sequencing of the D-loop fragment (819 bp) in 122 kaluga specimens collected in Lower Amur revealed 27 unique genotypes. The sample was characterized by a relatively low level of haplotypic (0.927) and nucleotide (0.0044) diversity. No considerable deviations from the neutral mutation model of DNA polymorphism were observed. Overall, the mismatch distribution patterns and the results of testing of simple demographic models (sudden demographic expansion and exponential population growth) pointed to a past increase in the number of kaluga sturgeons. According to the Bayesian skyline, the kaluga population doubled over the last two to three thousand years. The number of mature females in the modern kaluga population and the assessment of their long-term effective population size (N_{ef}) are roughly at the same level (about three thousand individuals), which confirms the validity of assigning kaluga to the category of species on the brink of extinction.

English translation of the paper is published in “Russian J. Genetics” (2015, vol. 51, no. 9), www.maik.ru.