

УДК 599.735.31:575(4–11)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЛАГОРОДНОГО ОЛЕНЯ, *CERVUS ELAPHUS* (CERVIDAE), ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ

М. В. Кузнецова¹, А. М. Волох², В. И. Домнич³,
В. Е. Тышкевич⁴, А. А. Данилкин¹

¹ Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН,
Ленинский пр., 33, Москва, 119071 Россия
E-mail: molecol@sevin.ru

² Таврическая государственная агротехническая академия,
пр. Б. Хмельницкого, 18, Мелитополь, 72312 Украина

³ Запорожский государственный университет,
ул. Жуковского, 66, Запорожье, 69063 Украина

⁴ Институт зоологии НАН РБ, ул. Академическая, 27, Минск, 2220072 Беларусь

Принято 12 сентября 2007

Молекулярно-генетическое исследование благородного оленя, *Cervus elaphus* (Cervidae), Восточной Европы. Кузнецова М. В., Волох А. М., Домнич В. И., Тышкевич В. Е., Данилкин А. А. — Изучен полиморфизм нуклеотидной последовательности фрагмента митохондриального гена цитохрома b (410 н. п.) выборки образцов благородного оленя (36 экз.) с территории Украины, Республики Беларусь и России. В анализ также включены 30 последовательностей из международной базы данных GenBank. Выявлено 29 уникальных гаплотипов, 16 из которых входят в «европейскую» кладу. Обнаружено, что часть образцов из Украины содержит мтДНК «алтайского» типа, полученную в результате гибридизации европейских и азиатских оленей. Проведенные молекулярно-генетические исследования позволяют также усомниться в правомерности выделения карпатского (*Cervus elaphus montanus*), крымского (*C. e. brauneri*) и кавказского (*C. e. maral*) подвидов благородного оленя.

Ключевые слова: *Cervus elaphus*, филогения, цитохром b.

Molecular Diversity of the Red Deer, *Cervus elaphus* (Cervidae), Inhabiting East Europe. Kuznetsova M. V., Volokh A. M., Domnich V. I., Tyshkevitch V. E., Danilkin A. A. — We examined the nucleotide polymorphism of *Cervus elaphus* cytochrome b fragment (410 b. p.) in 36 individuals. We collected samples from Ukraine, Belorussia, and Russia. We also included in our analysis 30 sequences from GenBank. Computer analysis found out 29 haplotypes, 16 of which grouped with the “European clade” of the red deer. Our results demonstrate that a part of Ukrainian red deer contains a “maral” mtDNA. This fact could be a result of hybridization between European and Asian red deer during XX century. Our data do not support the subspecies status for *Cervus elaphus montanus*, *C. e. brauneri* and *C. e. maral*.

Key words: *Cervus elaphus*, phylogeny, cytochrome b.

Введение

Благородный олень, *Cervus elaphus* Linnaeus, наиболее многочисленный и широко распространенный представитель рода. На протяжении обширного ареала систематики выделяют более 60 его рас, в Европе — до 11 (Гептнер, Цалкин, 1947; Ellerman, Morrison-Scott, 1951; Lowe, Gardiner, 1974; Grubb, 1990; Grubb, Gardner, 1998; Данилкин, 1999; Groves, 2006). В последнее время в Западной Европе чаще признают лишь один подвид — *C. e. elaphus*, в Восточной Европе — еще и карпатскую (*C. e. montanus*), крымскую (*C. e. brauneri*) и кавказскую (*C. e. maral*) формы. Карпатского оленя, однако, нередко относят к номинативному подвиду *C. e. elaphus*. Происхождение крымского оленя неясно (Гептнер, Цалкин, 1947; Бибикова, 1975), и его подвидовой статус сомнителен. Кавказский олень отличается от европейских сородичей крупными размерами тела и черепа, и по этим параметрам он близок к представителям азиатской (мараловой) группы, из которой на территории России известны

два подвида: марал (*C. e. sibiricus*) и изюбрь (*C. e. xanthopygus*). В XX в. в охотничьи угодья Восточной Европы интродуцировали более 4 тыс. особей европейского оленя из разных рас и около 800 маралов (Данилкин, 1999). На Украине в природу выпущен также гибридный асканийский олень, для формирования которого использованы 12 особей марала, 5 – европейского оленя, самец и самка крымского оленя, два самца изюбря, а также самец и самка североамериканского вапити. Не исключено, что в образовании этого сложного гибрида мог участвовать и пятнистый олень (Аверин, 1923; Карцев, 1928; Салганский и др., 1963; Салганский, 1967; Треус, 1968).

Генофонд благородного оленя, обитающего на территории бывшего СССР, практически не изучен, неясны и генетические последствия интродукции и реинтродукции разных форм вида в Восточной Европе, что и стало целью нашей работы.

Материал и методы

В 2000–2006 гг. нами собраны 36 образцов тканей благородного оленя на территории России ($n = 23$), Украины ($n = 11$) и Республики Беларусь ($n = 2$). Выделение ДНК проводили с помощью набора реактивов Diatom® DNA Prep («Изоген», Россия). Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали специфические для митохондриального гена цитохрома b праймеры: GLU и CB2 (Kocher et al., 1989), что позволяло получить продукт реакции длиной около 600 н. п. Режим амплификации: 94°C – 3 мин; 94°C – 30 с; 62°C – 30 с; 72°C – 60 с (35 циклов); достройка 72°C – 6 мин. Очистку продуктов ПЦР-реакции осуществляли смесью раствора уксуснокислого аммония и этилового спирта с последующей промывкой 70%-ным раствором охлажденного этилового спирта. Первичные нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК определяли с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Полученные последовательности были выровнены с помощью программы BioEdit (Hall, 1999) и далее – вручную. Общая длина полученного фрагмента митохондриального гена цитохрома b составила 410 н. п. В выравнивание включены также последовательности, опубликованные другими авторами (Ludt et al., 2004). Общее количество проанализированных последовательностей 65. В качестве внешней группы выбрана последовательность европейской лани – *Dama dama*.

Статистическую обработку полученных результатов (оценку гаплотипического и нуклеотидного разнообразия) проводили с помощью программы MEGA2. Для построения филогенетического дерева (рис. 1) использовали программу Metapiga (Lemmon, Milinkovitch, 2002), реконструирующую филогенетические отношения по методу максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML). Медианная сеть гаплотипов (рис. 2) построена в программе Network 4.111 (Fluxus Technology Ltd., 2005). Расстояние на схеме соответствует количеству мутационных шагов между гаплотипами. Каждый из них отмечен отдельным кружком, размер которого отражает количество образцов, у которых был обнаружен данный гаплотип. Маленькие ромбики – гипотетические переходные гаплотипы, реконструированные с помощью программного алгоритма.

Результаты и обсуждение

Нуклеотидная изменчивость исследованной выборки благородного оленя оказалась в целом весьма высокой (3,6%) по сравнению с другими видами оленей: 0,2–1,1% у *Capreolus capreolus* (Wiehler, Tiedemann, 1998; Randi et al., 1998); 1,4–2,5% у *Cervus nippon* (Tamate, Tsuchiya, 1995) и 2,3% у *Rangifer tarandus* (Cronin et al., 2006).

На полученном филогенетическом древе (рис. 1) обособлены два больших кластера – «европейский» и «азиатский». В первый входят все европейские олени, включая кавказских, а также некоторые асканийские гибридные олени с острова Бирючий и Обиточной косы (Азовское море). Базальное положение в этом кластере занимают особи из Таджикистана (*C. e. bactrianus*) и с северо-запада Китая, что указывает на генетическую близость бухарского оленя к европейской группе. Обособленное место занял и 1 экз. из Северной Осетии. Остальные образцы распределены по четырем кладам, причем три из них объединились вместе. Самая крупная клада включает в себя особей из Испании, Франции, Германии, Польши, Республики Беларусь, Калининградской области России, Норвегии, Туниса (сюда благородные олени завезены из Южной Европы), а также 3 особи из Крыма. В другие клады вошли олени из Болгарии, Румынии, Австрии, Венгрии, Турции, из горных районов Украины (Крыма и Карпат), с юга России (Белгородской обл., Краснодарского края и Дагестана), асканийские гибридные особи и экземпляры с Северного Кавказа (Карачаево-Черкесии и Северной Осетии).

Особо отметим, что ни крымские, ни карпатские, ни кавказские олени не образовали на филогенетическом древе обособленные клады, что подтвердило бы их подвидовой статус.

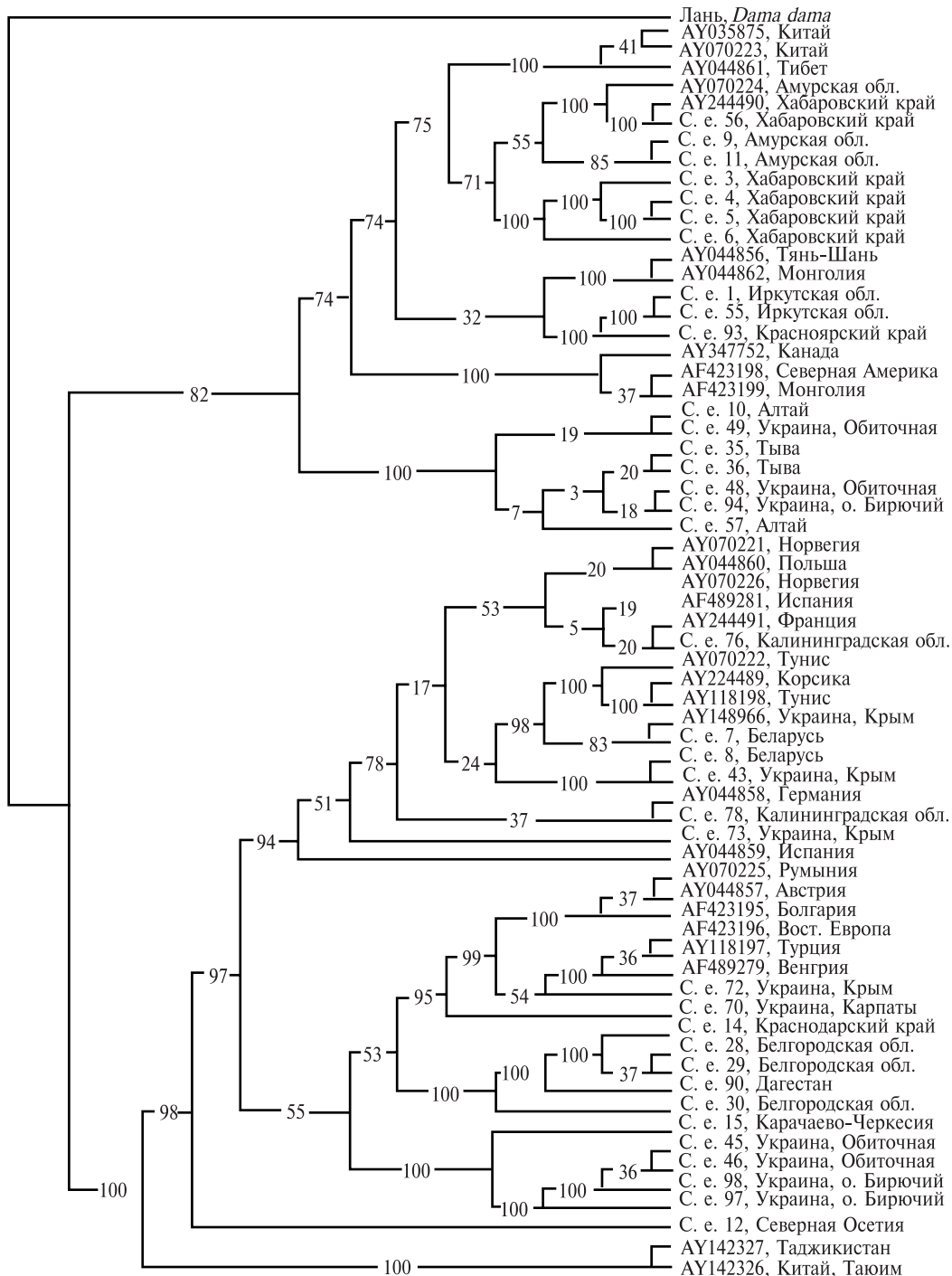


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное программой MetaPiga по алгоритму максимального правдоподобия (maximum likelihood). Возле каждого узла даны показатели его поддержки – коэффициенты апостериорной вероятности.

Fig. 1. Maximum likelihood tree based built in Metapiga package. Aposterior probability support is shown for each node.

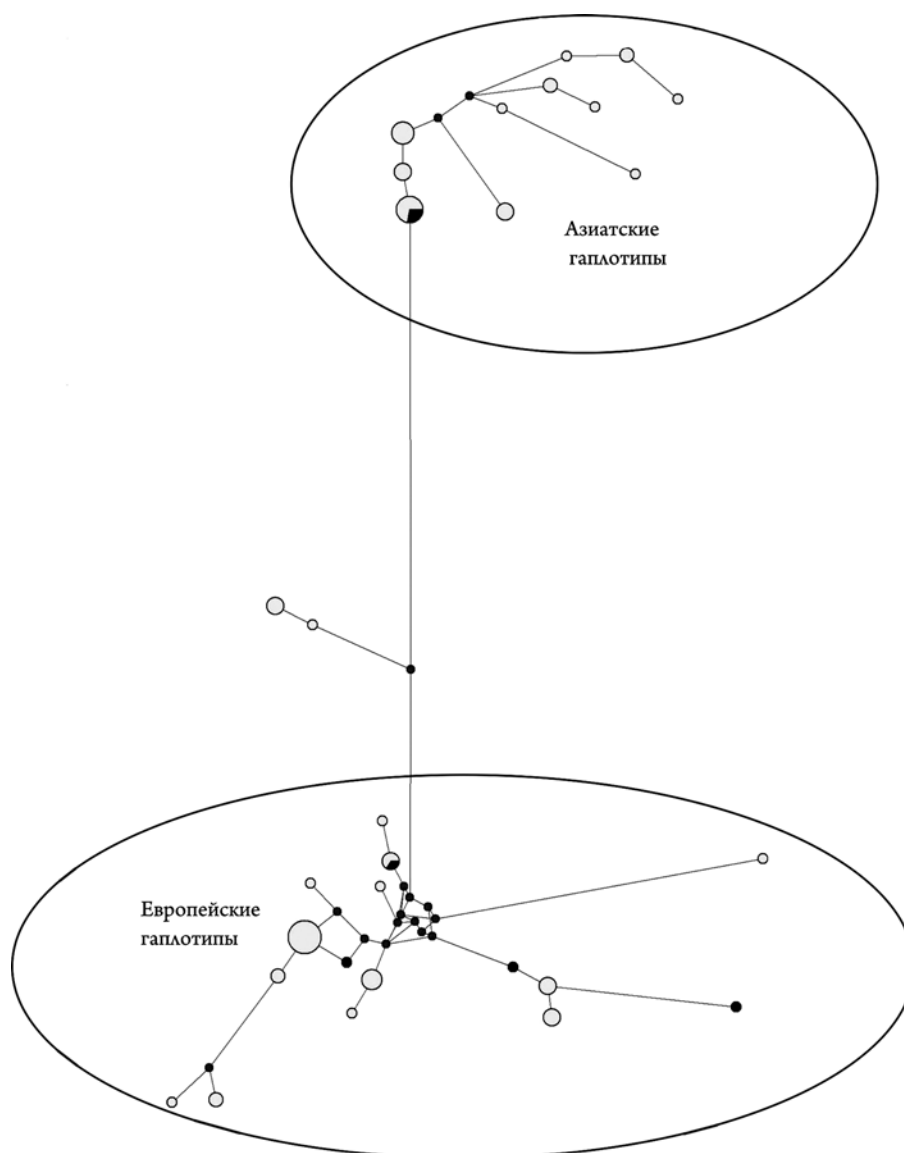


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов, построенная программой Network 4.111. Размер каждого кружка соответствует количеству образцов. Расстояния между гаплотипами соответствуют количеству нуклеотидных замен в исследованном участке ДНК.

Fig. 2. Median net of haplotypes built in Network 4.111. The size of each circle corresponds to number of samples with the same haplotype. The distance between haplotypes corresponds to number of nucleotide substitutions in the analyzed strand.

Второй кластер образован преимущественно азиатскими оленями. Внутри него обособлены группы «изюбрей» (образцы из Иркутской обл., Красноярского и Хабаровского краев, Амурской обл. и Китая) и «маралов» (образцы из Алтая, Тувы и 3 асканийских гибридных оленя). Олени Северной Америки и Монголии занимают промежуточное положение.

У *Cervus elaphus* нами выявлено 29 уникальных гаплотипов (вариантов последовательностей). Наиболее часто встречающимися (15%) среди исследованной выборки оказались гаплотипы, образующие «восточноевропейскую» кладу (16), 11 гаплотипов вошли в «азиатскую» кладу и 2 (из Таджикистана и северо-запада Китая) заняли промежуточное положение, близкое к «европейской» группе

(рис. 2). Образцы, собранные на территории Украины (на рис. 2 выделены как темные сектора), на схеме занимают диаметрально противоположные позиции, что подтверждает наличие мтДНК «алтайского» типа в некоторых местных популяциях. И это не случайно, поскольку расселение благородного оленя здесь проводили бессистемно (Павлов и др., 1974).

Проведенные нами молекулярно-генетические исследования позволяют усомниться в правомерности выделения карпатского (*C. e. montanus*), крымского (*C. e. brauneri*) и кавказского (*C. e. maral*) подвидов благородного оленя. С большой долей уверенности можно полагать также, что, по мере расселения асканийских гибридных особей и завезенных в Восточную Европу алтайских маралов, митохондриальная ДНК «алтайского» типа будет распространяться в популяциях европейского благородного оленя.

Авторы благодарят всех коллег: зоологов, охотоведов, егерей и охотников, принимавших участие в сборе образцов тканей благородного оленя и обработке материала.

- Аверин В. Г. Аскания-Нова // Охота и рыболовство. — 1923. — № 5–6. — С. 31–53.
- Бибикина В. И. О смене некоторых компонентов фауны копытных на Украине в голоцене // Бюл. МОИП. Отд. биол. — 1975. — 80, вып. 6. — С. 67–72.
- Гентнер В. Г., Цалкин В. И. Олени СССР (систематика и зоогеография). — М.: Изд-во Моск. об-ва испыт. природы, 1947. — 176 с.
- Данилкин А. А. Млекопитающие России и сопредельных регионов. Олени. — М.: ГЕОС, 1999. — 552 с.
- Карцев Г. П. Очерки по разведению и содержанию крупной дичи // Укр. мисл. та рибалка. — 1928. — № 11–12. — С. 21–24.
- Павлов М. П., Корсакова И. Б., Лавров Н. П. Акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в СССР. — Киров: Волго-Вятское книж. изд-во, 1974. — Ч. 2. — 460 с.
- Салганский А. А. Одомашнивание копытных в СССР: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. — Киев, 1967. — 48 с.
- Салганский А. А., Слесь И. С., Треус В. Д., Успенский Г. А. Семейство оленьих // Зоопарк «Аскания-Нова». — Киев, 1963. — С. 81–135.
- Треус В. Д. Акклиматизация и гибридизация животных в Аскания-Нова. — Киев: Урожай, 1968. — 316 с.
- Cronin M. A., Macneil M. D., Patton J. C. Mitochondrial DNA and microsatellite DNA variation in domestic reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) and relationships with wild caribou (*Rangifer tarandus granti*, *Rangifer tarandus groenlandicus*, and *Rangifer tarandus caribou*) // J. Hered. — 2006. — Sep.—Oct.; N 97(5). — P. 525–530.
- Ellerman J. R., Morrison-Scot T. C. S. 1951. Checklist of Palaearctic and Indian mammals 1758 to British Museum (Nat. Hist.). — L. — 1946. — 810 p.
- Groves C. The genus *Cervus* in eastern Eurasia // Eur. J. Wildl. Res. — 2006. — 52. — P. 14–22.
- Grubb P. List of deer species and subspecies // Species survival commission. Deer specialist group newsletter. — 1990. — N 8. — Appendix.
- Grubb P., Gardner A. L. List of species and subspecies of the families Tragulidae, Moschidae, and Cervidae // Deer Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Deer specialist group. — Oxford: Inform. Press, 1998. — P. 6–16.
- Hall T. A. BioEdit: a User-Friendly Biological sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. Ser. — 1999. — 41. — P. 95–98.
- Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1989. — 86 (16). — P. 6196–6200.
- Lemmon A. R., Milinkovitch M. C. The metapopulation genetic algorithm: an efficient solution for the problem of large phylogeny estimation // PNAS. — 2002. — 99. — P. 10516–10521.
- Lowe V. P. W., A. S. Gardiner. A re-examination of the subspecies of red deer (*Cervus elaphus*) with particular reference to the stocks in Britain // J. Zool. — 1974. — 174. — P. 185–201.
- Ludt C. J., Schroeder W., Rottmann O., Kuehn R. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) // Mol. Phylog. Evol. — 2004. — 31. — P. 1064–1083.
- Randi E., Pierpaoli M., Danilkin A. Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*) // Heredity. — 1998. — 80, N 4. — P. 429–437.
- Tamate H. B., Tsuchiya T. Mitochondrial DNA polymorphism in subspecies of the Japanese Sika deer, *Cervus nippon* // Heredity. — 1995. — 86. — P. 211–215.
- Wiehler J., Tiedemann R. Phylogeography of the European roe deer *Capreolus capreolus* as revealed by sequence analysis of the mitochondrial control region // Acta theriol. Suppl. — 1998. — 5. — P. 187–197.