

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИ РЕИНТРОДУКЦИИ ЛЕОПАРДА (*PANTHERA PARDUS* L., 1758) НА КАВКАЗЕ

© 2011 г. В. В. Рожнов, В. С. Лукаревский, П. А. Сорокин

Представлено академиком Д.С. Павловым 03.11.2010 г.

Поступило 09.11.2010 г.

В рамках программы по реинтродукции переднеазиатского леопарда на Кавказе впервые получены данные о генетическом полиморфизме леопарда (*P. pardus saxicolor*) из природных популяций из российской части Кавказа (Краснодарский край, Северная Осетия), Закавказья (Азербайджан, Армения), Ирана, Туркмении и Афганистана. Разработаны молекулярно-генетические подходы для определения подвидовой принадлежности леопардов с невыясненным происхождением из зоопарков и питомников, потенциально имеющих гибридное происхождение. Применение для такого анализа 11 микросателлитных локусов и фрагмента митохондриального гена *NADH5* эффективно для выявления особей, годных для разведения и реинтродукции на Западном Кавказе.

Леопард *P. pardus* еще недавно был довольно широко распространен на Кавказе и занимал практически все горные территории, но из-за усиленного истребления леопарда и подрыва его кормовой базы в конце XIX – начале XX вв. численность его резко сократилась, во многих районах он был полностью уничтожен. К 1950-м годам на Кавказе сохранились лишь единичные особи этого вида, а в 1960–1970-е годы сообщения о встречах леопарда практически перестали поступать.

Для восстановления на Кавказе популяции переднеазиатского леопарда разработана и реализуется специальная программа [1], которая наряду с другими мероприятиями предусматривает разведение животных этого подвида в неволе и его последующую реинтродукцию. Одним из важных моментов реализации программы восстановления популяции леопарда является соответствие генетического статуса животных, предназначенных для реинтродукции [2], обитавшим в этом регионе зверям, чему должна предшествовать реви-

зия таксономического статуса леопарда этого региона.

В настоящее время ситуация с названием переднеазиатского леопарда в значительной степени запутана, а номенклатура недостаточно разработана. В пределах обширного ареала, охватывающего большую часть Африки и существенную часть Южной Азии, описано большое число форм леопарда, таксономический статус которых вызывает разногласия [3–7].

Леопарда, обитающего в западной части ареала (юг Центральной и Передняя Азия, в том числе Кавказ) и отличающегося крупными размерами, одни авторы [8] относят к подвиду *P. p. tulliana Valenciennes, 1856*, другие [3] – к *P. p. ciscaucasica Satunin, 1914*, третьи [9] к – *P. p. saxicolor Pospelov, 1927*. Всего на этом участке ареала, охватывающем пространство от Пакистана (р. Инд) на востоке до Турции (Анталья) на западе, включая большую часть стран Аравийского п-ова, выделяют 7 популяций леопарда, которые были описаны как самостоятельные формы (*tulliana, jarvisi, nimr, ciscaucasica, dathei, saxicolor, sindica*), но в последнее время на основе результатов молекулярно-генетических исследований их провизорно объединяли в один подвид *P. p. saxicolor* [5] с неправильно принятым при такой трактовке его названием. Этими авторами показано, что переднеазиатский леопард хорошо отличается генетически от африканских форм, с одной стороны, и индийской *fusca* (и, по-видимому, *millardi*), с другой. Новейшие данные [7] свидетельствуют о том, что леопард, населяющий Аравийский п-ов, генетически хорошо отличается от перечисленных форм и представляет самостоятельный подвид *P. p. nimr Hemprich et Ehrenberg, 1833*. Придание этой форме самостоятельного таксономического статуса и выделение ее из ранее принимавшегося подвида *P. p. saxicolor* влекут за собой согласно Международному кодексу зоологической номенклатуры [10] изменение названия группы популяций, обитающих в северной части ареала (северный Иран, Туркменистан, страны Кавказа и Передней Азии), на *P. p. tulliana Valenciennes, 1856*. Следует

отметить, что в этих работах [5, 7] для молекулярно-генетических исследований были использованы ткани животных, содержащихся в зоопарках; из них лишь 2 экземпляра двух форм (*sindica* и *pintr*) происходят из природы, остальные (12 экземпляров в первой работе и 9 во второй, из которых часть экземпляров одни и те же) — из разводимой в зоопарках популяции *saxicolor*, а экземпляры *tulliana*, *jarvisi*, *ciscaucasica* и *dathei* не использовались вообще.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами проведены молекулярно-генетические исследования особей леопарда, происходящих из российской части Кавказа (Краснодарский край, Северная Осетия), Закавказья (Азербайджан, Армения), Ирана, Туркмении и Афганистана. Дополнительно как внешняя группа анализировались особи дальневосточного леопарда из Приморья. В табл. 1 приведена информация о местах сбора образцов тканей, использованных для анализа. Образцы шерсти консервировали в 96%-ном этиловом спирте. Пробы крови собирали в пробирки с добавлением  $K_3EDTA$ . Для выделения ДНК из кожи, крови и зубов использовали набор Diatom DNA Prep 200 (“Лаборатория Изоген”, Россия) и набор QIAamp DNA Mini Kit (“Qiagen”, США).

Для выяснения генетического родства по материнской линии между представленными в табл. 1 особями использованы данные, полученные при анализе последовательностей нуклеотидов фрагмента митохондриальной ДНК — гена *NADH* дегидрогеназы субъединицы 5. Амплификацию фрагментов ДНК проводили с помощью наборов реагентов (“Диалат Лтд” и “Сибэнзим”, Россия). Для гена *NADH5* применяли праймеры F и RL4 и соответствующий цикл [7]. Определение первичной последовательности ДНК в исследуемых фрагментах мтДНК проводили на автоматическом анализаторе ABI 310 и ABI 3130 с использованием соответствующих праймеров и набора ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle sequencing kit v.3.1 (“Applied Biosystems”, США). Для анализа ядерной ДНК были взяты 11 микросателлитных локусов с праймерами (E7, Fca304, Fca43, 3E6F, E21b, Fca77, Fca90, Fca96, Fca310, Fca441, Fca97), помеченными флуоресцентными красками [11, 12]. Длины микросателлитных фрагментов определяли на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3130 с добавлением стандарта длины Liz 500 и программы GeneMapper v 4.0 (“Applied Biosystems”, США). Анализ молекулярной изменчивости для микросателлитных локусов AMOVA, парные генетические дистанции (значение  $R_{st}$ ) и значения достоверности  $R_{st}$  ( $P < 0.05$ ) выполняли в программе Arlequin 3.5.1.2 [13]. Для выявления подвидовой принадлежности особей леопарда с

неясным происхождением использовали баезиальный кластерный анализ, реализованный в программе structure 2.3.1 [14], и модель admixture, предполагающую возможное смешивание двух подвидов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение полученных последовательностей нуклеотидов показало, что по данному фрагменту мтДНК рассматриваемые особи, за исключением дальневосточного леопарда, очень близки (отличие составляет 1, 2 нуклеотида (табл. 1)) к описанному ранее гаплотипу *sax 2* (фрагмент нуклеотидной последовательности гена *ND5*, номер в международной базе данных NCBI — AY035278, характерный для переднеазиатского подвида леопарда, указанного в генетической базе данных как *P. p. saxicolor*).

Анализ ядерной ДНК по 11 микросателлитным локусам (табл. 2) выборку животных из российской части Кавказа, Туркмении, Азербайджана, Ирана и Приморья в программе structure 2.3.1 говорит о генетической близости животных с гаплотипами *az2*, *ir2* и отличии их от животных с гаплотипами *dv14265* (идентичен описанному ранее *ori2*, № NCBI AY035261, характерному для дальневосточного подвида *P. p. orientalis*) и *dv3* (рис. 1). Животные из зоопарков и питомников с неясным происхождением занимают либо промежуточное положение (*k1*, *k22*), либо принадлежат группе дальневосточных леопардов (*k5*, *k7*, *k16*, *k23*) (рис. 1, 2). При этом все они (за исключением особи *k21*) по митохондриальной ДНК принадлежат к переднеазиатскому подвиду леопарда. Это свидетельствует о их гибридном происхождении в результате скрещивания дальневосточного и переднеазиатского подвидов леопардов. Леопард *k21*, напротив, и по ядерной, и по мтДНК идентичен животным из выборки дальневосточных леопардов. Для того, чтобы понять какие из проанализированных групп леопардов по анализу ядерной ДНК из разных территорий генетически ближе друг к другу, мы протестировали различные варианты объединения этих выборок в более крупные группы в программе Arlequin 3.5.1.2. При этом животные из зоопарков Кавказа и из того же региона из коллекции Зоомузея МГУ анализировали независимо. Наиболее статистически достоверный результат ( $F_{st} = 0.407$ ) характерен для варианта, в котором общая выборка разделена на 2 группы: 1 — леопарды из Туркмении, Азербайджана, Ирана и российской части Кавказа (за исключением животных из зоопарков с неясным происхождением); 2 — леопарды с неясным происхождением из зоопарков Кавказа, Новосибирска и частного питомника в Москве, а также леопарды из Приморья. Эти результаты согласуются с кластеризацией в программе structure (рис. 1) и

**Таблица 1.** Характеристика образцов тканей леопарда, использованных для анализа

Образец ткани	Место и время сбора образца ткани	Тип ткани	Гаплотип, номер NCBI
kav150163*	Россия, Краснодарский край, Майкоп, 1914, коллекция Зоологического музея МГУ, S-150163	Нижнечелюстная кость	az2, HQ185544
a6436	Армения, коллекция Института зоологии НАН РА	Шкура	af1, HQ185548
a6437	Армения, коллекция Института зоологии НАН РА	»	af1, HQ185548
az1	Азербайджан, Талыш, 2005	Кожа	az2, HQ185544
az4*	Азербайджан, Талыш, 2002	»	az2, HQ185544
az2*	Азербайджан, Талыш	Шерсть	az2, HQ185544
az3*	Азербайджан, Талыш	»	az2, HQ185544
ir1*	Иран, национальный парк Гулистан, 2004	Коготь	az2, HQ185544
ir2*	Зоопарк г. Тегеран, пойман в 2002 г. на севере Ирана в провинции Мазандаран	Шерсть	ir2, HQ185545
ir3*	Природоохранное управление г. Гурган, пойман 01.12.2009 г. в 100 км к северо-северо-востоку от г. Гурган	»	ir2, HQ185545
tu3	Туркмения, Нижний Узбой, 1989	Коготь	az2, HQ185544
tu1*	Туркмения, ущелье Догрыдере	Шерсть	az2, HQ185544
tu2*	Туркмения, ущелье Генеральское	»	az2, HQ185544
dv14264*	Россия, ДВК, по-в Гамов, Залив Петра Великого, 01.02.1929, А. Батурич, коллекция Зоологического музея МГУ, S-150163	Нижнечелюстная кость	dv14265, HQ185549
dv14265*	Россия, Приморский край, берег бухты Астафьевой, побережье Тихого океана, 12.01.1924, Батурич, коллекция Зоологического музея МГУ, S-14265	То же	dv14265, HQ185549
dv43794*	Россия, Приморский край, залив Петра Великого, охотсовхоз Гамова, 01.10.1945, Н. Горчаковская, коллекция Зоологического музея МГУ, S-43794	»	dv14265, HQ185549
dv91361*	Россия, Приморский край, Хасанский р-н, янв.1966, У. Поливань, коллекция Зоологического музея МГУ, S-91361	»	dv14265, HQ185549
dv96812*	Россия, Приморский край, Надеждинский р-н, И.Д. Чернышов, коллекция Зоологического музея МГУ, S-96812	»	dv14265, HQ185549
af1	Афганистан, г. Кабул	Кожа	af1, HQ185548
k16*	Россия, Северная Осетия, ущелье Фиагдон, 2007	Шерсть	k5, HQ185547
k1*	Россия, Северная Осетия, 2005, зоопарк	Кровь	k1, HQ185546
k21*	Россия, Нальчикский зоопарк	Шерсть	dv14265, HQ185549
k22*	Россия, Москва, питомник в поселке Речник, 2010	»	k5, HQ185547
k23*	Россия, Новосибирский зоопарк, 2010	Кровь	k5, HQ185547
k5*	Россия, Северная Осетия, 2005, зоопарк	Шерсть	k5, HQ185547
k7*	Россия, Нальчикский зоопарк, 2005	»	k5, HQ185547
dv1*	Россия, Приморский край, коллекция Уссурийской ветеринарной академии, 2008	Мышцы	dv14265, HQ185549
dv2*	Россия, Приморский край, коллекция Уссурийской ветеринарной академии, 2008	»	dv14265, HQ185549
dv3*	Россия, Южно-Сахалинский зоопарк, 2010	Кровь	dv3, HQ185550

Примечание. Образцы, для которых успешно проведен микросателлитный анализ, обозначены звездочкой. Для остальных образцов микросателлитный анализ невозможен из-за деградации ДНК.

**Таблица 2.** Длины аллелей (н.п.) микросателлитных локусов, использованных для анализа у разных образцов

№	Гаплотип	Используемый праймер																					
		E7	E7	Fca	Fca	Fca	Fca	3E	3E	E21	E21	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca	Fca
1	tu1	172	180	124	124	117	117	168	168	160	164	133	133	114	116	200	204	122	122	156	156	148	150
2	tu2	154	172	124	124	117	117	156	168	160	160	133	143	116	116	204	208	122	122	136	136	140	142
3	ir1	154	154	116	116	115	117	165	165	160	162	137	137	116	116	202	204	122	122	0	0	148	148
4	ir2	154	158	118	118	113	117	151	165	162	162	137	139	116	116	202	202	122	122	148	148	148	152
5	ir3	178	178	116	118	117	117	156	165	160	162	137	137	116	116	202	204	122	122	0	0	148	148
6	az2	158	178	118	126	117	117	165	165	160	160	133	145	114	116	198	204	122	122	0	0	144	152
7	az3	158	178	118	130	117	117	165	165	160	160	133	145	114	116	198	204	122	122	0	0	144	152
8	az4	154	178	118	118	117	117	165	165	160	162	133	137	116	116	202	204	122	122	148	148	144	152
9	k1	156	178	116	128	113	117	159	159	0	0	141	143	104	106	198	198	122	122	0	0	138	144
10	k5	156	160	116	116	113	117	159	159	160	162	135	135	104	106	194	208	0	0	0	0	0	0
11	k7	156	160	116	118	117	117	159	159	160	160	135	143	106	106	194	194	0	0	0	0	0	0
12	k16	160	162	116	122	113	117	159	159	0	0	141	143	104	104	194	208	126	126	156	156	138	138
13	k21	162	162	116	122	107	113	159	162	164	166	141	143	104	108	194	208	118	126	156	156	138	138
14	k22	152	162	116	118	113	117	159	165	160	160	137	143	104	104	194	206	0	0	0	0	148	148
15	k23	156	156	127	127	113	113	162	162	0	0	137	143	104	104	200	200	116	126	0	0	138	148
16	kav150163	172	172	116	128	113	117	162	162	160	160	137	143	104	116	208	208	122	122	0	0	148	148
17	dv1	158	158	116	116	113	113	156	162	160	166	135	135	104	110	200	202	128	128	160	160	150	150
18	dv2	158	158	116	116	113	113	156	162	160	166	129	135	104	110	200	202	128	128	160	160	138	150
19	dv3	160	160	116	116	113	117	156	162	160	160	155	155	0	0	194	209	126	128	160	160	0	0
20	dv14264	156	156	116	116	117	117	156	156	160	166	135	135	104	104	194	194	122	128	148	156	138	148
21	dv43794	158	160	116	116	117	117	156	159	160	160	135	135	104	104	194	202	128	128	152	152	140	148
22	dv14265	154	154	116	116	113	117	156	162	160	160	135	135	108	108	194	208	128	128	160	160	150	150
23	dv91361	158	158	116	116	113	113	156	162	160	160	135	135	104	110	200	202	128	128	156	156	138	138
24	dv96812	158	158	116	118	113	113	0	0	160	160	135	143	104	104	194	202	128	128	164	164	136	150

Примечание. (0) – образцы, данные для которых получить не удалось из-за деградации ДНК.

свидетельствуют о том, что по ядерной ДНК значительная часть особей с неясным происхождением близка или идентична выборке дальневосточных леопардов. Помимо этого, чтобы протестировать

вероятность генетической обособленности леопарда с российской части Кавказа, мы объединили животных с неясным происхождением с Кавказа и животное из Майкопа (kav150163) в одну группу.

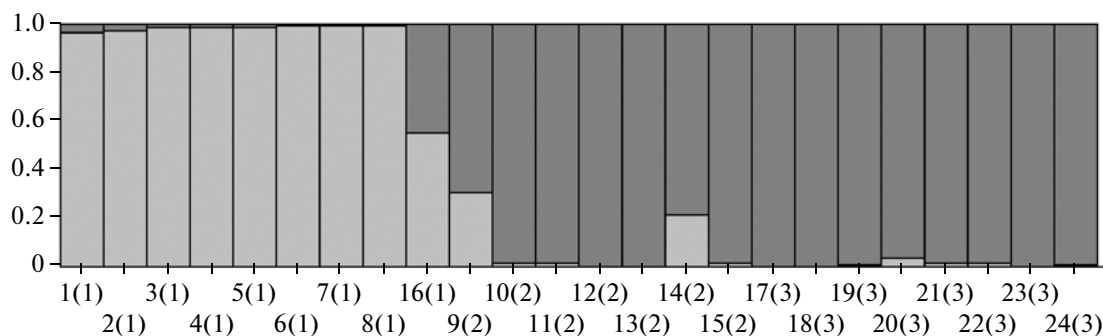
**Таблица 3.** Генетические дистанции по методу суммы квадратов различий (значение  $Rst$ ) между рассматриваемыми выборками животных трех групп: 1 – tu, az, ir, kav; 2 – k; 3 – dv

Гаплогруппа	tu	ir	az	k	kav	dv
tu						
ir	0.101					
az	0	0				
k	0.485	0.328	0.36			
kav	0	0.178	0	0.432		
dv	0.586	0.32	0.452	0.055	0.593	

**Таблица 4.** Значения  $P^*$  для  $Fst$ -критерия между рассматриваемыми выборками животных (Туркмения, Азербайджан, Иран, Кавказ, Приморье)

Гаплогруппа	tu	ir	az	k	kav	dv
tu						
ir	0.486					
az	0.748	0.369				
k	0.027*	0.009*	0.018*			
kav	0.991	0.991	0.991	0.991		
dv	0.036*	0.036*	0.018*	0.162	0.234	

\* При  $p < 0.05$  группировки достоверно можно считать генетически изолированными.



**Рис. 1.** Распределение особей леопардов, исходя из данных по длинам аллелей микросателлитных локусов. Построено в программе Structure 2.3.1. Количество записей за цикл 50000, число повторов  $10^6$ . По вертикали доля аллелей микросателлитных локусов того или иного подвида леопардов. По горизонтали порядковый номер животного в табл. 2, в скобках принадлежность к группе: 1 – *P. p. saxicolor*, 2 – леопарды неизвестного происхождения, 3 – *P. p. orientalis*.

В двух других группах остались животные соответственно переднеазиатского и дальневосточного подвидов, пойманные в природе. Статистическая поддержка существования 3 групп оказалась значительно ниже ( $F_{st} = 0.33$ ).

Кроме того, для выяснения генетической структуры внутри групп, отнесенных к переднеазиатскому подвиду леопарда, вычислялись парные генетические дистанции (значение  $R_{st}$ ) и значения достоверности  $R_{st}$  ( $P < 0.05$ ) между рассматриваемыми выборками леопардов из раз-

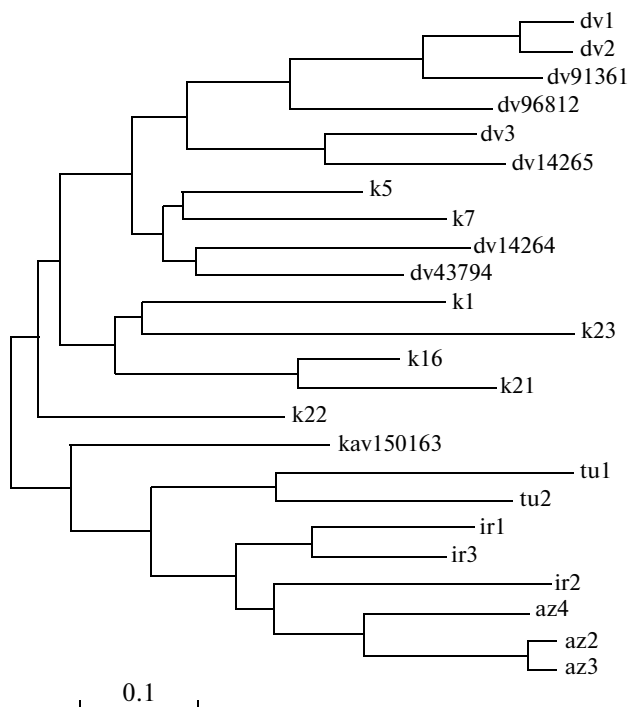
ных территорий (табл. 3, 4). На основании парных генетических дистанций построено Nj-дерево (рис. 2), демонстрирующее филогенетические отношения в анализируемой выборке.

Наличие у всех леопардов с территории российской части Кавказа, Закавказья (Азербайджан, Армения), Ирана, Туркмении и Афганистана одной группы гаплотипов (az2, ir2, af1) и близость между собой проанализированных локусов ядерной ДНК могут свидетельствовать о принадлежности этих животных к одному подвиду. Эти данные подтверждают генетическую близость популяций леопарда в этом регионе, ранее предполагавшуюся для центрально-азиатской части ареала вида [5].

Полученные нами данные позволяют обсудить и номенклатурный статус леопарда, населяющего этот регион. Согласно нашим данным формы *ciscaucasica* и *saxicolor* должны быть объединены в один подвид, а это предполагает согласно Международному кодексу зоологической номенклатуры [10] использование старшего синонима, которым является *P. p. ciscaucasica* Satunin, 1914. Аналогичный вывод был сделан при анализе краниометрических признаков леопарда этого региона [15].

Вопрос о таксономическом и номенклатурном статусе леопарда всего Кавказского экорегиона, однако, требует дальнейшего изучения и увеличения анализируемой выборки: неисследованной остается форма, населяющая Турцию и описанная под именем *P. p. tulliana* Valenciennes, 1856. Если будет показана ее идентичность *ciscaucasica*, имя этой формы (*tulliana*) следует распространить на всех зверей региона.

Таким образом, полученные нами данные о генетическом статусе леопарда из природных популяций совпадают с теми данными, которые ранее получены [5, 7] для животных, содержащихся в зоопарках мира под именем *saxicolor*. Это позволяет использовать их для разведения и реинтродукции на Западном Кавказе. Однако из-за того,



**Рис. 2.** Nj-дерево, построенное в программе Mega 4.0, исходя из парных генетических дистанций, вычисленных в программе MS\_tools между всеми парами образцов, использованных для микросателлитного анализа.

что различия между микросателлитными локусами между разными подвидами леопарда часто носят частотный характер, что осложняет определение гибридного происхождения животного, необходимы дальнейшие исследования животных как из природы, так и из зоопарков.

Авторы благодарят В.Г. Кокоева, Э. Аскерова, А.В. Горбунова, И.Я. Павлинова, Р.А. Шило, Т.М. Гурцева за предоставленный материал для генетического анализа.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Биологическое разнообразие", Русского географического общества и Всемирного фонда дикой природы (WWF-Россия).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рожнов В.В., Лукаревский В.С. Программа по восстановлению (реинтродукции) переднеазиатского леопарда на Кавказе. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2008. 65 с.
2. Рожнов В.В., Лукаревский В.С., Сорокин П.А. В кн.: Млекопитающие горных территорий. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2007. С. 275–278.
3. Гептнер В.Г., Слудский А.А. 1972. Млекопитающие Советского Союза. Т. 2. Ч. 2. Хищные (гиены и кошки). М.: Высш. шк., 552 с.
4. Jackson P., Jackson A.F. 1996. Les felinns. Lausanne; P: Delachaux et Niestle SA. 272 p.
5. Miththapala S., Seidensticker J., O'Brien S.J. 1996. // Conserv. Biol. 1996. V. 10. № 4. P. 1115–1132.
6. Nowell K., Jackson P. Status Survey and Conservation Action Plan Wild Cats. IUCN/SSC Cat Specialist Group. Gland, 1996. 382 p.
7. Uphyrkina O., Jonson W.E., Quigley H., et al. // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 2617–2633.
8. Барышников Г.Ф. // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1987. Т. 92. В. 4. С. 21–26.
9. Tylinek C., Samkove Z., Selfert S., Müller P. Das große Buch der Wilden Katzen. Leipzig, 1987. 222 s.
10. Международный кодекс зоологической номенклатуры. 2000. 4-е изд. СПб., 2000. 221 с.
11. Рожнов В.В., Сорокин П.А., Найденоко С.В. и др. // ДАН. 2009. Т. 429. № 2. С. 278–282.
12. Menotti-Raymond M., David V., Lyons L., et al. // Genomics. 1999. V. 57. P. 9–23.
13. Excoffier L.G., Laval, Schneider S. // Evolut. Bioinformatics Online. 2005. V. 1. P. 47–50.
14. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.
15. Khorozyan I.G., Baryshnikov G.F., Abramov A.V. // Rus. J. Theriol. 2006. V. 5. № 1. P. 41–52.