

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ОТДЕЛЕНИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЗООЛОГИИ И ГИДРОЭКОЛОГИИ**

**АМЕРИКАНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ АРМЕНИИ ФОНД
(ЦЕНТР ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ИМ. АКОПЯНА)**

МАТЕРИАЛЫ

**МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«БИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ПРОБЛЕМЫ ОХРАНЫ
ФАУНЫ КАВКАЗА»**

26-29 сентября 2011 года, Ереван, Армения

Ереван – 2011

**NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF REPUBLIC OF ARMENIA
DIVISION OF NATURAL SCIENCES
SCIENTIFIC CENTER OF ZOOLOGY AND HYDROECOLOGY**

**AMERICAN UNIVERSITY OF ARMENIA FOUNDATION
(ACOPIAN CENTER FOR THE ENVIRONMENT)**

PROCEEDINGS

**OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE
«BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION PROBLEMS OF THE
FAUNA OF THE CAUCASUS»**

September 26-29, 2011, Yerevan, Armenia

Yerevan – 2011

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ БЛИЗОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ ПЕРЕДНЕАЗИАТСКОГО ЛЕОПАРДА
(*PANTHERA PARDUS* L., 1758) КАВКАЗСКОГО ЭКОРЕГИОНА (АНАЛИЗ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЯДЕРНОЙ ДНК)

Сорокин П.А., Рожнов В.В., Лукаревский В.С.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071, Москва, Ленинский пр., 33,
e-mail: sorokin-p@yandex.ru

GENETIC SIMILARITY OF CAUCASIAN ECOREGION POPULATIONS OF LEOPARD (*PANTHERA PARDUS*
L., 1758) (ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR DNA)

Sorokin P.A., Rozhnov V.V., Lukarevskiy V.S.

A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky ave. 33,
Moscow, 119071, Russia

В рамках программы по реинтродукции переднеазиатского леопарда на Кавказе впервые получены данные о генетическом полиморфизме леопарда (*Panthera pardus saxicolor*) из природных популяций из Российской части Кавказа (Краснодарский край), Закавказья (Азербайджан, Армения), Ирана, Туркмении и Афганистана.

Леопарда, обитающего в западной части ареала (юг Центральной и Передняя Азия, в том числе Кавказ) и отличающегося крупными размерами, одни авторы (Барышников, 1987) относят к подвиду *P. p. tulliana* Valenciennes, 1856, другие (Гептнер, Слудский, 1972) – к *P. p. ciscaucasica* Satunin, 1914, третьи (Tylinek et al., 1987) к – *P. p. saxicolor* Pocock, 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* (Miththapala et al., 1987).

Материалы и методы

Нами проведены молекулярно-генетические исследования особей леопарда, происходящих из диких популяций Российской части Кавказа (музейный образец), 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 с территории Армении, подробная информация о других образцах представлена ранее (Рожнов и др., 2011). Образцы шерсти и экскрементов консервировали в 96% этиловом спирте. Для выделения ДНК из кожи и зубов использовали набор Diatom DNA Prep 200 (Лаборатория Изоген, Россия) и набор QIAamp DNA Mini Kit и из экскрементов – QIAamp DNA Stool 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 ND5. Амплификацию фрагментов ДНК проводили с использованием наборов реагентов (Диалат Лтд и Сибэнзим, Россия). Для гена NADH5 применяли праймеры F и RL4 и соответствующий цикл. Определение первичной последовательности ДНК в исследуемых фрагментах мтДНК проводили на автоматических анализаторах 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 использовали 11 микросателлитных локусов с праймерами (E7, Fca304, Fca43, 3E6F, E21b, Fca77, Fca90, Fca96, Fca310, Fca441, Fca97), помеченными флуоресцентными красками (Рожнов и др., 2011). 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).

Результаты и обсуждение

Сравнение полученных последовательностей нуклеотидов показало, что по данному фрагменту мтДНК рассматриваемые особи очень близки (отличие составляет 1-2 нуклеотиды) от описанного ранее гаплотипа сах 2 (фрагмент нуклеотидной последовательности гена *cytb* номер в международной базе данных NCBI – AY035278, характерный для переднеазиатского подвида леопарда, указанного в генетической базе данных как *P. p. saxicolor*). У животных Армении встречены гаплотипы af1 (образцы из коллекции Института зоологии НАН РА Республики Армения) и az2 (образцы из природы).

Анализ ядерной ДНК по 11 микросателлитным локусам выборок животных Российской части Кавказа, Туркмении, Азербайджана, Ирана, Армении (табл. 1) и Приморья в программе Structure 2.3.1 (Pritchard et al., 2000) говорит о генетической близости животных с гаплотипами af1, az2, ir2, и отличие их от животных с гаплотипами ori2 (идентичен описанному ранее ori2, № NCBI AY035261, характерному для дальневосточного подвида *P. p. orientalis*) (рис. 1).

Таблица 1. Характеристика проб леопарда из Армении, использованных для анализа (остальные пробы см. Рожнов и др., 2011)

Образец ткани	Место и время сбора образца ткани	Тип пробы	Гаплотип и номер
a6436	Армения, коллекция Института зоологии НАН РА	шкура	af1, HQ1
a6437	Армения, коллекция Института зоологии НАН РА	шкура	af1, HQ1
a1	Армения, Хребет Мегри, 2005	экскременты	az2, HQ1

Таблица 2. Длины аллелей (н.п.) микросателлитных локусов образца a1, использованного для анализа

образец	Используемый праймер										
	E7	Fca 304	Fca 43	3E 6F	E21 B	Fca 77	Fca 90	Fca 96	Fca 310	Fca 441	Fca 9
a1	172	118	117	165	160	137	116	197	122	156	9
	178	128	117	168	160	137	116	207	122	156	9

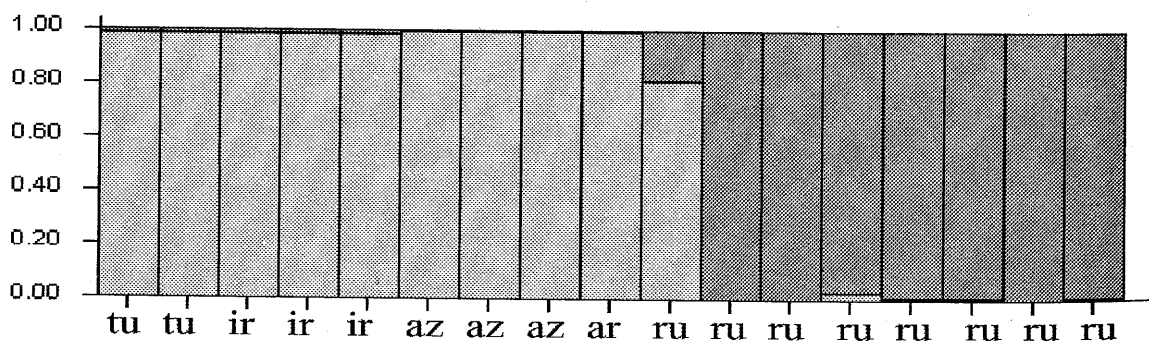


Рис. 1. Распределение особей леопардов, исходя из данных по длинам аллелей микросателлитных локусов. Построено в программе Structure 2.3.1. По вертикали – аллели микросателлитных локусов того или иного подвида леопардов. По горизонтали – анализируемые животные и страна происхождения образца. Светло-серым показана группа 1. *P. p. saxicolor*, темно-серым – группа 2. *P. p. orientalis*.

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 может свидетельствовать о принадлежности этих животных к одному подвиду.

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.

Авторы благодарят И.Я. Павлинова (Зоологический музей МГУ), М.Ф. Аганяна (Институт зоологии НЦЗГ НАН Республики Армения) и А. Малхасяна за материал, предоставленный для генетического анализа. Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие», Русского географического общества.

Литература

- Барышников Г.Ф. 1987. Мумия леопарда из пещеры-ловушки в горах Кугитанг-тау // Бюлл. Моск. об-ва испыт природы. Отд. биол., 92 (4): 21-26.
- Гептнер В.Г., Слудский А.А. 1972. Млекопитающие Советского Союза. Т. 2, ч. 2. Хищные (гиены и кошки). М.: Высшая школа, 552 с.
- Рожнов В.В., Лукаревский В.С., Сорокин П.А. 2011. Использование молекулярно-генетических характеристик при реинтродукции леопарда (*Panthera pardus* L., 1758) на Кавказе // ДАН, 437 (2): 280-285.
- Miththapala S., Seidensticker J., O'Brien S.J. 1996. Phylogeographic subspecies recognition in leopards (*Panthera pardus*): molecular genetic variation // Conserv. Biol., 10 (4): 1115-1132.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics, 155: 945-959.
- Tylinek C., Samkove Z., Selfert S., Müller P. 1987. Das große Buch der Wilden Katzen. Leipzig, 222 S.

Abstract

Within the framework of the Program of North Persian leopard Reintroduction in the Caucasus, the data on genetic polymorphism in leopard (*P. pardus saxicolor*) have been obtained for the first time from natural populations of the Russian part of the Caucasus (Krasnodar krai), Transcaucasia (Azerbaijan, Armenia), Iran, Turkmenistan, and Afghanistan. The presence of the same group of haplotypes (az2, ir2, af1) in all leopards and the similarity of analyzed 11 microsatellite loci to each other may be evidence of taxonomy of these animals with a single subspecies.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ И ЦИНКА НА ЦИТО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЗЕЛЕННОЙ ЖАБЫ *PSEUDEPIDALEA VARIABILIS* PALLAS, 1769 (ANURA: BUFONIDAE)

Степанян И.Э., Акопян А.С.

Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА, П. Севака 7, 0014 Ереван, Армения,
e-mail: ilona_stepanyan@yahoo.com