

70. Roelke M.E., Martenson J.S., O'Brien S.J. // *Current Biol.* 1993. V. 3. P. 340.
71. Roy M.S., Geffen E., Smith D., Olander E.A., Wayne R.K. // *Mol. Biol. Evol.* 1994. V. 11. P. 553.
72. Saisa M., Koljonen M.-L., Tahtinen J. // *Cons. Genetics.* 2003. V. 4. P. 613.
73. Schork N.J., Cardon L.R., Xu X. // *Trends Genet.* 1998. V. 14. P. 266.
74. Schmalenberger A., Tebbe C.C. // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 251.
75. Segelbacher G. // *Mol. Ecol. Notes.* 2002. V. 2. P. 367.
76. Seidensticker J., Kruykov A.P., Chelomina G.N., Ushyrkina O.V. // A recovery plan for conservation of the Far Eastern leopard. USID and WWF, Vladivostok, 1996. P. 11.
77. Spencer C.C., Neigel J.E., Leberg P.L. // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. P. 1517.
78. Symondson W.O.C. // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 627.
79. Taberlet P., Camarra J.-J., Griffin S., Uhres E., Hanotte O., Waits L.P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J. // *Mol. Ecol.* 1997. V. 6. P. 869.
80. Taberlet P., Mattok H., Dubois-Paganon C., Bouvet J. // *Mol. Ecol.* 1993. V. 2. P. 399.
81. Taberlet P., Waits L.P., Luikart G. // *Trends Ecol. Evol.* 1999. V. 14. P. 323.
82. Talbot S.L., Pearce J.M., Pierson B.J., Derksen D.V., Scribner K.T. // *Cons. Genetics.* 2003. V. 4. P. 367.
83. Tarr C.L., Fleischer R.C. // *Mol. Ecol.* 1999. V. 8. P. 941.
84. Vernesi C., Pecchioli E., Caramelli D., Tiedemann R., Randi E., Bertorelle G. // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 1285.
85. Waldick R.C., Kraus S., Brown M., White N. // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 2241.
86. Wasser S.K., Houston C.S., Koehler G.M., Cadd G.G., Fain S.R. // *Mol. Ecol.* 1997. V. 6. P. 1091.
87. Wayne R.K. // *Genetic and Conservation.* Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1996. P. 75.
88. Westemeier R.L., Brawn J.D., Simpson S.A., Esker T.L., Jansen R.W., Walk J.W., Kershner E.L., Bouzat J.L., Paige K.N. // *Science.* 1998. V. 228. P. 1695.
89. Whitehouse, Harley E.H. // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10. P. 2139.
90. Williams R.N., Rhodes O.E.Jr., Serfass T.L. // *J. Mammol.* 2000. V. 81. P. 895.
91. Wolf C.M., Griffith B., Reed C., Temple S.A. // *Cons. Biol.* 1996. V. 10. P. 1142.
92. Woods J.C., Paetkau D., Lewis D. // *Wildlife Soc. Bull.* 1999. V. 27. P. 616.
93. Zhu D., Degnan S., Moritz C. // *Cons. Biol.* 1998. V. 12. P. 80.
94. Zink A.R., Reischl U., Wolf H., Nerlich A.G. // *FEMS Microbiol. Letters.* 2002. V. 213. P. 141.

## Genetic Studies of Rare Species: Problems and Prospects

G. N. Chelomina

*Institute of Biology and Soil Science, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia*

The problems of identifying the conservation units, natural interspecific hybridization and its role in evolution, adaptation, and conservation of genetic diversity are discussed. Breeding of species in captivity and their introduction into nature, heterozygosity as one of the main parameters of genetic health in populations is considered, as well as the problems of inbreeding depression and "bottle neck". The prospects of phylogenetic analysis of pathogens and advantages of noninvasive sampling of biological samples are covered. Examples of original genetic research of rare and endangered animal species are given.

УДК 578.:599.323.4

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕДКИХ ВИДОВ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2006 г. Г. Н. Челомина

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток

Обсуждаются вопросы идентификации единиц сохранения, естественной межвидовой гибридизации (ее роли в эволюции, адаптации и сохранении генетического разнообразия), а также скрещивания в неволе и интродукции в природу, гетерозиготности (как одного из основных показателей генетического “здоровья” популяции), проблемы инбредной депрессии и “бутылочного горлышка”. Освещаются перспективы филогенетического анализа патогенов, а также преимуществ неинвазивного взятия биологического материала. Приводятся примеры оригинальных генетических исследований редких и ценных видов животных.

### ВВЕДЕНИЕ

Первая компилятивная сводка\* об итогах и перспективах генетических исследований редких и исчезающих видов была опубликована в 1983 г. В ней обсуждался широкий круг вопросов, остающихся актуальными до сих пор. Выделены основные моменты, имеющие эмпирическую и концептуальную роль для генетики редких видов (т.е. что и для каких конкретных целей изучает генетика редких видов), сформулированы главные задачи. Обосновывалось, что молекулярно-генетические исследования – важнейший этап на пути сохранения редких видов, так как они позволяют определить не только генетический статус и уникальность таксонов (имеющие первостепенную важность), но также выработать рекомендации для программ разведения в неволе, реинтродукции в природу и генетического мониторинга. В сочетании с данными физиологических, экологических и этологических исследований они обеспечивают всестороннюю оценку перспективы выживания видов [14]. Но, как и любая другая бурно развивающаяся наука, генетика сохранения видов сталкивается с определенными трудностями при решении конкретных задач, а в ряде случаев открывает новые перспективы развития. Остановимся кратко на некоторых наиболее проблемных ситуациях и перспективных направлениях генетики сохранения биологического разнообразия нашей планеты.

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЕДИНИЦ СОХРАНЕНИЯ

К развитию биологии охраняемых видов привело понимание важности решения популяцион-

ных проблем, поскольку именно популяция является основным объектом природоохранных мероприятий. Принципы популяционного анализа, впервые появившиеся в начале XVIII века в работах Мальтуса, окончательно сформировались в начале XX века. Основы генетики популяций, заложенные английским математиком Харди и немецким врачом Вайнбергом, позже плодотворно развивались в работах Фишера, Холдейна, Райта, а также Четверикова, Серебровского и Филиппенко [3]. Подробный анализ популяции как основной природоохранной единицы приведен в монографии Яблокова [11], давшему ей следующее определение: “популяция – это минимальная самовоспроизводящаяся группа особей одного вида, на протяжении эволюционно длительного периода времени населяющая определенное пространство, образующая самостоятельную генетическую систему и формирующая собственное экологическое гиперпространство”.

Целью современной биологии сохранения, прежде всего, является развитие практических подходов для менеджмента исчезающей дикой природы. Любая такая программа должна начинаться с идентификации потенциальных единиц сохранения. Моритц с соавт. [57, 58] предположили, что популяции, которые генетически дивергировали на уровне ядерного, а также митохондриального геномов, должны сохраняться как отдельные единицы, т.е. эволюционно значимые единицы (ESUs, evolutionary significant units) или единицы менеджмента (MUs, management units). Эта концепция была принята в ряде работ по сохранению редких видов [31, 32, 92] и реализована на многих видах животных, таких как олень Элда *Cervus eldi* [17], австралийская змея *Hoplocephalus stephensii* [45], ягуар *Panthera onca* [29], африканский слон *Loxodonta africana* [25] и т.д.

\*Genetics and Conservation / Eds Schonewald-Cox C.M., Chambers S.M., MacBryde B., Thomas L. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1983. 722 p.

В некоторых случаях ввиду сложности определения единиц сохранения предложили выделять “отдельный популяционный сегмент” (DPS, distinct population segment). Однако на практике осуществлять данный принцип бывает чрезвычайно трудно. Для признания в качестве DPS популяция должна быть дискретной (отделена географически, физиологически, экологически и т.п. от других популяций), а также иметь биологическую и экологическую значимость (т.е. занимать уникальное или необычное экологическое положение, когда ее потеря становится значительным пробелом в ареале вида, или данная популяция должна высоко отличаться от других популяций по генетическим характеристикам). Такой подход был применен, например, в отношении пеканарыболова *Martes pennanti* [27].

Чтобы определить единицу сохранения, когда практически отсутствует информация о распределении видов, обращаются к так называемым индикаторным видам (или группам). Концепция индикаторов биоразнообразия (The Indicator Concept) основана на принятии того положения, что выбранная территория, включающая индикаторные группы (т.е. хорошо известные таксоны, являющиеся предметом охраны), включает широкий видовой спектр других организмов [33, 47, 68]. Тестирование предположения, что все виды, находящиеся под угрозой исчезновения, будут включены в области, выбранные для охраны индикаторных групп, проводили на примере среднеатлантического региона США [48]. В группу риска были включены пресноводные рыбы и моллюски, птицы, млекопитающие, амфибии и рептилии. Оказалось, что, хотя отобранные места с единственной таксономической индикаторной группой обеспечивали охрану 61–82% обычных видов, другие редкие виды (неиндикаторные) при этом охватывались только наполовину (не более 58%). Причем, виды с более ограниченными местами обитания реже попадали под охрану, чем широко распространенные. Что весьма примечательно, под охраной на территориях, где индикаторными видами были наземные позвоночные, оказались от 27 до 55% видов, строго приуроченных к водной среде.

Иногда попытки в определении единиц сохранения приводят к пересмотру таксономического статуса популяций. Таксономическая классификация является фундаментальным моментом биологии сохранения, ее неопределенность ведет не только к ошибкам при установлении планов менеджмента, но порождает риск серьезных ошибок при установлении приоритетов. Например, генетические исследования африканского слона привели к повышению таксономического ранга двух отличающихся морфологических форм (саванный и лесной морфотипы) до уровня самостоятельных видов, различающихся по степени гене-

тического разнообразия: *Laxodonta africana* и *L. cyclotis* [25].

Некоторые виды млекопитающих, включая леопарда, были, напротив, интенсивно подразделены зоологами. Молекулярно-генетические данные позволили объединить 27 диагностируемых традиционными методами подвидов леопарда *Panthera pardus* в шесть географически изолированных в ходе естественных исторических событий генетических групп: африканскую, центрально-азиатскую, индийскую, шри-ланкийскую, яванскую и восточноазиатскую. Эти группы включают восемь подвидов, так как последняя группа объединяет три подвида: *P. p. orientalis* (Южное Приморье), *P. p. japonensis* (Северный Китай) и *P. p. delacouri* (Южный Китай) [55].

Особое внимание в природоохранных программах уделяется островным формам, характеризующимся, как правило, значительной утратой генетического разнообразия (вследствие эффекта основателя, ограниченной дисперсии, интродуцированных хищников и демографических флуктуаций, ассоциированных с малым размером популяций). Данные об уязвимости таких популяций ошеломляющие: 93% от видового состава орнитофауны исчезло с 1600 по 1980 годы с островов Северной Америки и США, где они были эндемиками, в то время как за еще больший период времени (примерно 500 лет) на территории материка исчезло 73% птиц. На Гавайских островах вымерло 60% птиц, а на Маскаренских – 86% местных видов. В особенно тяжелом положении оказались примитивные древние формы, представляющие огромную научную ценность. Зонай особого риска являются также экосистемы с высоким уровнем эндемизма. К ним относятся рифтовые озера: Байкал – около 1500 эндемиков и Малави – около 500 (цит. по [41]).

Эволюционные радиации, порождаемые островной изоляцией, представляют удобные модели для изучения происхождения биологического разнообразия и естественного отбора, а также для реализации политики сохранения видов. Островные популяции могут иметь различные уровни адаптивной дивергенции, репродуктивной изоляции и филогенетических различий, поэтому часто идентификация биологических единиц, являющихся реальным результатом радиации и нуждающихся в охране, бывает затруднена. В полной мере это относится к гигантской галапагосской черепахе *Geochelone nigra*, представляющей единственную выжившую группу, в которой хорошо выражена межпопуляционная дивергенция. Галапагосская черепаха является самой крупной среди наземных видов черепах, эндемиком удаленного океанического архипелага и основным природоохраным компонентом островов. Общепринятая таксономия признает 15 подвидов, эндемич-

ных к разным островам или вулканам на одном и том же острове. Филогенетический анализ мтДНК подтвердил монофилетичность данной группы, которая эволюционировала 2–0.18 млн лет назад и имела южно-американского предка, а также показал, что популяции имеют разную дивергенцию, контрастную демографическую историю и глубокую филогеографическую структуру. Характер разнообразия популяций согласуется с геологической и биогеографической историей, а в некоторых случаях также с адаптивной и морфологической дивергенцией. Результаты ясно указали на присутствие минимум четырех единиц сохранения, имеющих долговременную раздельную эволюцию: две популяции острова Санта Круз и по одной на островах Пинзон и Сан Кристобал [21].

### ПРОБЛЕМЫ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ, ИНБРЕДНОЙ ДЕПРЕССИИ И “БУТЫЛОЧНОГО ГОРЛЫШКА”

Для разработки восстановительных программ требуется корректная оценка уровня изменчивости единиц сохранения. Гетерозиготность – одна из основных характеристик изменчивости, ее повышение увеличивает шансы для выживания популяций в эволюционное или экологическое время. Тем не менее значение для выживания популяции уровня гетерозиготности разными авторами оценивается неодинаково. Некоторые считают, что, когда популяция мала, возможность исчезнуть для нее по причине стохастических демографических флуктуаций (безотносительно гетерозиготности) может иметь первостепенную важность [35]. Другие придерживаются мнения, что наиболее значимой является гетерозиготность, именно она как молекулярный маркер наиболее подходит для оценки здоровья популяции, а также мониторинга в восстановительных программах [65].

Примеры свидетельствуют, что гетерозиготность в популяциях редких и исчезающих видов может быть, действительно, снижена. Впервые широко заговорили об этом, когда О’Брайен с соавторами сделали сенсационное заявление о необычайно низкой генетической изменчивости африканского гепарда *Acinonyx jubatus* [63, 64]. Исследуя 55 южно-африканских гепардов по 47 изозимным локусам, авторы обнаружили практически нулевую гетерозиготность (H). Эти результаты контрастировали со средними значениями гетерозиготности (H = 0.067) для 172 видов млекопитающих, а также 81 вида хищников (H = 0.042), включая его близкого родственника – пуму *Felis concolor* (цит. по [70]). Однако есть ряд оснований для осторожной интерпретации данных по гетерозиготности при принятии соответствующих природоохранных мер. Так, хотя при-

чинная связь между молекулярной изменчивостью и генетическим здоровьем популяций птиц является твердо установленным фактом, не все находящиеся под угрозой исчезновения таксоны этого класса позвоночных имеют низкие уровни генетического разнообразия [41]. У псовых даже среди некоторых исчезающих видов (как, например, африканская дикая собака) сохранился средний уровень разнообразия по мтДНК и микросателлитным локусам, а для восьми видов, представляющих волко-подобных хищников, установлены достаточно высокие показатели гетерозиготности при исследовании десяти микросателлитных локусов: H = 0.24–0.73. По-видимому, уровень генетической изменчивости видов отражает размер популяции, степень популяционной изоляции, мутационную скорость аллелей [87]. Есть основания считать, что наиболее важным для выживания популяции является сохранение определенного исторически сложившегося оптимума гетерозиготности (т.е. соотношения гомо- и гетерозигот) [1].

При оценке гетерозиготности особое значение придается изучению разнообразия в локусах комплекса гистосовместимости (МНС, major histocompatibility complex), отвечающего за иммунный статус. Инбридинг может сопровождаться повышенной восприимчивостью к инфекционным вирусам, бактериям и другим патогенам. Видимо, некоторые локусы, ответственные за иммунитет, зависят от уровня аллельного полиморфизма популяции, т.е. для выживания популяции адаптивная реакция каждой особи должна быть разной. Именно это является движущей силой для огромного генетического разнообразия на уровне МНС, помогающего распознать патогенный вирус и уничтожить зараженную клетку. Когда в штате Орегон произошла вспышка кошачьего инфекционного перитонита, это закончилось 100%-ной заболеваемостью и 60%-ной смертностью диких представителей кошачьих, в то время как у высоко полиморфной домашней кошки смертность не превысила 5%-ной отметки [61, 64].

Инбредная депрессия – почти универсальное свойство как искусственных, так и природных популяций, избежание инбридинга – одна из первоочередных задач менеджмента редких и исчезающих видов. Степень ее “тяжести” широко варьирует и зависит от истории и размера популяции, характера исследованных признаков, эффектов сцепления генов, а также окружающей среды. В популяциях, которые испытывают инбридинг, вредные аллели могут быть удалены через естественный отбор. Способность к элиминации вредных аллелей зависит от скорости инбридинга, коэффициентов селекции, уровней доминантности мутационных эффектов и эффектов сцепления [69]. Однако мнения относительно эффективности отбора в снижении риска исчезновения

из-за инбридинга (особенно в отношении скорости инбридинга) расходятся. Существует предположение, что преднамеренное очищение от генетического груза может быть более выгодным, чем просто избежание инбридинга. Теоретически очищение действительно приведет к более высокой приспособляемости в малых инбредных популяциях по сравнению с их аутбредными предками. Медленный инбридинг должен быть оптимальным для популяции, поскольку он дает больше возможностей для избавления от вредных аллелей, снижая, таким образом, скорость исчезновения. Что касается высоко инбредных популяций, многочисленные теоретические и экспериментальные данные свидетельствуют о высокой вариабельности и низком эффекте очищения. Вероятнее всего, очищение может слегка замедлить исчезновение, но весьма сомнительно, что оно полностью устранил вредное действие инбридинга. К такому заключению пришли авторы, исследовавшие 31 популяцию *Drosophila melanogaster* и обнаружившие, что исчезновение в малых инбредных популяциях происходит при более низких уровнях инбридинга, а выжившие популяции (с большим эффективным числом) после 60 генераций имеют только 45% от приспособляемости аутбредного контроля [69].

В последнее десятилетие дискутируются две гипотезы генетических основ инбредной депрессии. Согласно доминантной, низкая приспособляемость при инбридинге является результатом гомозиготности части локусов для “вредных” рецессивных аллелей, которые в аутбредной популяции обычно маскируются в экспрессии их более общими доминантными двойниками. Согласно “сверхдоминантной”, или “гетерозиготного преимущества”, гипотезе, гетерозиготность оказывает критическое влияние на приспособляемость. Эти две гипотезы делают различными предсказания об относительной толерантности популяций к инбридингу. В первом случае уровень гетерозиготности не имеет большого влияния на последующее генетическое “здоровье” популяции, инбридинг очистит популяцию от вредных аллелей. Во втором, если инбредная депрессия появилась из-за селективного преимущества гетерозигот, ранее инбредные и гомозиготные популяции должны иметь меньшие адаптивные возможности и в плане перспектив на выживание уступят ранее высоко гетерозиготным популяциям. В любом случае данные свидетельствуют, что популяции имеют широко варьирующую приспособляемость, ассоциированную с инбридингом (цит. по [14]).

Многие редкие и исчезающие виды прошли через “бутылочное горлышко”, т.е. резкое сокращение численности, и именно этому событию популяции обязаны наибольшей потерей генетической изменчивости. Это произошло, например, с

африканским слоном (*Loxodonta africana africana*) [89], североатлантическим китом (*Eubalaena glacialis*) [85], японским оленем (*Cervus nippon*) [36], канадской казаркой (*Branta canadensis*) [82]. Каждое “бутылочное горлышко” популяции различно и качественно непредсказуемо, его последствия в малой популяции трудно предвидеть из-за безграничного разнообразия геномной изменчивости, генерированной предковыми мутациями и рекомбинациями. Кроме того, генетическая способность изменяться под действием естественного отбора может заметно увеличить последствия единственного, но сильного “бутылочного горлышка”. Имеющиеся в литературе примеры предполагают, что последствия “бутылочного горлышка” популяций предопределены как количеством потерянной изменчивости, так и стохастически детерминированным качеством оставшихся аллелей. Действительно, геном млекопитающих содержит от 50 до 100 тыс. структурных генов, и в большинстве видов от 15 до 40% этих локусов высоко полиморфны. Но даже при самом высоком уровне полиморфизма сохраняются редкие аллельные варианты. Когда виды редуцированы до горстки особей, комбинация оставшихся аллелей всегда уникальна из-за стохастического характера события основателя. По этой же причине каждый успешный вид – уникальный продукт многочисленных комбинаций взаимодействия аллелей, селекции и генетического дрейфа [61].

Следовательно, другой важный аспект проблемы, влияющий на результат “бутылочного горлышка”, количество “генетического груза”, т.е. число летальных локусов, представленных в исходной (“предбутылочногорлышковой”) популяции. Если вид сохраняется длительное время без сокращения, вредные мутации накапливаются до уровня, который пропорционален прошедшему времени, начиная с последнего “бутылочного горлышка”. Основываясь на этих рассуждениях, Ролс с сотр. [67] использовали смертность молоди в пометах как индекс пригодности в родословных племенных книгах 40 видов, чтобы оценить долю летальных локусов в их геномах. Такой подход обеспечивает определение не только времени последнего “бутылочного горлышка”, но также может служить индикатором чувствительности различных видов к будущим инбредным событиям [69].

Однако низкая степень генетической изменчивости, сопутствующая событию “бутылочного горлышка”, может иметь место также из-за метапопуляционной динамики, т.е. исчезновения и реколонизации участков обитания. Метапопуляции (или совокупности субпопуляций) формируются в том случае, когда ареал вида состоит из географически более или менее изолированных участков, связанных между собой через обмен генами

и имеющих в своей истории события вымирания и повторного заселения. Феномены “бутылочного горлышка” и метапопуляции могут быть потенциально дифференцированы с помощью подробных молекулярных данных. При “бутылочном горлышке” распределение аллельных частот должно быть близким к нейтрально ожидаемому, в то время как метапопуляционные динамики приведут к присутствию меньшего числа редких аллелей, чем нейтрально ожидаемое. Генетический дрейф в случаях основателей в метапопуляциях континуально генерирует дисбаланс между связанными локусами, но при “бутылочном горлышке”, напротив, должны генерироваться равновесные связи для большинства тесно связанных локусов и недавних мутаций. Главное отличие в стратегии природоохранных мероприятий для этих сценариев в том, что локальное исчезновение не может быть неожиданным в метапопуляциях, но причин для серьезных беспокойств значительно больше, если природная популяция прошла через “бутылочное горлышко” [42].

Устойчивость метапопуляций изменяется радикально в зависимости от биологических особенностей вида. Например, у тюленей устойчивость уменьшается с увеличением уровня популяционной подразделенности, что является следствием случайных миграций. Ситуация у горных горилл и антилоп другая. Устойчивость их панмиктических популяций в целом выше, чем для тюленей, благодаря более продолжительному времени генераций и низкой изменчивости скорости роста. Что касается генетического разнообразия, у тюленей оно увеличивается с повышением уровня подразделенности, однако у горилл (более разнообразных генетически) эти изменения не столь существенны, а самый сильный эффект влияния подразделенности на генетическое разнообразие среди сравниваемых видов отмечен у антилоп [28].

Существуют разные подходы определения свидетельств недавних событий “бутылочного горлышка” [50, 52, 53, 77, 89]. Теория и практика показывают, что аллельное разнообразие (среднее аллельное число на локус) более чувствительно к эффектам коротких, но сильных событий “бутылочного горлышка”, чем гетерозиготность. Более того, аллельное разнообразие может более эффективно, чем гетерозиготность, отражать эволюционный потенциал популяции на долгосрочную перспективу [66, 77]. Для подобных оценок сравнивают значение аллельного разнообразия в популяции, предположительно пережившей резкое сокращение численности, со значениями этой же популяции до указанного события либо других популяций, в истории которых отсутствовала редукция численности [89]. Интерпретация межпопуляционных отличий по аллельному разнообразию иногда осложнена разным числом ис-

следованных образцов [40], поэтому рекомендуется использовать методы стандартизации значений аллельных частот [50].

## ПРОБЛЕМА МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ

Согласно основным положениям системной теории эволюции, “связывающей развитие любой биологической системы с эволюцией систем более высокого порядка, в которые она входит в качестве элемента”, когерентная, т.е. прогрессивная, эволюция на протяжении истории Земли неоднократно прерывалась некогерентными эпизодами – “так называемыми великими вымираниями, или геобиологическими кризисами”. Неустойчивость среды в эти периоды ведет к упрощению структуры экосистем, прерыванию сукцессий, увеличению минимальных размеров популяций и как результат – к сокращению биоразнообразия [4]. Перечисленные закономерности действительны и для антропогенных кризисов наших дней.

Неустойчивость среды обитания приводит не только к массовым вымираниями доминирующих или редких видов. Для многих выживших форм появляется возможность более полной реализации их потенций. Как правило, изолирующие механизмы ослабевают, в результате становится возможным слияние видов путем гибридизации. Поэтому кризисные популяции характеризуются широким размахом изменчивости, часто превосходящим не только видовые, но и родовые пределы [4]. Из этого следует, что примеры естественной гибридизации видов и популяций, которые мы можем наблюдать в наши дни, предоставляют интригующую возможность заглянуть в прошлое и увидеть, в определенном смысле, будущее развитие жизни на нашей планете в самые экологически кризисные периоды ее существования.

Гибридизация, интрогрессия и видообразование – примеры естественного и динамичного эволюционного процесса, который оказывает большое влияние на организацию генетического разнообразия. Одна из целей генетики редких и ценных видов – сохранение генетического разнообразия, другая – сохранение эволюционного процесса. Молекулярно-генетические исследования популяций, проводимые в последние два десятилетия, убедительно продемонстрировали, что гибридизация между видами – явление более общее, чем полагали ранее. Шварц [10] приводит такую статистику: среди *Anura* известно 400 межвидовых гибридов, млекопитающих – 256, а птиц – 1000; из них к межродовым относится соответственно 3, 11 и 1.4%. Причем, гибридизация имеет небольшое влияние на генетическую интегрированность популяций в узких зонах между многочисленными, географически широко распростра-

ненными видами. Однако в случае, если одна популяция редка или угрожаема, гибридизация может привести к генетическому погружению одной популяции в другую. Примеры интрогрессивной гибридизации редких видов включают такие широко известные виды, как лошадь Пржевальского, гавайскую утку, горное красное дерево, юго-западную форель и красного волка [12].

В глобальном масштабе феномен гибридизации сыграл критическую роль в эволюции жизни на нашей планете: первые клетки сформировались, когда объединились (чтобы иметь общий метаболизм) разные молекулы РНК; эукариоты возникли через симбиоз митохондрий, хлоропластов и некоторых компонентов ядерного генома. Преобладают два подхода в теоретической модели межвидовой гибридизации: “ботанический” (уделяющий особое внимание гибридогенному формообразованию, его реальности, важности относительно других видообразовательных процессов и т.п.) и “зоологический” (концентрирующий на вопросах номенклатуры и классификации, например, о таксономическом статусе гибридизующих форм). Некоторые авторы выделяют отдельно проблемы формирования изолирующих механизмов (так как гибридизация – временное нарушение изолирующих барьеров). Первыми, кто предпринял попытку понять генетические основы репродуктивной изоляции, были Добржанский и Майр, однако до сих пор в этой области остается множество нерешенных вопросов (цит. по [19]).

Что касается эволюционной значимости естественной гибридизации, здесь чаще всего обсуждается два типа вопросов, касающиеся филогенетического распространения и адаптивной природы данного процесса. Если естественная гибридизация была достаточно широким эволюционным явлением, то (как ее генетические последствия) таксоны гибридного происхождения должны обладать комбинацией генетических маркеров, диагностических для родительских таксонов, а также несоответствием между их (маркерами) филогенетическими историями. Исследование генетической изменчивости в современных гибридных популяциях может привести к установлению процессов, которые привели к ретикуляции. Например, анализ современных потоков генов между гибридизующими таксонами выявил как ограниченную, так и рассеянную интрогрессию по различным молекулярным, биохимическим, хромосомным и морфологическим характеристикам. Часто оценки генного потока между гибридизующими таксонами варьируют для различных маркеров, поэтому репродуктивные барьеры были названы полупроницаемыми [13].

Каковы возможные последствия естественной гибридизации и сопровождающей ее интрогрессии? Как крайние варианты произойдет либо сли-

яние гибридизующих форм, либо усиление репродуктивных барьеров через ассортативное скрещивание (1). Возможно получение более или менее приспособленных генотипов, позволяющих интрогрессивным формам расширяться в новые места обитания (2). Гибридные особи окажутся предпочтительно привлекаемыми для паразитических видов, что ограничивает их адаптации к родительским индивидам (3). Естественная гибридизация, наконец, приведет к формированию гибридных видов. Этот процесс может включать полиплоидию, партеногенез, гибридогенез, или гомоплоидное (диплоидное) видообразование (4). Другими словами, интрогрессивная гибридизация может рассматриваться как потенциальный источник новой, ранее не существовавшей генетической изменчивости, а как крайний вариант – формирование гибридных сообществ, в которых гены от родительских гибридов распределены случайно, или новых таксонов [13]. Исследования микро- и макроэволюционных последствий естественной гибридизации способствуют прояснению роли, которую она играла в эволюции современных и исчезнувших таксонов. Однако ни филогенетический, ни генетический анализ современных гибридных ассоциаций не могут окончательно выявить влияние естественной гибридизации на специфические фенотипы. Для этого необходимо определить относительную приспособленность родительских и гибридных таксонов в различных экспериментальных и природных условиях [13, 30].

Межвидовая, и даже межродовая, гибридизация у птиц (особенно водоплавающих) встречается чаще, чем в других классах позвоночных: 883 вида птиц, т.е. около 10% мировой орнитофауны, способно гибридизовать и давать жизнеспособные гибриды [6]. Ярким примером быстрого перемешивания генных пулов является скрещивание обыкновенной кряквы (*Anas platyrhynchos*) с американской (*A. rufripes*) и австралийской (*A. superciliosa*) черными утками. Последствия такой гибридизации весьма впечатляющи: 50% смешанных популяций уток Новой Зеландии (куда кряква была интродуцирована в начале прошлого века) составляют гибриды и менее 5% – фенотипически черные утки. В последние 50 лет отмечается проникновение черной кряквы на юг Приморья, и связывается это с изменением окружающей среды: общее потепление, осушение болот, возрастание антропогенного пресса и т.п. Согласно данным RAPD-PCR анализа, между обыкновенной кряквой (*A. platyrhynchos*) (охотничий вид) и черной кряквой (*A. rosciliorhyncha*), занесенной в региональную Красную книгу, возможна интрогрессивная гибридизация [5, 60]. Это означает, что в перспективе на российском Дальнем Востоке возможно развитие сценария, аналогичного ранее описанному для близких форм Северной Америки, Австралии и Новой Зеландии, когда

поглощается вид, гибридизующий с обыкновенной кряквой.

Интрогрессивная гибридизация задокументирована у многих представителей широко мигрирующих видов, включая псовых: эфиопского волка, серого волка из Миннесоты и восточной Канады, койота и т.д. Доказано, что из-за высокой подвижности этих животных межвидовая гибридизация приведет к генетической интрогрессии на больших пространствах, угрожая генетической интеграцией редким видам. Так, в Африке гибридизация с домашними собаками может обеднить уникальные генетические черты самой большой из оставшихся популяций эфиопского шакала (*Canis simensis*) – возможно, наиболее редкого вида рода, по морфологии и структуре стаи похожего на волка. Как показал филогенетический анализ мтДНК, шакал, действительно, очень близок к африканскому серому волку и койоту. Поэтому высказывается предположение, что он является реликтом, сохранившимся (всего на 5% от прежнего ареала) после плейстоценовой инвазии волкоподобного прародителя в Восточную Африку. В голоцене шакал, видимо, процветал, свои места обитания он стал терять позже вследствие роста популяции и агропромышленной деятельности человека [87].

Недавно установлено, что гибридизация между домашними и дикими видами псовых происходит даже в том случае, если последние находятся в относительном избытке. Поэтому гибридизация угрожает устойчивости популяций диких представителей *Canidae* в значительно большей мере, чем предполагалось ранее [12]. Главная задача генетики в данной ситуации – выявление дискриминирующих молекулярных маркеров, поскольку генетически исследуемые чистые формы и их гибриды фенотипически почти не отличаются друг от друга.

Таким образом, биоразнообразие может быть потеряно, когда генетическая изменчивость внутри вида нарушается через гибридизацию. Интербридинг популяций будет разрушать генетическую изменчивость, так как высоко подразделенные популяции составляют больше генетического разнообразия во времени, чем панмиктические популяции того же размера. Гибридизация генетически различных популяций нежелательна, поскольку сталкивается с естественным процессом дифференциации и видообразования, что может потенциально мешать локальной адаптации или приводить к аутбредной депрессии [83]. Все это необходимо учитывать при разработке восстановительных программ редких видов.

Часто межвидовая гибридизация происходит у рыб, причем многие случаи установлены благодаря молекулярно-генетическим исследованиям. Например, у видов карповых интрогрессивная ги-

бридизация происходит между *Luxilus chrysocephalus* и *L. cornutus*, у форелей гибридизуют *Oncochynchus apache* и *O. gilae* с *O. mykiss* [30]. Возможность молекулярной идентификации гибридных особей является мощным инструментом не только в генетике редких видов, но и в сертификации коммерческих продуктов, причем иногда эти проблемы переплетаются, например у осетров [26].

Другая сторона проблемы касается гибридизации редких и исчезающих видов в связи с международным кодом Зоологической номенклатуры. Некоторые специалисты считают, что гибриды не должны быть защищены так же, как исчезающие виды/популяции, и не могут быть признаны как формальные таксоны. В свете этой проблемы сохранение, например, красного волка (*Canis rufus*), весьма проблематично, поскольку формально он не попадает под определение эволюционно значимых групп особей (т.е. монофилетичных по мтДНК и существенно дифференцированных по частотам аллелей ядерных локусов). Тем не менее это животное достаточно уникально [71, 87].

#### ПРОБЛЕМЫ СКРЕЩИВАНИЯ В НЕВОЛЕ И РЕИНТРОДУКЦИИ ВИДОВ В ПРИРОДУ

Проблема гибридизации существует также, когда редкие виды размножаются в неволе. Цели программ по разведению в неволе редких видов включают увеличение числа индивидуумов, сохранение максимального генетического разнообразия внутри популяции и использование этих колоний для восстановления жизнеспособности природных популяций. Разработанные стратегии по сохранению биологического разнообразия внутри популяций включают скрещивание для сохранения редких аллелей, идентифицированных молекулярными маркерами, и гибридизацию для достижения максимума генетического разнообразия в генах гистосовместимости [62]. Простота разведения в неволе кажущаяся. В действительности, здесь также может происходить два типа депрессий: инбредная и аутбредная. Инбредная депрессия является прямой угрозой выживания, так как сопровождается общим падением генетического разнообразия вследствие утраты редких аллелей, снижения гетерозиготности и усиления генетического дрейфа. В случае приспособления к такой ситуации малые популяции подвергаются еще большему риску при появлении реальной возможности включения новых генов [24]. Генетические маркеры способны обеспечить механизм идентификации оптимальных условий для скрещивания, т.е. когда географически дивергированные выборки являются генетически совместимыми [16].

Одна из основных проблем разведения редких видов связана с невозможностью или крайними ограничениями их размножения в неволе. Осо-



бенную важность проблема приобрела для дальневосточного леопарда (*Panthera pardus orientalis*), который является одним из редчайших видов кошек не только российской, но и мировой фауны. В Красной книге МСОП (Международного союза охраны природы) он занесен в категорию № 1 как находящийся под явной угрозой исчезновения. В природе, по разным оценкам, осталось не более 50–70 особей данного подвида, из них 20–30 кошек обитают на юге Приморья. Если не принять экстренных мер, южно-приморская популяция может исчезнуть в скором времени (как это случилось с яванским тигром). Улучшить ситуацию помогла бы реинтродукция особей, рожденных в неволе. В настоящее время европейские зоопарки (участвующие в международной программе разведения *P. p. orientalis* в неволе) имеют всего девять особей, которых можно считать чистокровными. Большая же часть этих животных в зоопарках мира и частных коллекциях являются потомками самца, занесенного в международную племенную книгу под № 2. Они обнаруживают наличие ряда признаков, дающих серьезные основания сомневаться в принадлежности этого самца к дальневосточному подвиду. Поэтому основная цель разведения дальневосточного леопарда в неволе направлена на вытеснение генов основателя № 2 [9, 76].

Непременным последствием искусственного размножения (включая восстановительные программы) является резкое снижение общего генетического разнообразия. Влияние деятельности человека на генетическую структуру популяций особенно разнообразно в отношении рыб: их уничтожают, виды искусственно разводят, реинтродуцируют и перемещают. Как правило, проводится это без учета влияния на генетическое разнообразие биологических ресурсов. Ретроспективный анализ требует изучения изменчивости на уровне ДНК, причем в сравнении с музейным и ископаемым материалом, поскольку такая информация позволяет установить исторический эффективный размер популяции ( $N_e$ ), что является ключевым моментом в стратегии сохранения генетического разнообразия и ценной информацией для программ скрещивания и перемещения видов. Убедительные данные снижения генетического разнообразия получены при исследовании интродуцированных стад некоторых лососевых рыб [1, 72].

Заметим, что виды, являющиеся объектами охоты или промысла, имеют особую уязвимость и высокие шансы резко перейти в категорию редких и исчезающих. Например, атлантический лосось *Salmo salar* бассейна Балтийского моря десятилетиями подвергался не только интенсивному лову, но также воздействиям мощных плотин и дамб. В результате вид исчез из большинства (65 из 90) рек, являющихся историческими местами

его обитания. Анализ семи локусов микросателлитной ДНК балтийского лосося показал, что в искусственных стадах (разводимых в течение 30–40 лет) достоверно изменились аллельные частоты, в то время как дикая популяция (за 56 лет) практически осталась в неизменном состоянии. Одновременно в искусственных популяциях снизилось аллельное разнообразие (в среднем на 15.7%). Гетерозиготность стала ниже (на 6.6%) только в одной из искусственных популяций. Эффективный размер генераций искусственного стада (в последние 30 лет) оценен на порядок ниже, чем дикого (в последние 60 лет): 80 и 900 особей соответственно. Тем не менее искусственно воспроизводимые стада лосося сохранили достаточно высокую часть генетического разнообразия. Действительно, средние значения потери гетерозиготности на поколение в двух изученных искусственных стадах *S. salar* составили 0.1 и 0.9%, тогда как для инбредной популяции этот показатель должен достигать не менее 1% [72].

Транслокацию видов иногда проводят, чтобы увеличить возможности спортивной охоты и рыбалки, или пополнить пищевые запасы. Наиболее часто она используется для поддержания или увеличения размера локальной популяции, но ее последствия в таких случаях оценить достаточно сложно. Поэтому в таких популяциях целесообразно проводить мониторинг генетических характеристик, особенно если перемещают редкие и исчезающие виды или места перемещения являются трудно доступными и удаленными [23, 82]. Перемещением пользуются также для того, чтобы восстановить или сохранить редкие виды, или “внести” желательные генетические свойства в популяцию [49, 82, 91].

Хотя размножение в неволе и реинтродукцию в природу включает большинство программ по восстановлению и сохранению редких и исчезающих видов, есть основания считать, что их потенциальная опасность оценивается не всеми. Лишь некоторые авторы обсуждают сами планы и их осуществление в деталях. Они указывают, что риск, обусловленный искусственным размножением, иногда оправдан вероятностью исчезновения охраняемых видов без такого рода усилий (как, например, в ситуации с американской пумой).

Перемещение видов приводит к повышенной конкуренции в измененных или фрагментированных местах обитания [82]. Результатом реинтродукции в природу разведенных в неволе особей могут быть необратимые генетические изменения дикой популяции, в том числе потеря редких аллелей, а также безвозвратная потеря исторических (генетически богатых) популяций и эрозия генетического разнообразия внутри вида [15, 88]. Если генный пул интродуцентов нарушит коадап-

тивный генный комплекс или потеряет особенности локальной адаптации, популяции грозит исчезновение из-за аутбридинга. Если такие адаптации имеются, перемещение в неподходящие места может иметь непредвиденно угрожающие последствия для популяции-реципиента [82]. Следует также отметить предостережения некоторых биологов относительно возможности переноса ряда заболеваний и распространения паразитов от рожденных в неволе животных в природную популяцию. Это чревато катастрофическими последствиями, так как у диких животных отсутствуют защитные механизмы против тех паразитических форм и болезней, с которыми они в своей эволюционной истории не сталкивались и которые занесли в их среду обитания интродуцированные особи [44]. Поэтому рекомендовано пополнять дикие популяции в тех случаях, когда нет альтернативных методов, гарантирующих кратковременную жизнеспособность популяции, или когда в истории таксонов имеются неопровержимые свидетельства генных потоков [82], а идентификация единиц сохранения должна быть интегральной частью планов по перемещению видов [27, 43, 90].

Положительным примером реинтродукции видов в природу является американская пума (*Puma concolor*), известная еще как флоридская пантера или горный лев. Демографическое моделирование (включающее такие показатели, как точный возраст, социальная структура, скорость рождения и т.п.) прогнозировало исчезновение американской пумы в течение 25–40 лет [70]. Ознакомившись с совокупностью имеющихся данных, рабочая школа по управлению американской пумой в октябре 1992 г. утвердила две стратегические рекомендации: инициировала программу сохранения в неволе и разработала план интродукции во флоридскую популяцию пум, рожденных в Техасе, поскольку ее критическое состояние требовало срочного генетического “вливания”. Поскольку в XIX веке ареалы этих двух популяций перекрывались, т.е. существовала возможность генетического обмена, популяции вполне могли до сих пор оставаться генетически совместимыми. В настоящее время ситуация с флоридской пантерой стабилизировалась и есть все основания для оптимистических прогнозов ее восстановления (но не без некоторых генетических утрат) [62, 76].

Последствия перемещения изучались на примерах пекана-рыболова *Martes pennanti* (лесного хищника средних размеров, наиболее часто интродуцируемого представителя млекопитающих Северной Америки) [27], канадской казарки (*Branta canadensis occidentalis*) [82], дальневосточного соболя (*Martes zibellia*) [2], косули (*Capreolus capreolus*) [84], европейского зубра (*Bison bonasus*) и бизона (*B. bison*) [7].

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПАТОГЕНОВ

Еще Дарвин отмечал, что инфекционные болезни регулируют рост и выживание популяций, хотя и не соединял болезни с процессом естественного отбора. Первым, кто обратил внимание на эту связь, был Холдейн, подчеркивающий, что право на жизнь получают особи, генетически стойкие относительно инфекций. В настоящее время многие считают, что инфекционные болезни имеют такое же влияние, как любой другой экологический фактор. Вирусы, в особенности ретровирусы, аккумулируют геномные мутации очень быстро: примерно одна мутация на 10 тпн репликации. Эволюционное родство кладов вирусного генома отражает эволюции внутри вида-хозяина, так что существование клада вирусной последовательности с глубокими филогенетическими корнями дивергенции, в общем, указывает на перекрестный межвидовой перенос (цит. по [61]).

В природе большинство микроорганизмов живет в тесной связи и в сообществе с различными организмами. Результаты по разнообразию генов рРНК ясно указывают, что большинство микробных сообществ, особенно ассоциированных с комплексом экологических мест обитания, включает очень высокое число разных организмов, и многие из них до сих пор еще не идентифицированы [74]. Только в 1 мл природной воды обнаружено до  $2.5 \times 10^8$  вирусов. Такие концентрации вирусной инфекции являются важным экологическим фактором для планктонных микроорганизмов, вирусы могут служить посредниками генетических изменений у бактерий, населяющих природные акватории [22].

Первоочередной задачей генетической эпидемиологии является идентификация и изучение генов, которые влияют на особенности болезней, окончательная цель – идентификация и характеристика популяционных факторов, способствующих заболеваниям. Большую роль в генетических исследованиях эпидемиологии играют статистические методы и математическое моделирование. В рамках этих исследований выделяют три раздела генетики: статистическую, теоретическую популяционную и математическую эволюционную, которые охватывают разные временные пласты: 0–250 лет, 100–100 тыс. лет и от 100 тыс. до 1 млн лет и более соответственно [73].

Известно несколько основных направлений, по которым ведутся исследования генетической эпидемиологии. Генетическая демография исследует генетическую структуру, или архитектуру, популяций, характеризует аллельную частоту, частоту заболеваний и экологические факторы или сравнивает эффективный размер популяций и уровень инбридинга, скорости миграции и иммиграции и т.п. (1). В качестве тестирования по-

лиморфизма изучается роль конкретных генов в возникновении и поддержании заболеваний (2). Экогенетика исследует уникальные свойства, которые отличают груз болезней одной популяции от другой (3). Популяционная фармакогенетика направлена на обнаружение генов, чье физиологическое влияние может привести к улучшению лекарств (4). Эволюционная медицинская генетика исследует эволюционную значимость болезней. На этот счет существует множество теорий и, хотя их сложно тестировать, все они имеют важную теоретическую значимость. В рамках данного направления рассматривается, например, как изменчивость в последовательности генома HIV коэволюционировала с геномом человека и других видов, чтобы обеспечить возникновение и поддержание AIDs? Какова роль глобальных экологических изменений на генетическую изменчивость и восприимчивость к болезням? Этот раздел также охватывает изучение эволюции коадаптивных генных комплексов, генов, которые нейтральны у одних видов, но имеют выраженный эффект у человека и т.д. (5) В Национальном институте здоровья США уже запущена программа определения генов, контролирующих ответ на влияние окружающей среды (цит. по [73]).

Анализ первичной последовательности хантавируса (*hantavirus* – вирусы, инфицирующие мелкого грызуна *Peromyscus maniculatus*) с помощью филогенетических программ позволил не только выявить субкластеры этого вируса, родственные определенным географическим популяциям *P. maniculatus*. Использование авторами этих результатов сделало возможным заключение, что все жители Аризоны, умершие от заражения этим вирусом, были инфицированы им в штате Колорадо [60]. Данное направление имеет серьезное значение и перспективу в популяционно-генетических исследованиях как диких животных, так и человека.

За последние два десятилетия в стадах скота Великобритании устойчиво возрастают и распространяются по стране случаи инфекции бычьего туберкулеза (ВТВ, *bovine tuberculous bacterium Mycobacterium bovis*). Предполагается, что евразийский барсук аккумулирует значительную часть природного резерва инфекции ВТВ и передает ее крупному рогатому скоту. Однако причинная связь между инфекцией *M. bovis* барсука и вспышками инфекции туберкулеза у скота оставалась недоказанной (несмотря на множество исследований). Для решения проблемы резонно было остановиться, прежде всего, на доказательстве связи между плотностью популяции барсука и частотой инфекции в стадах скота. В этих целях опробован метод микросателлитного анализа ДНК, выделенной из фекалий барсука. Результаты позволили оценить размер популяции барсука в 24–34 особи, состоящей из трех социальных групп [34].

Этот опыт, полученный на модели для сельскохозяйственных животных, может быть весьма полезен при столкновении с аналогичными проблемами у редких видов.

Определенный интерес представляют микробиологические исследования вымерших экосистем на ископаемом материале. Бактериальная флора составляет незначительную часть сложной кишечной экосистемы, но именно ее изучение может дать ценную информацию о патогенах вымерших животных и человека ледникового периода. Данное направление получило развитие, главным образом, благодаря находкам останков крупных млекопитающих (лошади, мамонты, медведи, саблезубый тигр, львы, волки) в вечной мерзлоте Арктики (коллекции американского Музея естественной истории и канадского Музея природы содержат около 100000 таких скелетных элементов), в пищеварительных трактах которых сохранилась микрофлора. Пионерские работы данного направления проведены на человеке неолитического периода, пролежавшем во льду около 5000 лет – идентифицированы бактерии, принадлежащие родам *Zoogaea*, *Curtobacterium*, *Arthrobacter*, *Desulfotobacterium* и *Sphingobacterium* (цит. по [54]). Из южно-американских и египетских мумий успешно извлекли ДНК туберкулезной палочки *Mycobacterium tuberculosis*. Позже обнаружили ряд других патогенов: *M. leprae*, *Yersinia pestis*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Treponema pallidum*, *Escherichia coli* и *Corynebacterium* spp. (цит. по [93]). Определение ископаемой микробной ДНК дает новый подход для изучения инфекционных болезней, их распространения, частоты и взаимодействия между хозяином и патогеном в популяциях в исторический период времени. Кроме того, данные, полученные на скелетном и мумифицированном материале, представляют важный этап в филогенетическом анализе современных патогенов, их роли в распределении и сохранении биологического разнообразия [93, 94].

#### НЕИНВАЗИВНЫЙ СПОСОБ ВЗЯТИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Ранее широко использовался деструктивный способ, когда убивали животное, чтобы взять ткани, необходимые для генетического анализа. Эта стратегия интенсивно использовалась для изо- и аллозимного анализов и анализа изменчивости мтДНК, но сейчас многие исследователи от нее отказались. Недеструктивный способ более предпочтителен, так как в данном случае животных отлавливают для взятия образцов крови или кусочков кожи, а затем отпускают. Тем не менее они и в этом случае подвергаются стрессу, а также опасности заражения во время взятия биологических проб, поскольку процедура является инвазивной. Некоторые инвазивные стратегии не

требуют отлова животных, например, образцы кожи китов и других крупных животных могут быть получены путем использования для биопсии метательных ружей. При таком способе животные не отлавливаются, что позволяет избежать стрессовых ситуаций.

Материалом для исследований служат также перья (как выщипанные, так и после линьки) и пучки шерсти (ДНК выделяют соответственно из пульпы и луковицы), фекалии, оторванные кусочки пищи и слюна (в этих случаях в выделяемом материале присутствуют клетки слизистых оболочек). Такая ДНК дает возможность амплифицировать последовательности митохондриального генома, а также одиночных локусов ядерного генома, прежде всего – микросателлитов [8, 37, 38, 51, 59, 75, 79–83, 85, 86]. Однако данный, так называемый неинвазивный, способ имеет и серьезные ограничения, обусловленные малым количеством ДНК (пикограммы) и низким ее качеством: исходная ДНК в основном деградирована, поэтому амплифицируются участки, длиной не более 200–300 нуклеотидных пар. Выход малого количества ДНК усугубляется тем, что это приводит к не всегда правильному определению уровня гетерозиготности. Причем, с одной стороны, от гетерозиготной особи можно получить копию только одного из двух аллелей, и определить его как гомозиготу. С другой стороны, что убедительно показано, например, для динуклеотидных микросателлитов [37], артефакты амплификации могут ошибочно трактоваться как истинные аллели. Если такой “ложный” аллель генерирован при гомозиготном локусе, то индивид будет ошибочно причислен к гетерозиготам. Еще одним источником “ложных” аллелей является загрязнение исследуемых препаратов ДНК человека (следы которой могут успешно амплифицироваться в PCR реакциях). Считают, что на долю этих ошибок приходится примерно 5% [39, 79]. Следует также учитывать, что в некоторых случаях одни и те же праймеры амплифицируют разные последовательности, если ДНК выделена из разных тканей. Так, например, область D-петли мтДНК африканского слона успешно проамплифицирована, когда препарат ДНК получали из крови. Однако при использовании ДНК из шерсти этих животных теми же праймерами амплифицировались, в основном, ядерные копии этого участка митохондриального генома [39]. Кроме того, далеко не каждый образец вообще оказывается пригодным для получения ДНК: ее там может не оказаться, либо выделение ДНК предельно затруднено. Тем не менее успехи применения неинвазивного способа взятия проб для генетических исследований редких видов в целях решения экологических, этологических и природоохранных задач очевидны. Этому предшествовало усовершенствование методов консервации биологиче-

ского материала, установление оптимального времени его сбора и хранения, модификация условий проведения PCR, например введение повторных амплификаций для наращивания материала, так называемый “multiple-tube” подход [46, 81].

В полевых условиях наиболее приемлем сбор шерсти для генетических анализов. Такой материал хорошо зарекомендовал себя при исследованиях свободно перемещающихся животных. Так, для тестирования гипотезы о социальной структуре и генном потоке у шимпанзе (*Pan troglodytes*) собирали образцы волос из спальных гнезд. Анализ восьми микросателлитных локусов у 36 особей обнаружил большую близость между самцами (гомозиготность которых оказалась существенно выше ожидаемой по Харди–Вайнбергу), чем самками, что подтвердило гипотезу отбора родственников для эволюции кооперации среди самцов [56]. Исследования канадских бурых медведей продемонстрировали возможность проведения учета численности популяции по генетическим маркерам даже без наблюдения за животными. Пучки шерсти (или отдельные волоски) собирали на колючей проволоке вокруг приманки, а затем анализировали с помощью шести высоко полиморфных микросателлитов. Причем необходимости в “multiple-tube” подходе не было, так как пучок из нескольких волосков давал достаточно высокий выход ДНК [91]. Таким же способом был установлен размер популяции койота (*Canis latrans*) в горах Санта Моника (Калифорния) [46].

Однако в некоторых случаях использование волосков ограничено, а экскременты представляют идеальную альтернативу. Как правило, они обнаруживаются в достаточном количестве, а 1 г содержит большое количество ДНК хозяина, заключенной в миллионах клеток слизистой оболочки кишечника [86]. Поэтому наиболее широко используемым источником получения ДНК при неинвазивном отборе биологических проб являются именно экскременты животных. Использование экскрементов для генетических целей сразу привлекло внимание исследователей и вызвало оживленные дискуссии. Убедительные доказательства пригодности такого источника ДНК получили при тестировании микросателлитов саванного бабуина [20]. Генотипирование 12 индивидов по восьми локусам (всего поставили 515 амплификаций) показало, что ДНК из экскрементов амплифицировалась в 79, а ДНК из крови – в 97% опытов. Ошибки в амплификации составили соответственно 8 и 1%, однако результаты идентификации особей совпадали на 98%.

Авторы отмечают, что результаты технологии использования ДНК экскрементов зависят от ряда условий [86]. ДНК, предназначенная для ам-

плификации, должна иметь достаточные число копий и размер (1). Необходимо получить подтверждение, что ДНК из экскрементов идентична ДНК из крови или других тканей исследуемого животного (2). Требуется удаление веществ, загрязняющих образцы. Например, в экскрементах медведя может содержаться до десяти волосков другого родственного вида (3). Должны быть приняты меры для предотвращения деградации образцов (как в экспедиции, так и в лаборатории). Для этого существует несколько способов консервации биологических проб: высушивание, замораживание, фиксация в этаноле, хранение в силикагеле (двуокись кремния) или в специальных буферных системах (LST – Queen's Lyssis Buffer, L6 Buffer, Gerloff Buffer, QLB Buffer) (4). Необходимо удалить ингибиторы, содержащиеся в диете. Чтобы установить, есть ли ингибиторы в препаратах ДНК из экскрементов, их смешивают в равных количествах с ДНК из крови. Отсутствие или снижение амплификации в таких препаратах указывает на наличие ингибиторов, от которых обычно избавляются при помощи стандартных наборов (Geneclean Spin Kit, Bio 101) (5).

Применение такой технологии с использованием данных полевых исследований размеров трекков и молекулярных данных (анализа микросателлитной и У-специфичной ДНК) позволило определить число, пол и территорию пиренейского бурого медведя (*Ursus arctos*). Только 36 из 247 образцов волос и 21 из 105 образцов фекалий обеспечили достаточный выход ДНК для полного генетического анализа по всем полиморфным локусам. Из-за очень низкого полиморфизма (только шесть из 24 исследованных локусов были полиморфными по двум аллелям) два индивида удалось идентифицировать лишь после привлечения к генетическим результатам данных полевых наблюдений. Работа продемонстрировала, что один неинвазивный генетический подход не всегда может быть успешным в идентификации особей из популяций с пониженной генетической изменчивостью [79].

Кроме этого, анализ ДНК экскрементов нашел применение в изучении диеты хищников [18, 78]. Взаимодействия между хищником и жертвой являются важнейшим процессом, контролирующим изменения в популяциях животных, и, следовательно – центральным во многих экологических исследованиях. Если для специализированных видов диета мало отличается и идентифицировать жертву обычно несложно, то ситуация с хищниками-генералистами совсем иная. Еще больше она осложняется при исследовании мелких животных, таких как жуки, клещи и т.п. Обычно для идентификации диеты хищника пользовались моноклональными антителами, которые имеют разные таксономические уровни специфичности (род, вид, внутривидовые сообщества). Однако

этот подход имеет, по крайней мере, два недостатка: высокая стоимость и трудоемкость метода (можно потратить год, чтобы получить необходимый клон), а также недостаточно высокая достоверность результатов в ряде исследований.

Таким образом, генетика сохранения видов (биологического разнообразия) обеспечивает получение необходимой информации, направленной на разрешение проблем, связанных с управлением биоразнообразия, и затрагивает широкий диапазон прикладных программ, методов сбора материала в экспедициях и т.п. Генетика редких видов дорога, трудоемка, требует значительной экспертизы и преодоления многих проблем. Для ее успеха необходимо коллегиальное усилие зоологов, систематиков, экологов и генетиков, поиск и развитие наиболее перспективных направлений. Использование молекулярно-генетических технологий для ответов на трудно решаемые вопросы биологии сохранения продолжает расширяться. Связано это, прежде всего, с возможностями техники PCR, которая открыла новые перспективы для увеличения способов сбора биологического материала с целью получения ДНК, раздвинула временные и пространственные границы генетических исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 287 с.
2. Балмьшева Н.П., Соловечук Л.Л. // Генетика. 1999. Т. 35. С. 1252.
3. Кайданов Л.З. Генетика популяций. М.: Высш. шк., 1996. 320 с.
4. Красилов В.А. Охрана природы: принципы, проблемы, приоритеты. М.: Институт охраны природы и заповедного дела, 1992. 174 с.
5. Куликова И.В., Челомина Г.Н., Журавлев Ю.Н. // Генетика. 2003. Т. 39. С. 1353.
6. Панов Е.Н. Гибридизация и этологическая изоляция у птиц. М.: Наука, 1989. 509 с.
7. Семенова С.К., Васильев В.А., Морозова Е.В., Слынько А.В., Стеклкнев Е.П., Белоусова И.П., Кудрявцев И.В., Рысков А.П. // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1535.
8. Холодова М.В., Истон Э., Милнер-Гулланд Э.Дж. // Изв. РАН. Серия биол. 2000. № 6. С. 695.
9. Челомина Г.Н., Спиридонова Л.Н., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Челомин Ю.В., Журавлев Ю.Н. // Генетика. 1999. Т. 35. С. 681.
10. Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. М.: Наука, 1980. 278 с.
11. Яблоков А.В. Популяционная биология. М.: Высш. шк., 1987. 303 с.
12. Adams J.R., Leonard J.A., Waits L.P. // Mol. Ecol. 2003. V. 12. P. 541.

13. Arnold M.L. // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1992. V. 23. P. 237.
14. Avise J.C. // Conservation Genetics. Menlo Park, CA: Benjamin / Cummings, 1996. P. 1.
15. Avise J.C., Hamrick J.L. Conservation Genetics. Chapman and Hall, N.Y.: 1996. 512 p.
16. Baker R.J. // J. Mammol. 1994. V. 75. P. 277.
17. Balakrishnan C.N., Monfort S.L., Gaur A., Singh L., Sorenson M.D. // Mol. Ecol. 2003. V. 12. P. 1.
18. Banks S.C., Horsup A., Wilton A.N., Taylor A.C. // Mol. Ecol. 2003. V. 12. P. 1663.
19. Barton N.H. // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 551.
20. Bayes M.K., Smith K.L., Alberts S.C., Altmann J., Bruford M.W. // Cons. Genetics. 2000. V. 1. P. 173.
21. Beheregaray L.B., Ciofi C., Caccone A., Gibbs J.P., Powell J.R. // Cons. Genetics. 2003. V. 4. P. 31.
22. Bergh O., Borsheim K.Y., Bratbak G., Haldal M. // Nature. 1989. V. 340. P. 467.
23. Bodkin J.L., Ballachey B.E., Cronin M.A., Scribner K.T. // Cons. Biol. 2000. V. 13. P. 1378.
24. Chepko-Sade B.D., Halpin Z.T. Mammalian Dispersal Patterns. Chicago: Univ. Chicago Press, 1987.
25. Comstock K.E., Georgiadis N., Pecon-Slattery J., Roca A.L., Ostrander E.A., O'Brien S.J., Wasser S.K. // Mol. Ecol. 2002. V. 11. P. 2489.
26. Congiu L., Dupanloup I., Patarnello T., Fontana F., Rossi R., Arlati G., Zane L. // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 2355.
27. Drew R.E., Hallett J.G., Aubry K.B., Cullings K.W., Koepf S.M., Zielinski W.J. // Mol. Ecol. 2003. V. 12. P. 51.
28. Durant S.M., Mace G.M. // Creative conservation: Interactive management of wild and captive animals. London: Chapman and Hall, 1994. P. 67.
29. Eizirik E., Kim J-H., Menotti-Raymond M., Crawshaw P.G., O'Brien S.J., Johnson W.E. // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 65.
30. Esa Y.B., Waters J.M., Wallis G.P. // Cons. Genetics. 2000. V. 1. P. 329.
31. Firestone K.B., Elphinstone M., Sherwin W.B., Houlden B.A. // Mol. Ecol. 1999. V. 8. P. 1613.
32. Firestone K.B., Houlden B.A., Sherwin W.B., Geffen E. // Cons. Genetics. 2000. V. 1. P. 115.
33. Flather C.H., Wilson K.R., Dean D.J., McComb W.C. // Ecol. Applic. 1997. V. 7. P. 531.
34. Frantz A.C., Pope L.C., Carpenter P.J., Roper T.J., Wilson G.J., Delahay R.J., Burke T. // Mol. Ecol. 2003. V. 12. P. 1649.
35. Gilpin M., Soule M. // Conservation Biology / Ed. Soule M. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associated, 1986. P. 19.
36. Goodman S.J., Tamate H.B., Wilson R., Nagata J., Tatsuzawa S., Swanson G.M., Pemberton J.M., McCullough D.R. // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 1357.
37. Goossens B., Chikhi L., Utami S.S., Ruiter J., Bruford M. // Cons. Genetics. 2000. V. 1. P. 157.
38. Goossens B., Waits L.P., Taberlet P. // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 1237.
39. Greenwood A.D., Paabo S. // Mol. Ecol. 1999. V. 8. P. 133.
40. Haavie J., Saetre G.P., Moum T. // Mol. Ecol. 2000. V. 9. P. 1137.
41. Haig S.M., Avise J.C. // Conservation Genetics: Case Histories from Nature. N.Y.: Chapman and Hall, 1996. P. 160.
42. Hedrick P.W. // Cons. Biol. 1996. V. 10. P. 897.
43. Holsinger K.E. // Evolution. 1996. V. 50. P. 2558.
44. Johnson B.O., Jensen A.J. // J. Fish. Biol. 1986. V. 29. P. 233.
45. Keogh S.J., Scott I.A.W., Shine R. // Cons. Genetics. 2003. V. 4. P. 57.
46. Kohn M.H., York E.C., Kamradt D.A., Haught G., Sauvajot R.M., Wayne R.K. // Proc. Royal Soc. L., Series B: Biol. Sci. V. 266. P. 657.
47. Kremen C. // Ecol. Applic. 1992. V. 2. P. 203.
48. Lawler J.J., White D., Sifneos J.C., Master L.L. // Cons. Biol. 2003. V. 17. P. 875.
49. Leberg P.L. // Cons. Biol. 1993. V. 7. P. 194.
50. Leberg P.L. // Mol. Ecol. 2002. V. 11. P. 2445.
51. Lucchini V., Fabbri E., Marucco F., Ricci S., Boitani L., Randi E. // Mol. Ecol. 2002. V. 11. P. 857.
52. Luikart G., Cornuet J.M., Allendorf F.W. // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 963.
53. Luikart G., Shervin W.B., Steele B.M., Allendorf F.W. // Cons. Biol. 1999. V. 13. P. 523.
54. Marota I., Rollo F. // Cell. Molec. Life Sci. 2002. V. 59. P. 97.
55. Miththpala S., Seidensticker J., O'Brien S.J. // Cons. Biol. 1996. V. 10. P. 1115.
56. Morin P.A., Wallis J., Moore J.J., Woodruff D.S. // Mol. Ecol. 1994. V. 3. P. 469.
57. Moritz C. // Trends Ecol. Evol. 1994. V. 9. P. 373.
58. Moritz C., Lavery S., Slade R. // American Fisheries Society Symposium. 1995. V. 17. P. 249.
59. Murphy M.A., Waits L.P., Kendall K.C., Wasser S.K., Higbee J.A., Bogden R. // Cons. Genetics. 2002. V. 3. P. 435.
60. Novikova S.M., Chelomina G.N., Zhuravlev Yu.N. // Proc. Intern. Conf. "Biodiversity and Dynamics Ecosystems in North Eurasia". 2000. V. 1. P. 79.
61. O'Brien S.J. // Annu. Rev. Genet. 1994. V. 28. P. 467.
62. O'Brien S.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 5748.
63. O'Brien S.J., Roelke M.E., Marker R., Newman A., Winkler C.A., Meltzer D., Colly L., Evermann J.F., Bush M., Wildt D.E. // Science. 1985. V. 227. P. 1428.
64. O'Brien S.J., Wildt D.E., Bush M., Caro T.M., FitzGibbon C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 508.
65. O'Brien S.J., Everman J.F. // Trends Ecol. Evol. 1988. V. 3. № 10. P. 254.
66. Petit R.J., Mousadik E.I., Pons O. // Cons. Biol. 1998. V. 12. P. 844.
67. Ralls K., Ballou J.D., Templeton A. // Cons. Biol. 1988. V. 2. P. 185.
68. Raven P.H., Wilson E.O. // Science. 1992. V. 258. P. 1099.
69. Reed D., Lowe E.H., Briscoe D.A., Frankham R. // Cons. Genetics. 2003. V. 4. P. 405.