

УДК 575.174.015.3: 599.742.712

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АМУРСКОГО ТИГРА (*PANTHERA TIGRIS ALTAICA*): ЕСТЬ ЛИ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ XX И НАЧАЛОМ XXI ВЕКА?

© 2023 г. П. А. Сорокин¹, В. Г. Юдин², член-корреспондент С. В. Найденов¹,
Х. А. Эрнандес-Бланко¹, М. Д. Чистополова¹, академик РАН В. В. Рожнов^{1,*}

Поступило 30.03.2023 г.
После доработки 18.06.2023 г.
Принято к публикации 19.06.2023 г.

Проанализирован полиморфизм 9 микросателлитных локусов сихотэ-алинской популяции тигра в современный и недавний исторический период с использованием крови, экскрементов и музейных костных образцов. Тесты на прохождение популяцией периода низкой численности при анализе избытка гетерозигот и низкое значение коэффициента Гарза-Вильямсона указывают на высокую вероятность таких событий в недавнем и в историческом прошлом. Средний эффективный размер популяции N_e для современной выборки составил 34.4 (95% интервал 17–106.8). Полученные данные представляют большой интерес для сохранения и восстановления крупных видов кошачьих, находящихся под угрозой исчезновения.

Ключевые слова: сихотэ-алинская популяция, историческая и современная выборки, бутылочное горлышко

DOI: 10.31857/S268673892360019X, EDN: PHZCOG

В течение XX в. в состоянии популяции амурского тигра, *Panthera tigris altaica* (Temminck, 1844) и его ареала происходили большие изменения. Обобщение данных о регистрациях амурского тигра, приведенных в различных источниках, позволило составить карту ареала этого подвида и его динамики на протяжении столетнего периода [1]. Исторически тигр был распространен довольно широко (рис. 1), его ареал охватывал Северо-Восточный Китай, Приморский край, юг Хабаровского края, Еврейскую автономную и Амурскую области, отдельные звери доходили до Забайкалья. К настоящему времени ареал сильно сократился и стал фрагментированным.

Соответственно изменениям в распространении амурского тигра происходили и драматические изменения его численности. Существует устойчивое мнение о том, что в результате истребления численность тигра в 1940-е гг. достигла минимальных значений – 30–40 особей [2], а затем она за короткое время значительно увеличи-

лась до 500 особей к 1990-м гг. [3] и до 523–540 к 2015 г. [4].

Насколько произошедшие события отразились на генетической изменчивости амурского тигра? Этот вопрос определил цель нашей работы – сравнение генетической изменчивости амурского тигра в исторической ретроспективе – в XX в. и начале XXI в.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования проведен молекулярно-генетический анализ ДНК, выделенной из музейных образцов черепов амурского тигра, хранящихся в коллекциях Зоологического музея МГУ и Зоологического института РАН, и проб экскрементов, волос и крови животных этого вида, собранных нами в ходе выполнения “Программы изучения амурского тигра на Российском Дальнем Востоке” в рамках Постоянно действующей экспедиции РАН по изучению животных Красной книги Российской Федерации и других особо важных животных фауны России.

Проанализирован 61 образец от черепов амурских тигров, собранных в период с 1938 по 1994 г. в Хабаровском и Приморском краях (табл. 1). Эти образцы представляли историческую выборку. Для дальнейшего сравнения с данными от 44 животных из современной выборки 2009–

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

²Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

*e-mail: rozhnov-v-2015@yandex.ru

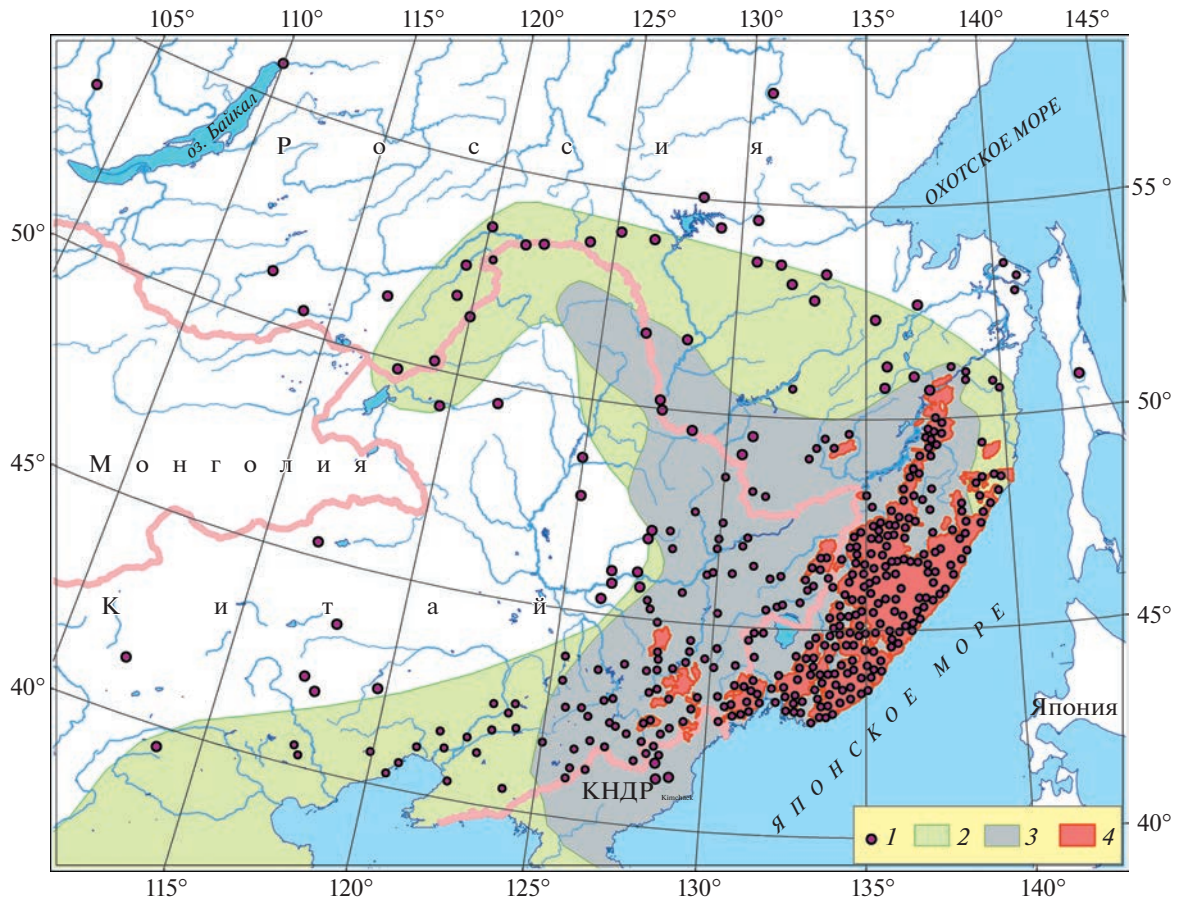


Рис. 1. Распространение амурского тигра [1]: 1 – места встреч амурского тигра в историческое время (по данным литературы), 2 – исторический ареал амурского тигра, 3 – границы ареала в конце XIX в., 4 – современный ареал амурского тигра.

2013 гг., опубликованными ранее [5], использованы результаты молекулярно-генетического анализа музейных образцов только от 22 амурских тигров с наиболее полными генетическими профилями. Результаты молекулярно-генетического анализа этих образцов отражают генетическую изменчивость этого подвида в 1938–1994 гг. XX в.

Для исторической и современной выборки исследование проведено на одних и тех же микросателлитных локусах только на территории сихотэалинской субпопуляции (рис. 2).

Пробы костной ткани брали из нижней челюсти с помощью дрели Проххон (Германия) и сверла по металлу диаметром 1–1.2 мм. Измельченную костную ткань хранили при –20°С. Выделение ДНК проводили с помощью набора QIAamp DNA investigator kit (Qiagen, Германия) по протоколу выделения ДНК из костной ткани.

Ядерную ДНК анализировали по описанной ранее методике [5]. ПЦР со всеми праймерами повторяли 4 раза. Обобщенный генотип животных принимали, если гетерозиготные аллели повторялись дважды, а гомозиготные трижды. Изменения в частоте встречаемости аллелей опреде-

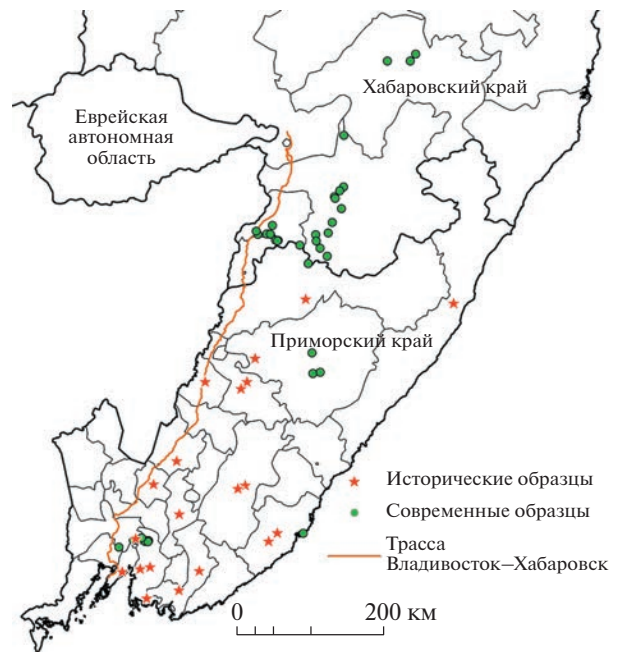


Рис. 2. Места сбора черепов из музейных коллекций и проб амурского тигра для генетического анализа.

Таблица 1. Исторические музейные образцы особей амурского тигра (*Panthera tigris altaica*), использованные для молекулярно-генетического анализа

Образец	Дата добычи	Место добычи и хранения
36332	19.12.1981	Приморский край, Спасский р-н, с. Нововладимировка
36333	1978	Приморский край, Тернейский р-н
36335	Февраль 1980	Приморский край, Ольгинский р-н
36336	14.01.1987	Приморский край, Хасанский р-н
36342	12.10.1981	Приморский край, Шкотовский р-н,
36345	27.11.1991	Приморский край, Партизанский р-н, с. Новое
36347	1993–1994	Приморский край, Лесозаводской р-н
36351	Февраль 1984	Приморский край, Пожарский р-н, с. Красный яр
36353	10.11.1981	Приморский край, Ольгинский р-н
36354	1983–1984	Приморский край, Чугуевский р-н
36358	1965	Приморский край, Иманский р-н
36361	12.01.1987	Приморский край, Шкотовский р-н, с. Смоляниново
36367	17.11.1982	Приморский край, Черниговский р-н, с. Горный хутор
36371	21.01.1986	Приморский край, Уссурийский з-к
36375	Апрель 1984	Приморский край, Анучинский р-н
36376	Январь 1988	Приморский край, Чугуевский р-н
36379	07.04.1984	Приморский край, Партизанский р-н
36380	28.12.1986	Приморский край, около Владивостока
s34855	1938	Приморский край, Красноармейский р-н, с. Новопокровка, коллекция Зоологического музея МГУ
s91581	1966	Приморский край, Находка, коллекция Зоологического музея МГУ
s96811	1972	Приморский край, Лазовский р-н, коллекция Зоологического музея МГУ
s100000	Февраль 1974	Приморский край, Дальнереченский р-н, коллекция Зоологического музея МГУ

Образцы № 36332–36380, хранящиеся в коллекции Зоологического института РАН, собраны В.Г. Юдиным.

ляли с помощью критерия Фишера, принимая достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Прохождение популяцией бутылочного горлышка оценивали, используя тесты для определения избытка гетерозигот в программе Bottleneck, v.1.2.0.2 и моделями мутаций I.A.M., T.P.M. и S.M.M. [6]. Ожидаемую гетерозиготность (H_e), наблюдаемую гетерозиготность (H_o) и M-статистику [7] рассчитывали в программе Arlequin v3.5.1.2. [8]. Эффективный размер популяции N_e рассчитывали методом linkage disequilibrium (LD) в программе NeEstimator V2 [9]. Аллельное разнообразие (allelic richness) рассчитывали в программе Fstat 294 [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего получены генетические профили для 22 музейных и 44 современных особей амурского тигра.

Для амурского тигра нами получены данные по частотам 9 микросателлитных локусов (табл. 2), аллельному разнообразию (A_r), ожидаемой гетерозиготности (H_e), наблюдаемой гетерозиготности (H_o) и значение коэффициента Гарза-Вильямсона (M) (табл. 3).

Уменьшение аллельного разнообразия A_r при резком уменьшении численности приводит к уменьшению редких аллелей [11]. Анализ иссле-

Таблица 2. Частоты аллелей (%) 9 микросателлитных локусов в сихотэ-алинской субпопуляции

Локус	Аллель	Современная выборка	Историческая выборка
e7	150	6.10	6.82
	152	90.24	90.91
	156	3.66	2.27
fca304	128	33.33	20.45
	134	34.52	45.45
	136	32.14	34.09
fca43	117	0	4.55
	119	11.36	18.18
	123*	59.09	38.64
	127	29.55	38.64
e21b	160	63.64	59.52
	162	13.94	21.43
	164	22.73	19.05
pun935	102	64	59.09
	108	34.67	31.82
	120	1.33	2.27
	124	0	6.82
fca5	139*	38.64	61.36
	141	36.36	25.00
	143*	25.00	9.09
	145	0	4.55
fca161	184	4.65	15.00
	188	1.16	0
	190*	70.93	45.00
	192*	23.26	40.00
fca91	134	2.50	0
	140	73.75	86.84
	144	23.75	13.16
fca441	144	15.85	15.91
	148	30.49	36.36
	152	32.93	25.00
	156	3.66	0
	160	15.85	18.18
	164	1.22	4.55

* – аллели, частота встречаемости которых достоверно отличается в разных выборках.

двух выборок показал его увеличение на одну аллель для 3 локусов и уменьшение также для 3 локусов (табл. 3). Во всех случаях частоты таких аллелей были меньше 7%. Разнонаправленное изменение значений аллельного разнообразия свидетельствует о том, что выборка проанализированных образцов, по-видимому, не в полной мере отражает генетическое разнообразие исследуе-

мой популяции в разные исторические периоды, так как увеличение числа аллелей в современной выборке по сравнению с исторической в данные малые периоды времени могло произойти только за счет миграций и не могло появиться за счет накопления мутаций в геноме. Достоверное изменение частот аллелей между двумя выборками отмечено для 5 аллелей из 3 локусов.

Эффективный размер популяции (N_e), рассчитанный для исторической выборки, составил 11.4 (95% интервал 5.1–28.8), для современной – 34.4 (95% интервал 17–106.8). Сравнимое значение N_e , рассчитанное LD методом для выборки 2001–2002 гг., составило 26 животных (95% интервал 12–79) [12]. Значительно более низкий эффективный размер популяции для исторической выборки может свидетельствовать о значительно меньшей численности популяции в этот период по сравнению с современной.

Анализ прохождения популяцией бутылочно-горлышка по современной выборке по тесту Вилкоксона (Wilcoxon test) при анализе избытка гетерозигот показывает достоверные результаты по всем мутационным моделям I.A.M. ($P = 0.00098$), T.P.M. ($P = 0.00098$), S.M.M. ($P = 0.00098$). По исторической выборке по моделям I.A.M. ($P = 0.00098$) T.P.M. ($P = 0.00098$), S.M.M. ($P = 0.00195$) результаты аналогичные. Другие тесты также подтверждают наличие бутылочного горлышка в недавнем историческом прошлом. Достоверное значение теста Вилкоксона при анализе избытка гетерозигот по мутационной модели T.P.M. ($P < 0.001$) обнаружено также для современной выборки из 15 животных 1999–2000 гг. [13].

Коэффициент M для теста Гарза-Вильямсона, оценивающий бутылочное горлышко в более раннем историческом периоде (больше 100 поколений назад), для обеих выборок составил 0.38, что значительно ниже пороговой величины $M = 0.68$, характерной для предположительно стабильных популяций [7]. В других исследованиях бутылочное горлышко в этот период не подтверждается, при этом значение M составило 0.67 [12] и 0.835 [13]. По данным митохондриальной ДНК в современной популяции описано 3 гаплотипа, что также подтверждает бутылочное горлышко [14]. Это может быть также связано с изначально низкой численностью особей основателей, пришедших на современную территорию обитания амурского тигра около 10 000 лет из Центральной Азии [15].

Таким образом, в отличие от предыдущих исследований в нашей работе впервые подтверждено прохождение популяцией периода низкой численности сразу двумя принципиально разными моделями. Предполагается, что популяция проходила как минимум два таких периода – в

Таблица 3. Аллельное разнообразие (Ar), ожидаемая гетерозиготность (He), наблюдаемая гетерозиготность (Ho) и значение коэффициента Гарза-Вильямсона (M)

Локус	Ar (ист.)	Ar (совр.)	Ho (ист.)	He (ист.)	Ho (совр.)	He (совр.)	M (ист.)	M (совр.)
e7	2.862	2.999	0.09091	0.17230	0.19512	0.18278	0.42857	0.42857
fca304	3.000	3.000	0.36364	0.65011	0.69048	0.67441	0.33333	0.33333
fca43	3.984	3.000	0.50000	0.68182	0.59091	0.55695	0.36364	0.33333
e21b	3.000	3.000	0.57143	0.57724	0.61364	0.53083	0.60000	0.60000
pun935	3.862	3.000	0.63636	0.55708	0.58333	0.47640	0.17391	0.15789
fca5	3.984	3.000	0.36364	0.56342	0.72727	0.66353	0.57143	0.60000
fca161	3.000	3.837	0.45000	0.63077	0.44186	0.44569	0.33333	0.44444
fca91	2.000	2.991	0.26316	0.23471	0.37500	0.40411	0.40000	0.27273
fca441	4.984	5.877	0.72727	0.76216	0.95122	0.75610	0.23810	0.28571
Среднее			0.44071	0.53662	0.57431	0.52120	0.38248	0.38400
s.d.			0.19585	0.20011	0.21849	0.17184	0.13919	0.14885

историческом (около 10 000 лет назад [14]) и в недавнем (середина XX в. [2]) прошлом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Г.Ф. Барышникову (Зоологический институт РАН) и В.С. Лебедеву (Зоологический музей МГУ) за возможность использования музейных образцов для генетического анализа.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена Постоянно действующей экспедицией РАН по изучению животных Красной книги Российской Федерации и других особо важных животных фауны России в рамках Программы изучения амурского тигра на Российском Дальнем Востоке, осуществляемой Институтом проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук при финансовой поддержке Русского географического общества, и гранта Президента РФ МК-2553.2012.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рожнов В.В., Найдено С.В., Эрнандес-Бланко Х.А., Чистополова М.Д., и др. // Зоол. журн. 2021. Т. 100. № 1. С. 79–103.
2. Капланов Л.Г. // Тигр. Изюбрь. Лось. М.: Изд-во Моск. о-ва испытателей природы. 1948. Новая серия. Отд. зоол. Вып. 14 (29). С. 18–49.
3. Матюшкин Е.Н., Пикунов Д.Г., Дунищенко Ю.М., Миксуэлл Д., и др. // Редкие виды млекопитающих России и сопредельных территорий. М.: ВТО РАН. 1999. С. 242–271.
4. Дунищенко Ю.М., Арамилев С.В. Амурский тигр: некоронированный властелин тайги. М.: АНО "Центр "Амурский тигр". 2020. 96 с.
5. Sorokin P.A., Rozhnov V.V., Krasnenko A.U., Lukarevskiy V.S., et al. // Integrative Zoology. 2016. V. 11. № 1. P. 25–32.
6. Piry S., Luikart G., Cornuet J.M. // Journal of Heredity. 1999. V. 90. P. 502–503.
7. Garza J.C., Williamson E.G. // Molecular Ecology. 2001. V. 10. P. 305–318.
8. Excoffier L.G., Lischer H.E.L. // Mol. Ecol. Resour. 2010. V. 10. P. 564–567.
9. Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., et al. // Molecular Ecology Resources. 2014. V. 14(1). P. 209–214.
10. Goudet J. Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. 2003. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> Updated from Goudet [1995].
11. Peery M.Z., Kirby R., Reid B.N., Stoelting R., et al. // Molecular ecology. 2012. P. 21 (14). P. 3403–3418.
12. Henry P., Miquelle D., Sugimoto T., McCullough D.R., et al. // Molecular Ecology. 2009. V. 18. Issue 15. P. 3173–3184.
13. Alasaad S., Soriguer R.C., Chelomina G., Sushitsky Y.P., Joerns Fickel J. // Mammalian Biology. 2011. Vol. 76. P. 722–726.
14. Russello M.A., Gladyshev E., Miquelle D., Caccone A. // Conservation Genetics. 2004. V. 5. P. 707–713.
15. Driscoll C.A., Yamaguchi N.C., Bar-Gal G. K., Roca A.L., et al. // PLoS ONE. 2009. 4 (1). P. 1–8.

**GENETIC DIVERSITY OF THE AMUR TIGER
(*PANTHERA TIGRIS ALTAICA*): ARE THERE DIFFERENCES BETWEEN
THE 20 AND THE BEGINNING OF THE 21 CENTURIES?**

**P. A. Sorokin^a, V. G. Udin^b, Corresponding Member of the RAS S. V. Naidenko^a,
J. A. Hernandez-Blanco^a, M. D. Chistopolova^a, and Academician of the RAS V. V. Rozhnov^{a,#}**

^a*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
Vladivostok, Russian Federation*

[#]*e-mail: rozhnov-v-2015@yandex.ru*

The polymorphism of 9 microsatellite loci of the Sikhote-Alin tiger population in the modern and recent historical period was analyzed using blood, excrement, and museum bone samples. Tests for a population going through a period of low abundance in the analysis of excess heterozygotes and a low value of the Garza-Williamson coefficient indicate a high probability of such events in the recent and historical past. The mean effective population size N_e for the current sample was 34.4 (95% range 17–106.8). This fact is of great interest for the conservation and restoration of endangered large cat species.

Keywords: Sikhote-Alin population, historical and modern samples, bottleneck