

УДК 599.735.31

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОСТОЧНЫХ ПОДВИДОВ БЛАГОРОДНОГО ОЛЕНЯ (*CERVUS ELAPHUS*) РОССИИ ПО ДАННЫМ ПОЛИМОРФИЗМА мтДНК И МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

© 2022 г. О. С. Голосова<sup>1</sup>\*, М. В. Холодова<sup>1</sup>, И. А. Володин<sup>1, 2</sup>, И. В. Середкин<sup>3</sup>, И. М. Охлопков<sup>4</sup>, А. В. Аргунов<sup>4</sup>, Т. П. Сипко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН  
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Тихоокеанский институт географии ДВО РАН  
ул. Радио, 7, Владивосток, 690041 Россия

<sup>4</sup>Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН  
просп. Ленина, 41, Якутск, 677000 Россия

\*E-mail: golosova95@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.07.2022 г.

После доработки 13.09.2022 г.

Принята к публикации 19.09.2022 г.

Проведен анализ полиморфизма полного гена цитохрома *b* мтДНК (1140 п.н.) и 12 микросателлитных локусов яДНК благородного оленя *Cervus elaphus* восточных подвидов (марал и изюбрь). На территории России было собрано 112 образцов из разных частей ареала, в том числе из Якутии, где встречаются особи с промежуточными морфометрическими признаками. Описан 41 гаплотип, общих гаплотипов для марала и изюбря не обнаружено. Филогенетический анализ последовательностей гена цитохрома *b* выявил следы предкового полиморфизма или интрогрессии митохондриальных генов марала в геном изюбря. Благородные олени Якутии образуют две группы, одна из которых генетически ближе маралам, а другая – американским вапиту. Последнее может свидетельствовать о сохранении в Якутии древних линий, участвовавших в заселении Северной Америки в эпоху плейстоценовых оледенений. Микросателлитный анализ выявил слабую дифференциацию подвидов ( $F_{st} = 0.037$ ), что говорит о наличии постоянного потока генов между нативными популяциями марала и изюбря, при этом генотипы благородных оленей из Якутии демонстрируют гетерогенность, свидетельствующую о смешанном происхождении.

DOI: 10.31857/S0044459622050049

Благородный олень (*Cervus elaphus*) – политический вид, обладающий обширным гларктическим ареалом. Внутри вида выделяют две группы подвидов: восточную, включающую азиатские (кроме Центральной Азии) и североамериканские подвиды, и западную, включающую европейские и центральноазиатские подвиды (Mahmut et al., 2002; Ludt et al., 2004; Pitra et al., 2004; Skog et al., 2009; Doan et al., 2018). Недавние исследования определяют центральноазиатские подвиды как отдельную группу (Doan et al., 2021). Генетические, морфологические и акустические различия между восточной и западной группами довольно высоки, и некоторые исследователи рассматривают их в качестве двух разных видов – собственно благородного оленя *C. elaphus* и вапиту *C. canadensis* (Polziehn, Strobeck, 1998; Randi et al., 2001; Ludt et al., 2004; Doan et al., 2018).

На азиатской части ареала наряду с сибирским маралом *C. e. sibiricus* и дальневосточным изюбром *C. e. xanthopygus* выделяют китайские и монгольские подвиды *C. e. songaricus*, *C. e. alashanicus*, *C. e. wallichii*, *C. e. kansuensis* и *C. e. macneilli* (Ohtaishi, Gao, 1990; Данилкин, 1999; Ludt et al., 2004). Североамериканских вапиту рассматривают либо как один подвид *C. e. canadensis*, либо как несколько подвидов: *C. e. roosevelti*, *C. e. nannodes*, *C. e. nelsoni*, *C. e. manitobensis* (Polziehn, Strobeck, 1998; Polziehn et al., 1998). При этом внутривидовая таксономия благородного оленя трактуется неоднозначно, и у разных авторов можно встретить разные подвидовые названия для особей из одного района исследований.

На территории России обитают два восточных подвида благородного оленя – марал (*C. e. sibiricus*)

и изюбрь (*C. e. xanthopygus*). Ареал марала в России охватывает Южную Сибирь до Байкала, но носит очаговый характер и тесно связан с горным поясом, подвид активно разводят в различных регионах страны в охотничьих и пантовых хозяйствах (Данилкин, 1999; Луницын, Борисов, 2012). Изюбрь обитает в Забайкалье и на Дальнем Востоке. В Предбайкалье, Забайкалье и Якутии встречаются популяции с переходными морфологическими признаками, что свидетельствует об их смешанном происхождении, так что определение границ распространения подвидов часто затруднено (Данилкин, 1999; Степанова, Аргунов, 2016а). При этом благородные олени этих территорий генетически не изучены. Имеющиеся данные по генетике благородного оленя в России позволяют делать предположения о возможной границе между ареалами марала и изюбря в районе Предбайкалья (Кузнецова и др., 2012). Однако ранее проведенные исследования основаны на анализе полиморфизма митохондриального (мтДНК) гена цитохрома *b*, который является наиболее распространенным маркером для благородного оленя в филогеографических исследованиях, но не позволяет оценить генетический вклад самцов. Для выявления особей смешанного происхождения и определения границ ареалов двух подвидов оптимальным маркером представляются микросателлитные локусы ядерной ДНК (ядДНК), обладающие быстрой скоростью эволюции и отражающие разнообразие обеих линий наследования (Selkoe, Toonen, 2006). Использование микросателлитного анализа оправдано и для решения прикладных задач: для определения подвидового статуса благородных оленей в охотничьих хозяйствах, на фермах и в местах интродукций, что позволяет избежать смешения подвидов, а также нарушения генетической структуры популяций в случае выпусков в дикую природу (Zachos et al., 2016; Frantz et al., 2017). В последнее время во многих работах применяют сочетание анализа митохондриальных (на видовом и подвидовом) и микросателлитных (на подвидовом и популяционном уровнях) маркеров (Feulner et al., 2004; Niedziałkowska et al., 2012; Krojerova-Prokešova et al., 2015; Zhou et al., 2015).

Целью исследования является описание генетического разнообразия восточных подвидов благородного оленя России из разных точек ареала, в том числе из Якутии, по полиморфизму гена цитохрома *b* мтДНК и 12 микросателлитных локусов яДНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы проанализировали 112 образцов (фрагменты мышечной ткани в 96%-ном этаноле, кровь в растворе КЗ ЭДТА) благородного оленя восточных подвидов: 40 образцов изюбря (дикие живот-

ные из разных частей ареала), 59 образцов марала (дикие и из оленеводческих хозяйств – “Ферма 1” и “Ферма 2”) и 13 образцов особей невыясненного таксономического статуса (марал/изюбрь) из Якутии (дикие) (табл. 1). Ферма 1, “Костромское мараловодческое хозяйство”, представляет собой небольшой вольерный комплекс (общая площадь 70 га) в Костромской области, поголовье было завезено в 2010 г. из алтайских мараловодческих хозяйств и на момент сбора образцов составляло примерно 150 голов (Volodin et al., 2016). Ферма 2, ОПХ “Новоталицкое” Россельхозакадемии – это крупнейшее мараловодческое хозяйство Алтайского края (Чарышский район), на момент сбора образцов общее поголовье насчитывало 3700 маралов, которые содержались в полувольных условиях на трех фермах. Образцы для данного исследования были взяты с фермы “Сентелек”. ДНК была выделена с помощью набора реактивов Diatom DNA Prep (Изоген, Россия).

Для определения полных последовательностей мтДНК гена цитохрома *b* (*cyt b*) использовали праймеры *Cytb-ung-F* (прямой) (5'-GAAAAACCATC-GTTGT(C/T)ATTCA-3') и *Cytb-ung-R* (обратный) (5'-TTTTCTGGTTTACAAGACCAGT(G/A)T-3') (Zvychaynaya et al., 2013). Режим амплификации включал первичную денатурацию на 95°C – 3 мин; 35 циклов: 94°C – 20 с, 55°C – 20 с, 72°C – 130 с; и финальную элонгацию на 72°C – 5 мин. Определение первичных нуклеотидных последовательностей было проведено с помощью ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 Kit (ThermoFisher Scientific, США) с последующим анализом на автоматическом секвенаторе 3130 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, США). Полученные последовательности были выравнены вручную с помощью программы BioEdit (Hall, 1999). Гаплотипы были добавлены в международную базу данных Генбанк (GenBank NCBI) под номерами ON677311–ON677351 (табл. 1).

Медианные сети гаплотипов строили в программе Network v. 10 (Fluxus Technology Ltd, UK, <https://www.fluxus-engineering.com/>). Филогенетическое древо гаплотипов строили в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) по методу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с использованием модели НКУ+G (Hasegawa–Kishino–Yano model с применением дискретного гамма-распределения (5 категорий)) (Hasegawa et al., 1985). Поддержка узлов указана для 1000 бутстрэп-повторов. Для сравнения мы включили в анализ 38 последовательностей цитохрома *b* благородного оленя восточных подвидов из Генбанка. В качестве внешней группы использовали последовательность гена цитохрома *b* европейской лани (*Dama dama*, номер в Генбанке MN746794). В выравнивание последовательности также включили пятнистого оленя (*C. nippon*, AV021093, AV021094, JF893490), норвежского (*C. e. at-*

**Таблица 1.** Список образцов и *сyt b* гаплотипов благородного оленя восточных подвидов

<i>Cyt b</i> гаплотип	Номер в Генбанке	Образцы	Географическое происхождение	Подвид
2SIB	ON677311	2sib	“Костромской мараловодческий комплекс” (Ферма 1), алтайский марал	<i>Cervus elaphus sibiricus</i>
3SIB	ON677312	3sib		<i>C. e. sibiricus</i>
4SIB	ON677313	4sib		<i>C. e. sibiricus</i>
5SIB	ON677314	5sib, 7sib, 12sib, 14sib, 15sib, 18sib, 20sib, 21sib, 28sib		
		20f, 28f, 41f, 44f	ОПХ “Новоталицкое” (Ферма 2), алтайский марал	<i>C. e. sibiricus</i>
		183k, 200k	Алтай, дикая популяция	<i>C. e. sibiricus</i>
8SIB	ON677315	8sib	“Костромской мараловодческий комплекс” (Ферма 1), алтайский марал	<i>C. e. sibiricus</i>
11SIB	ON677316	11sib		<i>C. e. sibiricus</i>
9SIB	ON677317	9sib		<i>C. e. sibiricus</i>
13SIB	ON677318	13sib		<i>C. e. sibiricus</i>
17SIB	ON677319	17sib, 25sib, 27sib, 29sib		<i>C. e. sibiricus</i>
22SIB	ON677320	22sib		<i>C. e. sibiricus</i>
23SIB	ON677321	23sib		<i>C. e. sibiricus</i>
24SIB	ON677322	24sib		<i>C. e. sibiricus</i>
26SIB	ON677323	26sib		<i>C. e. sibiricus</i>
11F	ON677324	11f, 13f, 16f, 23f, 24f, 27f, 30f, 34f, 37f, 38f, 40f, 42f, 45f, 47f		ОПХ “Новоталицкое” (Ферма 2), алтайский марал
21F	ON677325	21f	<i>C. e. sibiricus</i>	
25F	ON677326	25f, 50f	<i>C. e. sibiricus</i>	
33F	ON677327	33f	<i>C. e. sibiricus</i>	
39F	ON677328	39f	<i>C. e. sibiricus</i>	
49F	ON677329	49f	<i>C. e. sibiricus</i>	
206K	ON677344	206k, 207k	Иркутская обл., г. Аныгджер	<i>C. e. sibiricus</i>
208K	ON677345	208k, 210k	Иркутская обл., г. Аныгджер	<i>C. e. sibiricus</i>
		720k	ГПЗ “Столбы”, г. Красноярск	<i>C. e. sibiricus</i>
		1555k	Красноярский край, Новоселовский р-н	<i>C. e. sibiricus</i>
209K	ON677346	209k	Иркутская обл., г. Аныгджер	<i>C. e. sibiricus</i>
		76yak	Центральная Якутия, Мегино-Кангаласский р-н	<i>C. e. sibiricus/xanthopygus</i>
		81yak	Центральная Якутия, Хангаласский р-н	<i>C. e. sibiricus/xanthopygus</i>
		85yak, 86yak, 87yak	Южная Якутия, Олекминский р-н	<i>C. e. sibiricus/xanthopygus</i>

Таблица 1. Продолжение

Сyt b гаплотип	Номер в Генбанке	Образцы	Географическое происхождение	Подвид
717K	ON677347	717k	Саяно-Шушенский заповедник	<i>C. e. sibiricus</i>
718K	ON677348	718k	Саяно-Шушенский заповедник	<i>C. e. sibiricus</i>
75YAK	ON677349	75yak, 77yak	Центральная Якутия, Мегино-Кангаласский р-н	<i>C. e. sibiricus/xanthopygus</i>
		82yak, 83yak	Центральная Якутия, Хангаласский р-н	<i>C. e. sibiricus/xanthopygus</i>
		1053k, 1054k	Южная Якутия, бассейн р. Олекма	<i>C. e. sibiricus/xanthopygus</i>
79YAK	ON677350	79yak	Центральная Якутия, Хангаласский р-н	<i>C. e. sibiricus/xanthopygus</i>
1051K	ON677351	1051k	Южная Якутия, бассейн р. Олекма	<i>C. e. sibiricus/xanthopygus</i>
1XAN	ON677330	1xant	Хабаровский край, нац. парк "Ануйский"	<i>C. e. xanthopygus</i>
2XAN	ON677331	2xant	Хабаровский край, р-н им. Лазо	<i>C. e. xanthopygus</i>
		161xant, 162xant	Приморский край, Дальнегорский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		212xant	Приморский край, Красноармейский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		384xant	Приморский край, Тернейский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		1001xant, 1002xant, 1003xant, 1005xant	Хабаровский край	<i>C. e. xanthopygus</i>
3XAN	ON677332	3xant	Хабаровский край, Хехцирский заказник	<i>C. e. xanthopygus</i>
		104xant	Приморский край, Дальнегорский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		190xant	Приморский край, Красноармейский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
4XAN	ON677333	4xant	Приморский край, Анучинский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		163xant, 247xant, 340xant	Приморский край, Дальнегорский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		197xant, 232xant	Приморский край, Тернейский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		218xant	Приморский край, Красноармейский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		1004xant	Хабаровский край, р-н им. Лазо	<i>C. e. xanthopygus</i>
		1006xant	Хабаровский край	<i>C. e. xanthopygus</i>
103XAN	ON677334	103xant	Приморский край, Дальнегорский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>

Таблица 1. Окончание

Сyt b гаплотип	Номер в Генбанке	Образцы	Географическое происхождение	Подвид
106XAN	ON677335	106xant	Приморский край, Пожарский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
118XAN	ON677336	118xant, 152xant, 175xant, 381xant	Приморский край, Тернейский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		138xant	Приморский край, Пожарский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		159xant	Приморский край, Дальнегорский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
153XAN	ON677337	153xant	Приморский край, Тернейский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
160XAN	ON677338	160xant	Приморский край, Дальнегорский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		174xant, 182xant	Приморский край, Тернейский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
		343xant	Приморский край, Пожарский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
166XAN	ON677339	166xant	Приморский край, Дальнегорский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
181XAN	ON677340	181xant	Приморский край, Тернейский р-н	<i>C. e. xanthopygus</i>
184XAN	ON677341	184xant		<i>C. e. xanthopygus</i>
185XAN	ON677342	185xant		<i>C. e. xanthopygus</i>
229XAN	ON677343	229xant		<i>C. e. xanthopygus</i>

*lanticus*, AY070221) и бухарского (*C. e. bactrianus*, AY142327) благородных оленей. Генетические дистанции (*Fst*), гаплотипическое (*H*) и нуклеотидное ( $\pi$ ) разнообразие рассчитывали в программе Arlequin v. 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010).

Анализ полиморфизма 12 микросателлитных локусов был проведен для всех 112 образцов (табл. 1). Для восьми микросателлитных локусов (MM12, CSSM14, BM757, BM1818, CSSM19, BM4107, CSSM22, CSPS115) использовали праймеры и условия амплификации, подобранные ранее (Kuehn et al., 2003; Golosova et al., 2021). Для локуса Haut14 были использованы праймеры (F: 5'-CCAGGGAAGAT-GAAGTGACC-3'; R: 5'-TGACSTTCACTCATGT-TATGAA-3') при следующих условиях амплификации: первичная денатурация на 94°C – 3 мин; 35 циклов: 94°C – 30 с, 53°C – 1 мин, 72°C – 1 мин; финальная элонгация на 72°C – 30 мин (Kuehn et al., 2003). Локусы Rt1, BMS745, OheQ были амплифицированы с помощью набора COrDIS Alces (Гордиз, Россия) по протоколу производителя.

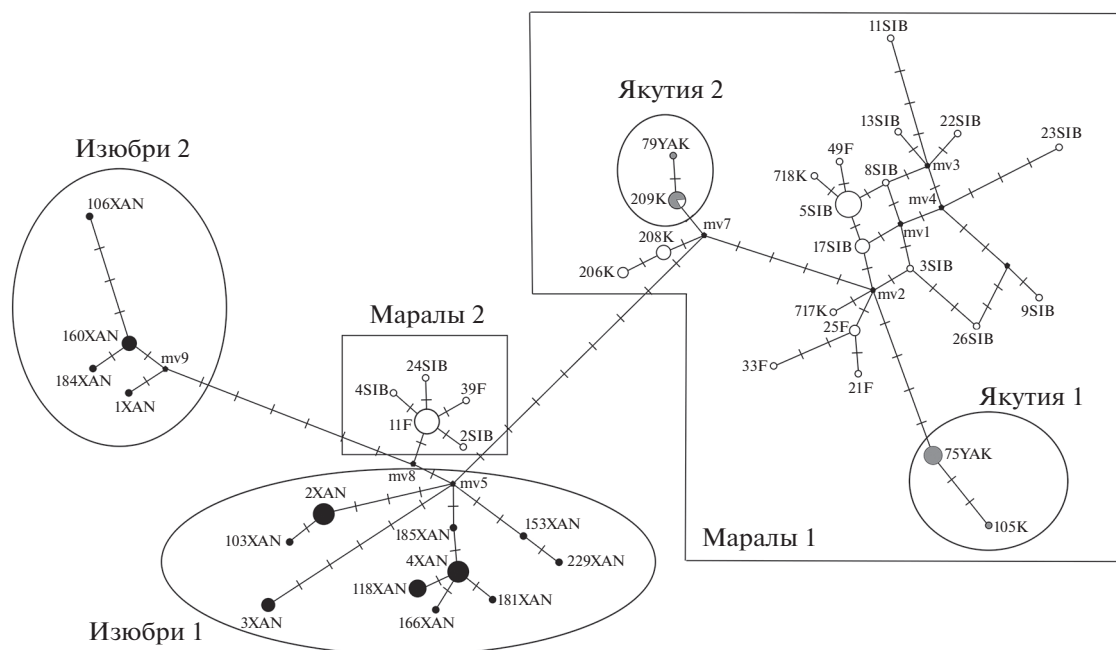
Фрагментный анализ проводили на секвенаторе ABI PRISM 3130 (Termofisher Scientific, США) с визуализацией в программе GeneMapper v. 4.1 (Termofisher Scientific, США). Частоты нуль-аллелей определяли в программе CERVUS 3.0 (Ka-

linowski et al., 2007). Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга, уровень генетической дифференциации (*Fst*), а также показатели генетического разнообразия определяли с помощью программы GenAIEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006, 2012). Аллельное разнообразие ( $A_R$ ) посчитано в программе FSTAT v. 2.9 (Goudet, 1995) при минимальном размере выборки 11 особей. Для определения наиболее вероятного количества субпопуляций использовали алгоритм STRUCTURE v. 2.3 (Pritchard et al., 2000). Пять повторностей были заданы для определения числа кластеров (*K*). Значения *K* были заданы от 1 до 8; 500000 итераций по методу Монте-Карло для марковских цепей (МКМЦ) после 150000 испытаний на отказ. Проверку достоверности результатов кластеризации данных с помощью программы STRUCTURE осуществляли с помощью метода Эванно (Earl, Holdt, 2012).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Ген *cyt b* мтДНК

Конечное выравнивание содержало 112 последовательностей полного гена *cyt b* мтДНК общей



**Рис. 1.** Медианная сеть гаплотипов восточных подвидов благородного оленя на основании 112 последовательностей полного гена цитохрома *b* (1140 п.н.). Белым цветом отмечены гаплотипы марала, черным – гаплотипы изюбря, серым – гаплотипы благородного оленя из Якутии. Черточки обозначают мутации, размер кружков пропорционален частоте гаплотипов, длина ветвей пропорциональна генетическим дистанциям.

длиной 1140 п.н. Выравнивание не содержало инделей, из 64 (5.6%) полиморфных сайтов 48 (4.2%) были парсимониально-информативными. Соотношение транзиций/трансверсий ( $R$ ) составило 7.42. На основании данного выравнивания был описан 41 гаплотип (табл. 1). Для марала и изюбря не было выявлено ни одного общего *cut b* гаплотипа.

Для анализа филогенетических отношений гаплотипов благородных оленей восточной группы подвидов была построена медианная сеть (рис. 1). На сети выделяются две большие группировки, в одну из которых вошли гаплотипы марала и гаплотипы якутских благородных оленей. Два гаплотипа из Якутии – 75YAK и 1051K (“Якутия 1”) – заняли обособленное положение на сети, тогда как гаплотипы 209K и 79YAK (“Якутия 2”) оказались близкими к гаплотипам марала 206K и 208K из диких популяций Иркутской области и Красноярского края (табл. 1, рис. 1). При этом в распределении якутских гаплотипов на сети геогра-

фической закономерности не выявлено – в обеих группах встречаются гаплотипы из Центральной и Южной Якутии. Примечательно, что гаплотип 209K был найден как у благородного оленя из Якутии, так и у дикого марала из Иркутской области. У алтайских маралов из дикой природы и из обоих оленеводческих хозяйств обнаружены близкие или идентичные гаплотипы. Близкими к ним оказались гаплотипы маралов из Саяно-Шушенского заповедника (717K, 718K; табл. 1, рис. 1).

Вторая группировка включает гаплотипы изюбря, а также несколько гаплотипов марала из оленеводческих хозяйств (“маралы 2”). При этом гаплотипы изюбря формируют две гаплогруппы – “изюбри 1” и “изюбри 2”, разделенные достаточно большим числом мутаций ( $n = 7$ ), однако гаплотипы из этих двух групп часто принадлежат животным из одного и того же района (табл. 1, рис. 1). Генетическая дифференциация ( $F_{st}$ ) оказалась наименьшей между выборками марала и изюбря и наибольшей между выборками изюбря и благородного оленя из Якутии (табл. 2).

**Таблица 2.** Генетическая  $F_{st}$  дифференциация между выборками благородного оленя восточных подвидов, основанная на частотах *cut b* гаплотипов (для всех значений  $p < 0.001$ )

	Якутия	Марал
Марал	0.199	
Изюбрь	0.207	0.123

Для выяснения филогенетического статуса благородных оленей из исследуемой выборки мы сравнили полученные последовательности с уже имеющимися данными из Генбанка. В общем выравнивании полного гена цитохрома *b* (1140 п.н.) 150 последовательностей (112 – полученных в ходе данного исследования, 38 – из Генбанка) обнаружено 96 (8.4%) переменных сайтов, 65 (5.7%)

**Таблица 3.** Показатели генетического разнообразия (среднее  $\pm$  SD) *cyt b* гаплотипов благородного оленя восточных подвидов

Выборка	<i>N</i> образцов	<i>N</i> гаплотипов	<i>N</i> полиморфных локусов	Гаплотипическое разнообразие ( <i>H</i> )	Нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ )	Среднее число попарных различий (PD)
Марал	59	24	33 (2.9%)	0.877 $\pm$ 0.029	0.008 $\pm$ 0.004	8.678 $\pm$ 4.064
Изюбрь	40	14	29 (2.5%)	0.877 $\pm$ 0.029	0.005 $\pm$ 0.003	6.031 $\pm$ 2.934
Якутия	13	4	12 (1.1%)	0.680 $\pm$ 0.089	0.005 $\pm$ 0.003	5.308 $\pm$ 2.740
В целом	112	41	64 (5.6%)	0.946 $\pm$ 0.001	0.010 $\pm$ 0.005	10.804 $\pm$ 4.953

из которых были парсимониально-информативными. Соотношение транзиций/трансверсий (*R*) составило 4.74. Всего в выравнивании было описано 72 гаплотипа.

На основании 72 *cyt b* мтДНК гаплотипов было построено ML древо с использованием модели НКУ+G (рис. 2). В качестве внешних групп использованы гаплотипы *cyt b* мтДНК лани *Dama dama*, пятнистого оленя *C. nippon*, норвежского *C. e. atlanticus* и бухарского *C. e. bactrianus* благородных оленей. При этом гаплотипы лани и благородного оленя Европы и Центральной Азии (*C. e. atlanticus* и *C. e. bactrianus*) образовали внешние группы по отношению к гаплотипам пятнистого и восточных подвидов благородного оленей. Гаплотипы пятнистого оленя образовали отдельный кластер по отношению к гаплотипам марала и изюбря с высокой (84%) поддержкой. Последние также с высокой вероятностью (97%) разделились на два кластера, один из которых включал гаплотипы большинства маралов, американских вапити и гаплотипы благородных оленей из Якутии (рис. 2). При этом гаплотипы группы “Якутия 1” (75YAK и 1051K) оказались близки к гаплотипам американских вапити, в то время как гаплотипы группы “Якутия 2” (209K и 79YAK) представляют собой отдельную обособленную кладу. Второй крупный кластер включил в себя гаплотипы изюбря, близких ему китайских подвидов, а также часть гаплотипов алтайского и семиреченского маралов (рис. 2, “маралы 2”). При этом гаплотипы маралов из одних и тех же локалитетов (из двух оленеводческих хозяйств) попали в оба кластера.

Гаплотипическое разнообразие (*H*) оказалось наименьшим для выборки благородного оленя из Якутии и одинаковым для выборки марала и изюбря (табл. 3). Нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ ) — наибольшее для выборки марала и одинаково для выборок благородного оленя из Якутии и изюбря. В целом показатели генетического разнообразия немного выше для марала, чем для изюбря, при сходных размерах выборок (табл. 3).

### Микросателлиты

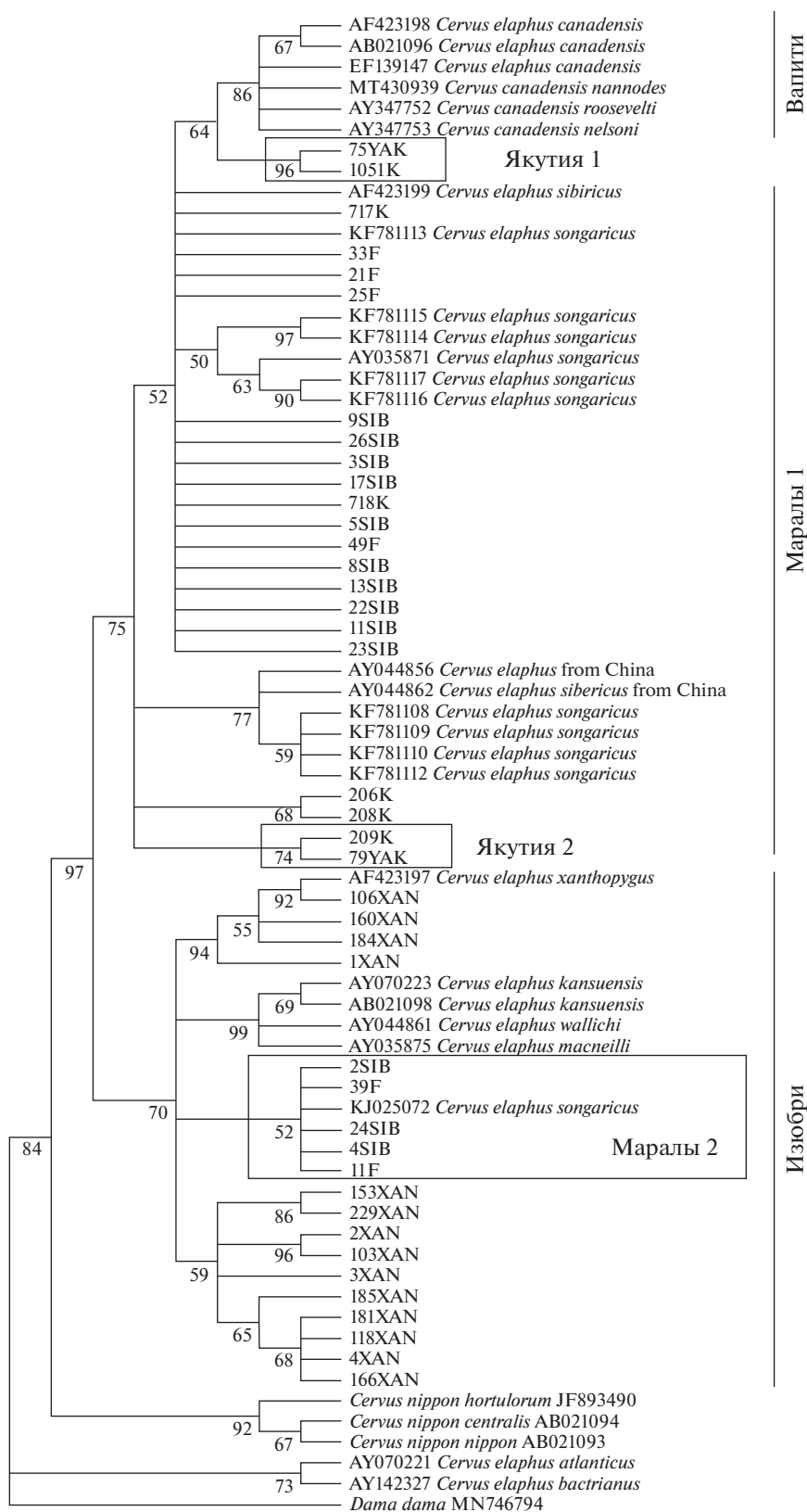
Мы проанализировали 112 образцов восточных подвидов благородного оленя по 12 микросателлитным локусам. Наиболее вариабельным оказался локус Haut14 (18 аллелей), наиболее консервативным — локус CSSM22 (4 аллеля). Для локуса BM1818 отмечены высокие частоты нуль-аллелей (0.41), которые спровоцировали отклонение от равновесия Харди–Вайнберга по данному локусу. Для локусов CSSM14 (0.10), BM757 (0.11) и OheQ (0.10) частоты нуль-аллелей также относительно высоки. Однако исключение локусов с высокими частотами нуль-аллелей не повлияло на характер результатов, поэтому в дальнейший анализ мы включили все локусы.

Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга по пяти локусам были отмечены в выборке марала с Фермы 1 (BM757, BM1818, BM4107, OheQ и BMS745). Также отклонения от равновесия Харди–Вайнберга отмечены в выборке из Якутии (BM757, Haut14, Rt1 и OheQ).

Из 127 аллелей, обнаруженных в общей выборке, 40 были приватными (характерными только для определенной выборки, популяции или подвида). Было обнаружено 17 приватных аллелей для марала, 18 для изюбря и 5 для благородного оленя из Якутии.

Показатели генетического разнообразия имели самые высокие значения для выборки изюбря и самые низкие для выборки благородного оленя из Якутии (табл. 4). Внутри выборки марала особи из разных локалитетов имели сходный уровень генетического разнообразия. При этом индекс фиксации (*F*) был выше для выборки марала с Фермы 1, дикого марала и выборки благородного оленя из Якутии, и ниже для выборки марала с Фермы 2 и изюбря (табл. 4). Однако небольшие размеры выборок благородного оленя из Якутии и дикого марала не позволяют делать достоверные выводы об уровне инбридинга в этих популяциях.

Анализ в программе STRUCTURE с использованием метода Эванно показал наиболее вероятное разделение общей выборки на два кластера



**Рис. 2.** Филогенетическое древо *сyt b* гаплотипов, построенное на основании 150 последовательностей (1140 п.н.). У каждого узла указаны значения бутстрэп-поддержки для ML алгоритмов (1000 повторов). Генетические дистанции рассчитаны с помощью модели НКУ+G.



**Таблица 4.** Показатели генетического разнообразия (среднее  $\pm SE$ ), основанные на частотах аллелей 12 микросателлитных локусов

Выборка	N образцов	Число аллелей на локус ( $N_a$ )	Число эффективных аллелей ( $N_e$ )	Наблюдаемая гетерозиготность ( $H_o$ )	Ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ )	Индекс фиксации ( $F$ )	Индекс разнообразия Шеннона ( $H$ )	N приватных аллелей	Аллельное разнообразие ( $A_R$ )
Марал (Ферма 1)	24	6.250 $\pm$ 0.897	3.705 $\pm$ 0.626	0.538 $\pm$ 0.088	0.600 $\pm$ 0.080	0.090 $\pm$ 0.078	1.296 $\pm$ 0.196	0.667 $\pm$ 0.225	5.160
Марал (Ферма 2)	24	6.250 $\pm$ 0.946	3.339 $\pm$ 0.557	0.597 $\pm$ 0.085	0.573 $\pm$ 0.077	-0.037 $\pm$ 0.040	1.225 $\pm$ 0.194	0.167 $\pm$ 0.112	4.959
Марал (дикий)	11	5.500 $\pm$ 0.900	3.819 $\pm$ 0.694	0.530 $\pm$ 0.082	0.579 $\pm$ 0.086	0.075 $\pm$ 0.036	1.250 $\pm$ 0.217	0.083 $\pm$ 0.083	5.500
Марал (в целом)	59	8.417 $\pm$ 1.373	4.026 $\pm$ 0.702	0.561 $\pm$ 0.081	0.615 $\pm$ 0.078	0.089 $\pm$ 0.055	1.409 $\pm$ 0.215	1.417 $\pm$ 0.434	5.760
Изюбрь	40	8.250 $\pm$ 1.109	4.179 $\pm$ 0.741	0.599 $\pm$ 0.074	0.626 $\pm$ 0.077	0.038 $\pm$ 0.018	1.454 $\pm$ 0.202	1.500 $\pm$ 0.379	5.891
Якутия	13	4.750 $\pm$ 0.780	3.158 $\pm$ 0.560	0.503 $\pm$ 0.086	0.553 $\pm$ 0.078	0.078 $\pm$ 0.075	1.113 $\pm$ 0.185	0.417 $\pm$ 0.193	4.562

**Таблица 5.** Генетическая *Fst* дифференциация между выборками благородного оленя восточных подвидов, основанная на частотах аллелей 12 микросателлитных локусов (для всех значений  $p \leq 0.001$ )

	Марал Ферма 1	Марал Ферма 2	Марал (дикий)	Изюбрь
Марал Ферма 2	0.032			
Марал (дикий)	0.054	0.034		
Изюбрь	0.062	0.040	0.041	
Якутия	0.056	0.057	0.071	0.051

( $K = 2$ , рис. 3а). При этом генотипы марала с Фермы 1 относились к одному кластеру с высокой вероятностью, близкой к 1, тогда как генотипы маралов с Фермы 2 и из дикой природы отличались большей гетерогенностью. Генотипы изюбря сформировали отдельный кластер, обладающий высокой гомогенностью. Генотипы из Якутии демонстрируют смешанные черты и наибольшую гетерогенность выборки.

Метод анализа главных компонент на базе индивидуальных генетических дистанций показал отсутствие ярко выраженных группировок (рис. 4). Часть генотипов марала (преимущественно с ферм) образует несколько обособленное облако, тогда как большая часть генотипов диких маралов, а также часть генотипов с ферм, расположены довольно близко к генотипам изюбря. В распределении генотипов благородного оленя из Якутии нет географической закономерности, хотя очевидно родственные генотипы 1051к–1053к расположены рядом. При этом различия по *Fst* между тремя выборками выражены слабо: наименьшая дистанция между выборками марала и изюбря ( $Fst = 0.037, p \leq 0.001$ ), наибольшая между выборками изюбря и благородного оленя из Якутии ( $Fst = 0.051, p \leq 0.001$ ), различия между выборками марала и благородного оленя из Якутии име-

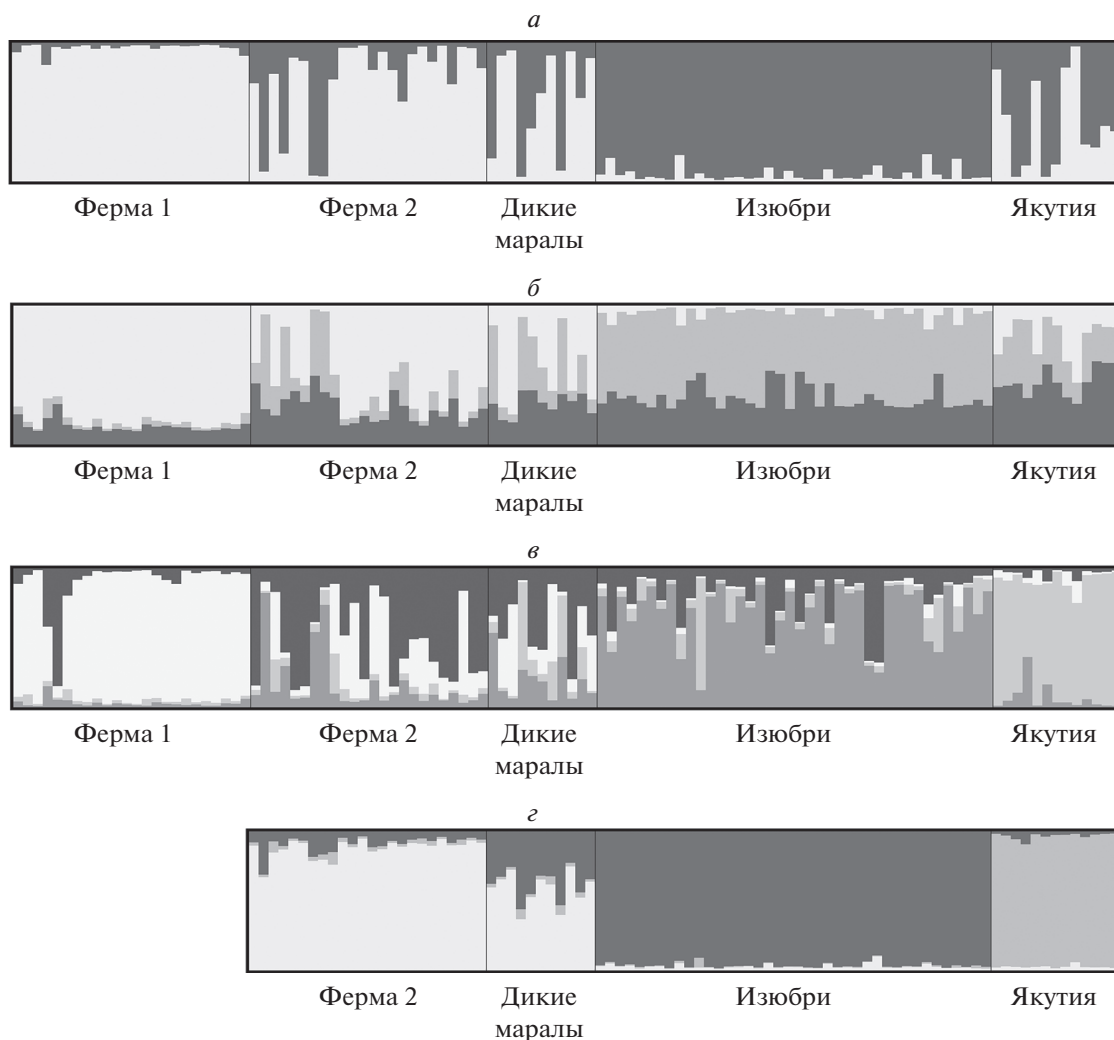
ют промежуточное значение ( $Fst = 0.047, p \leq 0.001$ ). Различия по *Fst* между отдельными локалитетами внутри выборки марала сравнимы с различиями по *Fst* между двумя подвидами и благородным оленем из Якутии (табл. 5). Самые высокие различия наблюдаются между выборками дикого марала и благородного оленя из Якутии, самые низкие – между маралами с двух ферм.

## ОБСУЖДЕНИЕ

### *Филогенетические отношения восточных подвидов благородного оленя России*

Согласно имеющимся данным по филогении р. *Cervus*, восточные подвиды благородного оленя образуют отдельную кладу, которая генетически ближе к пятнистому оленю, чем к европейскому благородному оленю (Randi et al., 2001; Pitra et al., 2004; Lorenzini, Garofalo, 2015; Doan et al., 2018, 2021). Топология построенного древа согласуется с этими данными – ветвь европейского благородного оленя является внешней по отношению к кластерам пятнистого и восточного благородного оленя (рис. 2).

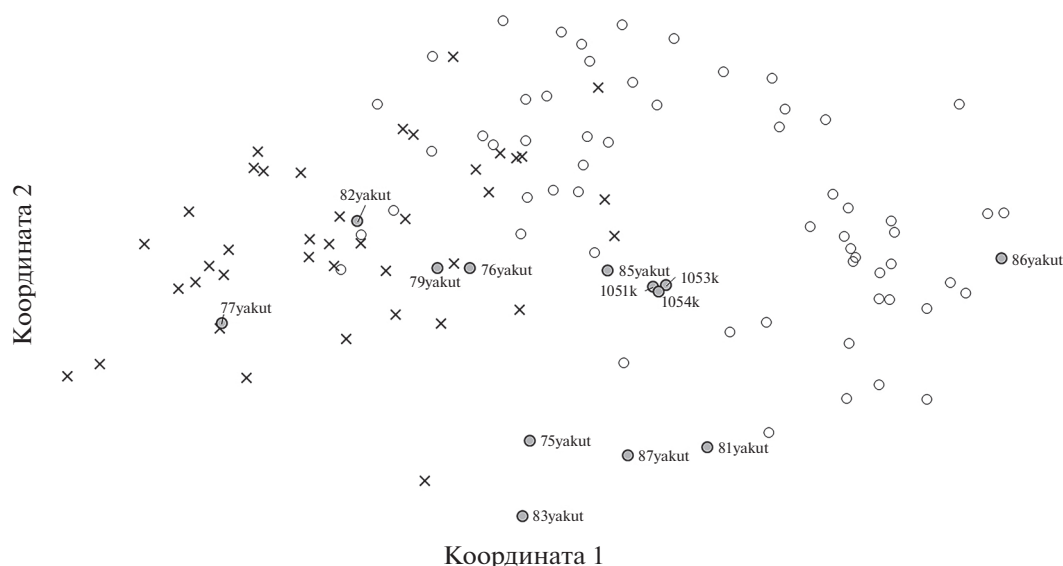
Анализ исследуемой выборки по гену цитохрома *b* мтДНК показал генетическую неоднородность.



**Рис. 3.** Результат анализа выборки благородного оленя в STRUCTURE: *а–в* – для пяти выборок, где *а* – для  $K = 2$ , *б* – для  $K = 3$ , *в* – для  $K = 4$ ; *г* – для четырех выборок ( $K = 3$ ) (без Фермы 1). По оси абсцисс – генотипы, по оси ординат – вероятность принадлежности к одному из кластеров. Применена модель генетического смешения (admixture) со скоррелированными частотами аллелей в популяциях.

родность, свойственную маралу (рис. 1, 2). Большинство маралов с Алтая, из Красноярского края и Иркутской области вошли в одну кладу с маралами из Китая и Монголии, а также благородными оленями из Якутии и американскими вапити. Эта кладка соответствует кладе E3 по Доан с соавторами (Doan et al., 2018), гаплотипы из которой были широко распространены на территории Евразии до максимума последнего оледенения, а также попали в Северную Америку в процессе ее заселения благородным оленем (Doan et al., 2021). Однако нами также были обнаружены гаплотипы алтайского марала (“маралы 2”), которые вошли в одну кладку с гаплотипами изюбря, причем помимо животных с ферм такие гаплотипы были найдены у семиреченского марала *C. e. songaricus* из Генбанка (№ HQ191429 – гаплотип 11F, № KJ025072 – одноименный гаплотип; рис. 2).

Любопытно, что те же гаплотипы из Генбанка заняли аналогичную позицию внутри клады изюбрей (E3) на филогенетическом древе в работе Доан с соавторами (Doan et al., 2018), что подтверждает положение группы “маралы 2”. При этом распределение по группам “маралы 1” и “маралы 2” не имеет географической закономерности – в разные кластеры вошли олени из одних и тех же локалитетов (алтайский марал с Ферм 1 и 2). Подобное расположение клады “маралы 2” может свидетельствовать как об интрогрессии митохондриальной ДНК марала, так и о следах предкового полиморфизма (Avice, 2000; Абрамсон, 2007). В случае благородного оленя оба сценария представляются возможными, так что вопрос требует дальнейшего изучения с использованием ядерных маркеров. Благородные олени, отнесенные к подвиду *C. e. songaricus*, близки алтайскому маралу



**Рис. 4.** Метод анализа главных компонент на базе индивидуальных генетических дистанций. Номера на рисунке соответствуют номерам особей из табл. 1. Крестиками отмечены генотипы изюбря, белыми кружками — генотипы марала, серыми кружками — генотипы благородного оленя из Якутии.

*C. e. sibiricus* (в том числе несут общие гаплотипы), что подтверждает искусственность разделения данных подвидов (Данилкин, 1999).

Выборка благородного оленя из Якутии также демонстрируют ярко выраженную гетерогенность без географической привязки гаплотипов. Олени из группы “Якутия 1” оказались близки американским вапити (рис. 2). О сходстве некоторых якутских и американских гаплотипов уже упоминалось ранее (Кузнецова и др., 2012). В данном случае мы можем предполагать сохранение в Якутии предковых гаплотипов, которые были характерны для благородных оленей, участвовавших в колонизации Северной Америки (Doan et al., 2018, 2021), однако подобные утверждения, безусловно, требуют подтверждения на основе анализа древних образцов. Благородные олени из группы “Якутия 2” оказались родственны маралам из Иркутской области и Красноярского края (был найден один общий гаплотип), что, судя по всему, определяется географией их ареала. Так, река Лена с богатыми пойменными местообитаниями является основой для расселения благородных оленей вдоль ее русла в Южной Якутии. Она начинается западнее оз. Байкала, являющегося для них изолирующим фактором. При этом на территориях западнее Байкала обитает марал, так что долина р. Лены выступает для него в качестве естественного экологического коридора, который тянется от границ ареала далее на восток по пределам Южной Якутии. Эта часть ареала благородного оленя в пределах Южной Якутии изолирована Становым нагорьем и Становым хребтом от ареала изюбря, который распростра-

нен в бассейне Амура. Однако эта географическая изоляция не полная, и по долинам таких рек, как Витим и Олекма, вполне возможна их естественная взаимная интрогрессия.

В целом, по мтДНК олени из Якутии ближе к маралу, несмотря на небольшие различия в генетической *Fst* дифференциации между благородными оленями из Якутии и обоими подвидами (рис. 1, 2, табл. 2). Это подтверждает имеющиеся данные о большем сходстве благородного оленя из Якутии и марала по морфометрии тела (Егоров, 1965; Степанова, Аргунов, 2016а), однако противоречит данным по морфометрии рогов, которые у благородного оленя из Якутии сходны с рогами изюбря (Степанова, Аргунов, 2016а).

Изюбри сформировали более гомогенный кластер, хотя исходная выборка также образовала две группы (“изюбрь 1” и “изюбрь 2”; рис. 1). Такое разделение нельзя объяснить географическими закономерностями — в разные группы вошли гаплотипы из одних и тех же районов исследования. Родственными изюбрю оказались китайские подвиды *C. e. wallichii*, *C. e. kansuensis* и *C. e. macneilli*, что согласуется с литературными данными (Кузнецова и др., 2012; Lorenzini, Garofalo, 2015). Несколько последовательностей редкого подвида *C. e. alashanicus (alxaicus)* (Северный Китай, Монголия) несли идентичный с изюбрем гаплотип, что также может свидетельствовать об искусственности его подвида статуса.

Несмотря на общепринятость выделения подвидов марал и изюбрь, существуют сомнения в истинности этого разделения, во многом обусловленные клинальностью морфологических

признаков (Данилкин, 1999). Однако, несмотря на очевидную близость этих двух подвидов, порядок ветвления на филогенетическом древе (наличие двух кластеров с высокой бутстрэп-поддержкой, где кластер изюбря является внешним по отношению к кластеру марала и американских вапити) указывает на целесообразность существующего разделения (рис. 2). Невысокий уровень *Fst*-дифференциации может свидетельствовать о недавнем разделении подвидов (табл. 2).

В отличие от результатов по мтДНК, микросателлитный анализ выявил отсутствие ярко выраженных группировок внутри исследуемых выборок. Анализ с помощью алгоритма STRUCTURE показал наличие двух кластеров, однако только выборки марала с Фермы 1 и изюбря показали высокую степень гомогенности (рис. 3а). При дальнейшей кластеризации выборки на  $K = 3$  и  $K = 4$  только выборка с Фермы 1 оставалась однородной (рис. 3б, в). Учитывая небольшое поголовье, условия содержания (огороженные вольеры, малое количество самцов, допущенных к размножению) и фактическое отсутствие потока генов, в данном хозяйстве могут сохраняться редкие аллели, не столь распространенные в популяции дикого марала, что может влиять на характер кластеризации выборки. Для того, чтобы нивелировать это влияние, мы провели кластеризацию выборки без генотипов с Фермы 1 (рис. 3г). В результате при оптимальном  $K = 3$ , выявленном с помощью метода Эванно, видно выделение трех кластеров, к одному из которых с высокой вероятностью принадлежат генотипы изюбря, тогда как генотипы марала принадлежат к другому кластеру с более низкой вероятностью. Гетерогенность, присущая маралу (особенно дикому), свидетельствует о неполной дифференциации подвидов. Якутия образует отдельный, обособленный и четко дифференцированный кластер (рис. 3г).

Как и в случае мтДНК анализа, *Fst*-дифференциация была ниже между выборками марала и благородного оленя из Якутии, однако в целом различия между выборками невелики, хотя и достоверны (табл. 5). Графическое представление индивидуальных генетических дистанций на плоскости с помощью анализа главных компонент подтверждает слабую дифференциацию подвидов по микросателлитным маркерам. В целом различия по микросателлитным локусам оказались гораздо менее выраженными, чем по цитохрому *b*, что можно объяснить вкладом самцов, которые при расселении активно перемещаются по речным местообитаниям на границе ареалов, что приводит к смешению генофонда популяций двух подвидов.

#### *Генетическое разнообразие восточных подвидов благородного оленя России*

Благородные олени из Якутии продемонстрировали наиболее низкие значения показателей генетического разнообразия внутри исследуемой выборки, как по цитохрому *b*, так и по микросателлитам, что объясняется невысокой численностью популяции, которая начала увеличиваться лишь в последние десятилетия (Степанова, Охлопков, 2009; Степанова, Аргунов, 2016б). Уровень гаплотипического разнообразия ( $h$ ) исследуемых оленей высок (0.946; табл. 3), что характерно для восточных подвидов благородного оленя: 0.981 (Ludt et al., 2004) и 0.995 (Кузнецова и др., 2012) (табл. 3). Показатели нуклеотидного разнообразия ( $\pi = 0.010$ ; табл. 3) низкие относительно средних значений, характерных для европейского благородного оленя ( $\pi = 0.020$ ; Skog et al., 2009), но, видимо, это типично для восточных подвидов ( $\pi = 0.002$  в среднем для пяти популяций семиреченского марала *C. e. songaricus*; Zhou et al., 2015).

Результаты микросателлитного анализа показали достаточно высокий уровень аллельного разнообразия ( $A_R$ ) (4.562–5.891; табл. 4), находящийся в пределах характерных для благородного оленя значений (2.52–6.76) (Niedziałkowska et al., 2012; Zhou et al., 2015; Zachos et al., 2016; Golosova et al., 2021). При этом он сходен с уровнем аллельного разнообразия популяций семиреченского марала (4.13–4.78; Zhou et al., 2015) (табл. 4). Ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ ) (0.553–0.626; табл. 4) также имела средние для благородного оленя значения (разброс средних значений от 0.258 до 0.741 для восточных подвидов благородного оленя и от 0.33 до 0.83 для западных) (Polziehn et al., 2000; Kuehn et al., 2003; Dellicour et al., 2011; Niedziałkowska et al., 2012; Krojerova-Prokešova et al., 2015; Zhou et al., 2015; Zachos et al., 2016; Golosova et al., 2021). Однако к сравнению показателей генетического разнообразия из разных исследований следует относиться с осторожностью, так как использование разных наборов микросателлитных локусов дает разные результаты.

Наблюдаемая гетерозиготность ( $H_o$ ), которая для большинства выборок ниже, чем ожидаемая ( $H_e$ ), и значения индекса фиксации ( $F$ ) свидетельствуют о наличии определенного уровня дефицита гомозигот в исследуемых выборках (табл. 4). Мы также обнаружили отклонения от равновесия Харди–Вайнберга в двух выборках из пяти, причем в выборке марала из Фермы 1 они могут быть связаны с неслучайным скрещиванием животных в условиях мараловодческого комплекса. Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга в выборке из Якутии могут свидетельствовать о присутствии эффекта Валунда (дефицит гетерозигот, вызванный подразделенностью популяции и фактиче-

ским отсутствием панмиксии) (Wahlund, 1928; Allendorf, Luikart, 2007).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетический анализ восточных подвидов благородного оленя России показал, что маралы и изюбри хорошо различаются по мтДНК, в том числе не несут общих гаплотипов. Это свидетельствует о полном разделении подвидов, которое, как мы предполагаем, произошло недавно. Микросателлитный анализ, напротив, демонстрирует неполную дифференциацию популяций марала и изюбря, что объясняется более активным перемещением самцов и их генетическим вкладом. Благородные олени Якутии образуют две группы, одна из которых родственна маралам, другая — американским вапити. Подобное разделение может свидетельствовать как о существовании нескольких путей заселения региона, так и о сохранении в Якутии линий, участвовавших в колонизации Северной Америки в плейстоцене. Генетическое разнообразие и структура популяции благородных оленей Якутии нуждается в дальнейшем изучении. Полученные в ходе нашего исследования данные могут быть использованы при выяснении подвидового статуса особей и популяций благородного оленя восточных подвидов.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим владельцев оленеводческих хозяйств за предоставление материала для анализа, а также С.Л. Кальнова, Н.А. Власову, А.В. Куваева и И.А. Минакова, участвовавших в сборе образцов. Исследование выполнено на базе Кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН, входящего в ЦКП “Инструментальные методы в экологии”.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90123.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование выполнено с соблюдением этических стандартов и законов Российской Федерации. Образцы были взяты у животных с ферм при проведении плановых мероприятий, а также у диких животных, легально добытых на охоте или павших от естественных причин.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамсон Н.И., 2007. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестн. ВОГиС. Т. 11. № 2. С. 307–331.
- Данилкин А.А., 1999. Млекопитающие России и сопредельных регионов. Олени. М.: Геос. 552 с.
- Егоров О.В., 1965. Благородный олень (*Cervus elaphus* L.) // Дикие копытные Якутии. М.: Наука. С. 71–87.
- Кузнецова М.В., Данилкин А.А., Холодова М.В., 2012. Филогеография благородного оленя (*Cervus elaphus*): данные анализа полиморфизма митохондриального гена цитохрома *b* // Изв. РАН. Сер. Биол. № 4. С. 391–398.
- Луницын В.Г., Борисов Н.П., 2012. Пантовое оленеводство России. Барнаул: Азбука. 1000 с.
- Степанова В.В., Аргунов А.В., 2016а. Морфометрия рогов благородного оленя (*Cervus elaphus* L., 1758) Якутии // Вестн. УдмГУ. Т. 26. № 1. С. 126–132.
- Степанова В.В., Аргунов А.В., 2016б. Пространственно-временная динамика ареалов благородного оленя (*Cervus elaphus*, Cervidae) и сибирской косули (*Capreolus pygargus*, Cervidae) в Якутии // Экология. № 1. С. 50–55.
- Степанова В.В., Охлопков И.М., 2009. Экология благородного оленя Якутии. Новосибирск: Наука. 136 с.
- Allendorf F.W., Luikart G., 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Oxford: Blackwell Publishing. 642 p.
- Avise J.C., 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge: Harvard Univ. Press. 464 p.
- Dellicour S., Frantz A.C., Colyn M., Bertouille S., Chaumont F., Flamand M.C., 2011. Population structure and genetic diversity of red deer (*Cervus elaphus*) in forest fragments in north-western France // Conserv. Genet. V. 12. P. 1287–1297. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0230-0>
- Doan K., Mackiewicz P., Sandoval-Castellanos E., Stefaniak K., Ridush B., et al., 2018. The history of Crimean red deer population and *Cervus* phylogeography in Eurasia // Zool. J. Linn. Soc. V. 183. P. 208–225. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlx065>
- Doan K., Niedziałkowska M., Stefaniak K., Sykut M., Jędrzejewska B. et al., 2021. Phylogenetics and phylogeography of red deer mtDNA lineages during the last 50000 years in Eurasia // Zool. J. Linn. Soc. V. 194. № 2. P. 431–456. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlab025>
- Earl D.A., Holdt B.M., von, 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conserv. Genet. Resour. V. 4. P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Excoffier L., Lischer H.E.L., 2010. Arlequin Suite ver 3.5, a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resour. V. 10. P. 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Feulner P.G.D., Bielfeldt W., Zachos F.E., Bradvarovic J., Eckert I., Hartl G.B., 2004. Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathi-

- an red deer) // *Heredity*. V. 93. P. 299–306.  
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800504>
- Frantz A.C., Zachos F.E., Bertouille S., Eloy M.-C., Colyn M., Flamand M.-C., 2017. Using genetic tools to estimate the prevalence of non-native red deer (*Cervus elaphus*) in a Western European population // *Ecol. Evol.* V. 7. № 19. P. 7650–7660.  
<https://doi.org/10.1002/ece3.3282>
- Golosova O.S., Kholodova M.V., Volodin I.A., Volodina E.V., Likhatsky E.Y., et al., 2021. Vocal phenotype of male rutting roars and genetic markers delineate East European red deer (*Cervus elaphus*) from Central and West European populations // *Sci. Nat.* V. 108.  
<https://doi.org/10.1007/s00114-021-01742-0>
- Goudet J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics // *J. Hered.* V. 86. № 6. P. 485–486.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
- Hall T.A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids Symp. Ser.* V. 41. P. 95–98.  
[https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-14998u1.29](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29)
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T., 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA // *J. Mol. Evol.* V. 22. P. 160–174.  
<https://doi.org/10.1007/BF02101694>
- Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment // *Mol. Ecol.* V. 16. P. 1099–1106.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x>
- Krojerova-Prokešova J., Barančeková M., Koubek P., 2015. Admixture of eastern and western European red deer lineages as a result of postglacial recolonization of the Czech Republic (Central Europe) // *J. Hered.* V. 106. P. 375–385.  
<https://doi.org/10.1093/jhered/esv018>
- Kuehn R., Schroeder W., Pirchner F., Rottmann O., 2003. Genetic diversity, gene flow and drift in Bavarian red deer populations (*Cervus elaphus*) // *Conserv. Genet.* V. 4. P. 157–166.  
<https://doi.org/10.1023/A:1023394707884>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* V. 35. P. 1547–1549.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lorenzini R., Garofalo L., 2015. Insights into the evolutionary history of *Cervus* (Cervidae, tribe Cervini) based on Bayesian analysis of mitochondrial marker sequences, with first indications for a new species // *J. Zool. Syst. Evol.* V. 53. № 4. P. 340–349.  
<https://doi.org/10.1111/jzs.12104>
- Ludt C.J., Schroeder W., Rottmann O., Kuehn R., 2004. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 31. P. 1064–1083.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.10.003>
- Mahmut H., Masuda R., Onuma M., Takahashi M., Nagata J., et al., 2002. Molecular phylogeography of the red deer (*Cervus elaphus*) populations in Xinjiang of China: Comparison with other Asian, European, and North American populations // *Zool. Sci.* V. 19. P. 485–495.  
<https://doi.org/10.2108/zsj.19.485>
- Niedziałkowska M., Jędrzejewska B., Wójcik J.M., Goodman S.J., 2012. Genetic structure of red deer population in Northeastern Poland in relation to the history of human interventions // *J. Wildl. Manage.* V. 76. P. 1264–1276.  
<https://doi.org/10.1002/jwmg.367>
- Ohtaishi N., Gao Y., 1990. A review of the distribution of all species of deer (Tragulidae, Moschidae and Cervidae) in China // *Mammal Rev.* V. 20. P. 125–144.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1990.tb00108.x>
- Peakall R., Smouse P.E., 2006. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol.* V. 6. № 1. P. 288–295.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Peakall R., Smouse P.E., 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // *Bioinformatics.* V. 28. P. 2537–2539.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pitra C., Fickel J., Meijaard E., Groves C.P., 2004. Evolution and phylogeny of old world deer // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 33. P. 880–895.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.013>
- Polziehn R.O., Strobeck C., 1998. Phylogeny of wapiti, red deer, sika deer, and other North American cervids as determined from mitochondrial DNA // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 10. № 2. P. 249–258.  
<https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0527>
- Polziehn R.O., Hamr J., Mallory F.F., Strobeck C., 1998. Phylogenetic status of North American wapiti (*Cervus elaphus*) subspecies // *Can. J. Zool.* V. 76. P. 998–1010.  
<https://doi.org/10.1139/z98-026>
- Polziehn R., Hamr J., Mallory F., Strobeck C., 2000. Microsatellite analysis of North American wapiti (*Cervus elaphus*) populations // *Mol. Ecol.* V. 9. P. 1561–1576.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01033.x>
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* V. 155. P. 945–959.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Randi E., Mucci N., Claro-Hergueta F., Bonnet A., Douzery E.P., 2001. A mitochondrial DNA control region phylogeny of the Cervinae: Speciation in *Cervus* and implication for conservation // *Anim. Conserv.* V. 4. P. 1–11.
- Selkoe K., Toonen R., 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers // *Ecol. Lett.* V. 9. P. 615–629.  
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Skog A., Zachos F.E., Rueness E.K., Feulner P.G.D., Mysterud A., et al., 2009. Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe // *J. Biogeogr.* V. 36. P. 66–77.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01986.x>
- Volodin I.A., Volodina E.V., Golosova O.S., 2016. Automated monitoring of vocal rutting activity in red deer (*Cervus elaphus*) // *Russ. J. Theriol.* V. 15. P. 91–99.
- Wahlund S., 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus Betrachtet // *Hereditas.* V. 11. P. 65–106.  
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1928.tb02483.x>

- Zachos F.E., Frantz A.C., Kuehn R., Bertouille S., Colyn M., et al., 2016. Genetic structure and effective population sizes in European red deer (*Cervus elaphus*) at a continental scale: Insights from microsatellite DNA // J. Hered. V. 107. P. 318–326.  
<https://doi.org/10.1093/jhered/esw01>
- Zhou C.-L., Turdy R., Halik M., 2015. Genetic differentiation between red deer from different sample sites on the Tianshan Mountains (*Cervus elaphus*), China // Mitochondrial DNA. V. 26. № 1. P. 101–111.  
<https://doi.org/10.3109/19401736.2014.984165>
- Zvychaynaya E.Y., Volokh A.M., Kholodova M.V., Danilkin A.A., 2013. Mitochondrial DNA polymorphism of the European roe deer, *Capreolus capreolus* (Artiodactyla, Cervidae), from the South-West of Ukraine // Vestn. Zool. V. 47. № 5. P. 415–420.

## Genetic diversity of the eastern subspecies of red deer (*Cervus elaphus*) in Russia revealed by mtDNA and microsatellite polymorphism

O. S. Golosova<sup>a, \*</sup>, M. V. Kholodova<sup>a</sup>, I. A. Volodin<sup>a, b</sup>, I. V. Seryodkin<sup>c</sup>, I. M. Okhlopkov<sup>d</sup>, A. V. Argunov<sup>d</sup>, and T. P. Sipko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS  
 Leninsky prosp., 33, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup>Lomonosov Moscow State University  
 Leninskiye Gory, 1, Moscow, 119991 Russia

<sup>c</sup>Pacific Geographical Institute, Far-Eastern Branch, RAS  
 Radio str., 7, Vladivostok, 690041 Russia

<sup>d</sup>Institute for Biological Problems of Cryolithozone  
 Lenin ave., 41, Yakutsk, 677000 Russia

\*e-mail: golosova95@yandex.ru

We analyzed the polymorphism of the complete mtDNA cytochrome *b* gene (1140 bp) and 12 microsatellite nDNA loci of the eastern red deer *Cervus elaphus* subspecies – Siberian *C. e. sibiricus* and Far East *C. e. xanthopygus* wapiti. On the territory of Russia, 112 samples were collected from different parts of the range, including Yakutia, where individuals with intermediate morphometric traits were found. We described 41 haplotypes, with no common haplotypes found for Siberian and Far East wapiti. Phylogenetic cytochrome *b* analysis revealed traces of ancestral polymorphism or introgression from Siberian wapiti into Far East wapiti. The red deer of Yakutia formed two haplogroups, the first group was genetically closer to Siberian wapiti, and the second to American wapiti. The latter may indicate the preservation of ancient lines in Yakutia, which participated in the North America colonization during the Pleistocene glaciation. Microsatellite analysis revealed a little differentiation between the subspecies ( $F_{st} = 0.037$ ), reflecting the presence of a constant gene flow between their populations. The genotypes of red deer from Yakutia demonstrate heterogeneity, indicating their mixed origin.