

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ ПОПУЛЯЦИИ СОБОЛЯ (*MARTES ZIBELLINA* LINNAEUS, 1758) ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ МАРКЕРАМ

С.Н. Каштанов¹, Г.А. Рубцова¹, О.Е. Лазебный²

¹ Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, snkashtanov@mail.ru;

² Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия, oelazebny@gmail.com

Высокая ценность пушнины соболя (*Martes zibellina*) и как следствие длительные периоды нерационального промысла вызвали значительные флуктуации численности природных популяций этого вида. Для стабильности традиционного экспорта России была реализована идея промышленной доместики соболя. Для комплектования первой популяции в условиях звероводческой фермы (1929 г.), были изъяты животные из 8 природных популяций. Промышленная доместикация, проводимая в течение 80 лет, позволила на сегодня создать однородные по количественным признакам стада соболей. Перспективы дальнейшей селекции связаны с существующим уровнем генетического разнообразия, сложившегося в ходе промышленной доместики. Впервые для вида *Martes zibellina* разработана оценка уровня генетической изменчивости с помощью панели микросателлитных маркеров. Проведено первое исследование промышленной популяции соболя по шести микросателлитным локусам, определен ряд популяционных параметров (набор аллелей, гетерозиготность и др.).

Ключевые слова: *Martes zibellina*, клеточные популяции, микросателлитные локусы, полиморфизм.

Введение

Ареал исследуемого вида *Martes zibellina* L. расположен в основном в России, Сибири и на Дальнем Востоке, лишь незначительные по численности популяции этого вида существуют на территории Китая, Кореи и Монголии.

В настоящее время соболь остался единственным видом из разводимых в неволе пушных зверей, природные популяции которого находятся под интенсивным промыслом. По-прежнему так же, как и в 17 веке, ежегодно добываются и экспортируются сотни тысяч шкур этих животных.

Высокая значимость экспорта пушнины соболя для государства и как следствие интенсивная добыча этого вида в течение сотен лет привели к его глубокой депрессии во второй половине 17-го – первой половине 20-го веков. Для сохранения соболя в это время применя-

лись охранные меры: неоднократные полные запреты на промысел в конце 17-го – середине 20-го веков, интродукции в прежние места обитания. В настоящее время можно говорить о восстановлении и стабильности ресурсов природных популяций соболя (Зырянов, 2009). Создание промышленных популяций соболя (на сегодня в России их 8) является еще одной мерой по сохранению природных ресурсов этого уникального вида.

Дальнейшее решение проблемы эффективного воспроизводства соболей требует разработки методов генетической идентификации через проведение на первом этапе исследования генетической структуры промышленных популяций в специализированных соболеводческих хозяйствах.

Настоящее исследование было проведено в первой клеточной популяции – зверохозяйстве «Пушкинский» Московской области, в котором

сосредоточен массив соболей, сформированный из географических рас, представляющих разные части ареала вида (Портнова, 1941, 1966; Куличков, Портнова, 1967; Мишуков, 1998). Ранее нами были проведены исследования изменчивости в клеточной популяции соболя по генам, кодирующим белки крови, – всего исследовалось 25 локусов. Было установлено, что доля полиморфных генов составляет 24 %, а уровень гетерозиготности равен 0,069 (Каштанов, Казакова, 1995).

Количество полиморфных локусов, выявленных этим методом, позволяет предположить, что вид *Martes zibellina* в условиях промышленной domestikации сохранил большую часть своего аллельного состава, характерного для природных популяций. Этот вывод основывается также на том, что уровень изменчивости изученной нами популяции оказался близким к верхнему пределу диапазона изменчивости у млекопитающих.

Однако, как показывают отдельные исследования на примере аллозимного полиморфизма, влияние отдельных локусов может исказить картину дифференциации популяций (Рубцова и др., 2008). Поскольку белки, особенно ферменты, выполняют важные жизненные функции, то многие из них являются мишенями естественного отбора и в условиях domestikации. Действие отбора может по-разному проявляться в различных популяциях, что сказывается на дифференциации.

Этот процесс мог, с одной стороны, усугубиться дифференциальным воспроизведением семей, представляющих различные исходные выборки из природных популяций, на фоне быстрого роста клеточной популяции. Численность этой популяции выросла от исходных нескольких сотен особей до 7 тыс. самок основного стада. С другой стороны, структура популяции могла подвергаться эффектам жесткого направленного отбора, проводимого по ряду селективируемых признаков.

В связи с этим нами была поставлена задача исследования генетической структуры промышленной популяции соболя в зверосовхозе «Пушкинский» с использованием 6 микросателлитных локусов ДНК. Предполагается, что эти маркеры в основном нейтральны как по отношению к селекционным мероприятиям,

так и по отношению к действию естественного отбора.

Необходимо отметить чрезвычайно малое число исследований соболей с помощью методов ДНК-типирования. Так, в зарубежных работах исследовались единичные особи соболей по изменчивости гена цитохрома b митохондриальной ДНК (Carr, Hicks, 1997; Kurose *et al.*, 1999; Hosoda *et al.*, 2000; Murakami, 2002) и двух ядерных генов (Sato *et al.*, 2004). Видоспецифические маркеры для микросателлитных локусов до сих пор отсутствуют. В последние годы к исследованию генетической изменчивости природных популяций соболя начинают проявлять интерес отечественные ученые. Так, Н.П. Балмышева и Л.Л. Соловчук (1999) и А.В. Петровская (2007) исследовали рестрикционный полиморфизм гена цитохрома b митохондриальной ДНК (мтДНК) в популяциях Магаданской области, являющихся очагами реинтродукции камчатского и якутского соболей. Позже была определена первичная последовательность фрагмента гена цитохрома b мтДНК соболей, обитающих на территории Магаданской области, Камчатки и Якутии (Малярчук и др., 2010). Также была исследована изменчивость района D-петли мтДНК у нескольких десятков особей из популяций Северного Урала и Якутии (Рожнов и др., 2010). Однако полиморфизм ДНК-маркеров клеточных популяций этого вида до сих пор остается неизученным.

Материалы и методы

Для анализа ДНК использовали образцы мышц соболей, которые фиксировали в 96 %-м этаноле. Для проведения анализа были собраны образцы тканей 50 животных из клеточной популяции соболя. Тотальную ДНК выделяли по стандартной методике с помощью набора реактивов «Diatom DNA Prep» фирмы ООО «Лаборатория Изоген» (Россия). Для ПЦР-амплификации использовали наборы Gene Pak PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», Россия), к которым добавляли 5 мкл смеси праймеров (конечная концентрация 0,5 мкМ) и 5 мкл исследуемой ДНК (100 ng). Амплификацию микросателлитных локусов проводили в термоциклере «MJ Research PTC-100» при

следующем режиме: 8 циклов, включающих 1 минуту денатурации ДНК-матрицы при температуре 94 °С, 30 секунд отжига праймеров при X °С и синтез новых цепей в течение 30 секунд при 72 °С; затем следовал 21 цикл, включающий 30 секунд при 94 °С, 30 секунд – X °С и 15 секунд при 72 °С; элонгация 3 минуты при 72 °С. X – температура отжига для индивидуальной пары праймеров (табл. 1).

Основные трудности при подборе праймеров были обусловлены практически отсутствием экспериментальных данных по изменчивости микросателлитных локусов у соболя. Последовательности примененных в работе праймеров были взяты из литературных данных, где они использовались для анализа других видов семейства кунных (Davis, Strobeck, 1998; Fleming *et al.*, 1999).

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6 %-м полиакриламидном геле в 1 × ТБЕ буфере при 300 В в течение 2–3 часов, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете. В качестве маркеров длины фрагментов использовали стандарты молекулярной массы в 25 п.н., 100 п.н. («Promega») и ДНК плазмиды pBR322, обработанные рестриктазой HaeIII. Размеры аллелей по каждому локусу определяли с использованием программы «1D Image Analysis Software Version 3.5» фирмы Кодак.

Частоты аллелей и гетерозиготности, а также статистические тесты на соответствие наблю-

даемых частот генотипов по каждому локусу равновесному состоянию Харди–Вайнберга, внутривидовые коэффициенты инбридинга *f*, оценивали с использованием программы GDA (Lewis, Zaykin, 1996).

Результаты и обсуждение

Нами впервые получены данные по изменчивости микросателлитных локусов в промышленной популяции соболя. В табл. 2 приведены частоты аллелей исследованных микросателлитных локусов и значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности.

Из табл. 2 видно, что локусы отличаются друг от друга количеством аллельных вариантов. Так, в локусе Ma9 обнаружено всего 2 аллеля, тогда как в локусах Mer041 и Mvis075 – по 10 аллелей. Принимая во внимание размеры обнаруженных фрагментов, можно предположить существование дополнительных аллельных вариантов в локусах Ma2, Ma14, Mer041 и Mvis075, что можно выяснить при увеличении размера выборки и изучении других популяций. Отличаются исследованные локусы и по уровню встречаемости аллелей. Так, в локусах Ma3 и Ma9 явно доминирует по одному аллельному варианту: размером в 133 п.н. (0,800 ± 0,060) и 108 п.н. (0,844 ± 0,054) соответственно. Остальные локусы более выровнены по частотам аллелей, наиболее представленными в них являются уже 2–3 аллельных варианта.

Таблица 1

Характеристика исследованных микросателлитных локусов

Локус	Последовательности праймеров	t° отжига	Интервал размеров аллелей (п.н.)	Число аллелей/число особей
Ma2	F: ACCCATGAATAATGTCTTAG R: ATCTTGCATCAACTAAAAAT	52 °С	170–182	5/49
Ma3	F: AATACTGAAGGGCAAAAACC R: GGAGTCTGCTTGTCCTCTC	56 °С	131–137	4/45
Ma9	F: GGGTCAGCTGTATACTATT R: GATTCTCTCCCTCTTTCTCT	45 °С	106–108	2/45
Ma14	F: GACCTGAGCCGAAGGCA R: AGGTGTGGAAACAAACGAG	58 °С	188–202	6/46
Mer041	F: TGTGTGATCTCTGGGAATTCTC R: TCTGCTCCCCAGATAAAAGC	50 °С	141–163	10/45
Mvis075	F: GAAATTTGGGGAATGCACTC R: GGCAGGATAGGATGTGAGCT	60 °С	131–153	10/45

Таблица 2

Аллели микросателлитных локусов, частоты в популяции соболя
зверосовхоза «Пушкинский»

Ma2 (49)		Ma3 (45)		Ma9 (45)		Ma14 (46)		Mer041 (45)		Mvis075 (45)	
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
170	0,204	131	0,033	106	0,156	188	0,065	141	0,033	131	0,011
172	0,245	133	0,800	108	0,844	194	0,011	147	0,200	133	0,011
174	0,153	135	0,156			196	0,315	149	0,133	137	0,011
176	0,367	137	0,011			198	0,554	151	0,456	141	0,056
182	0,031					200	0,022	153	0,078	143	0,389
						202	0,033	155	0,044	145	0,044
								157	0,011	147	0,089
								159	0,011	149	0,044
								161	0,022	151	0,256
								163	0,011	153	0,089
Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
0,714	0,747	0,311	0,338	0,311	0,266	0,457	0,594	0,778	0,733	0,733	0,769
P = 0,404		P = 0,223		P = 0,577		P = 0,007		P = 0,922		P = 0,103	

1 – размер фрагмента (п.н.); 2 – частота аллеля.

Анализ изменчивости исследованных локусов показал, что значительных различий по значениям наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности не прослеживается. Выявленное отклонение в распределении генотипов от ожидаемого в соответствии с законом Харди–Вайнберга по локусу Ma14 может быть следствием неслучайного скрещивания, т. е. данный локус может быть вовлечен в отбор по селекционируемым признакам.

Поскольку данные по изменчивости микросателлитных локусов у соболя в доступной нам литературе отсутствуют, было проведено сравнение полученных результатов с данными для родственных видов. Так, Дэвис и Штробек (Davis, Strobeck, 1998) в выборке американской куницы (*Martes americana*) из северо-западных территорий Канады ($n = 30$) по локусу Ma2 обнаружили 5 аллелей, ожидаемая гетерозиготность составила 0,77, по локусу Ma3 – 4 аллеля (0,16), по локусу Ma9 – 4 (0,69), по локусу Ma14 – 10 (0,88). В выборке американской норки (*Mustela vison*) из Аляски ($n = 65$) аналогичные показатели составили для локуса Mer041 – 12 (0,86), а для локуса Mvis075 – 8 (0,81) (Fleming *et al.*, 1999). Результаты сравнения показали, что количество аллелей и значения коэффициента ожидаемой

гетерозиготности по большинству локусов у соболя совпадают или очень близки сравниваемым видам.

Разработанный для соболя метод оценки генетической изменчивости позволит решить следующие задачи:

- провести сравнительные исследования промышленных популяций с различным уровнем отбора и направлением селекции, выявить особенности их генофонда по открытым маркерам;

- выявление генетической структуры по микросателлитным маркерам позволит оценить влияние длительного направленного отбора в промышленных популяциях соболя по ряду количественных признаков;

- этим методом будут проведены исследования по дифференциации природных популяций соболя, что позволит выявить географические расы, оказавшие наибольшее влияние на современный генофонд соболей клеточного разведения.

Оценить эффективность реинтродукции также можно только с помощью исследования аллельного состава генофонда существующих популяций, как расселенных на большой территории (Якутия, Эвенкия, Красноярский край),

так и отдельных изолятов (Сахалин и другие острова). Для этого необходимо провести генотипирование популяций, из которых предстоит расселить соболей в другие регионы с целью восстановления численности или улучшения пушно-меховых качеств.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-13899-офи-ц.

Литература

- Балмышева Н.П., Соловечук Л.Л. Генетическая изменчивость гена цитохрома b митохондриальной ДНК соболя (*Martes zibellina* L.) магаданской популяции // Генетика. 1999. Т. 35. № 9. С. 1252–1258.
- Зырянов А.Н. Соболь Средней Сибири. Красноярск, 2009. 250 с.
- Каштанов С.Н., Казакова Т.И. Генетическая изменчивость соболя (*Martes zibellina* L.) по генам белков крови // Генетика. 1995. Т. 31. № 2. С. 234–238.
- Куличков Б.А., Портнова Н.Т. Русский соболь. М.: Колос, 1967.
- Малярчук Б.А., Петровская А.В., Деренко М.В. Внутривидовая структура соболя (*Martes zibellina* L.) по данным изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома b митохондриальной ДНК // Генетика. 2010. Т. 46. № 1. С. 73–78.
- Мишуков Л.К. С чего началось соболеводство? // Кролиководство и звероводство. 1998. № 5/6. С. 15.
- Петровская А.В. Генетическая структура популяций соболя (*Martes zibellina* L.) в Магаданской области по данным об изменчивости митохондриальной ДНК // Генетика. 2007. Т. 43. № 4. С. 530–536.
- Портнова Н.Т. Опыт работы соболиной фермы Пушкинского звероводческого совхоза // Кролиководство и звероводство. 1941. № 6. С. 7–9.
- Портнова Н.Т. Наш опыт разведения соболей // Кролиководство и звероводство. 1966. № 4. С. 15–16.
- Рожнов В.В., Мещерский И.Г., Пищугина С.Л., Симанкин Л.В. Генетический анализ популяций соболя (*Martes zibellina*) и лесной куницы (*M. martes*) в районах совместного обитания на северном Урале // Генетика. 2010. Т. 46. № 4. С. 553–557.
- Рубцова Г.И., Афанасьев К.И., Малинина Т.В. и др. Дифференциация популяций кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) по микросателлитным и аллозимным маркерам: сравнительный анализ // Генетика. 2008. Т. 44. № 7. С. 1–8.
- Carr S.M., Hicks S.A. Are there two species of marten in North America? Genetic and evolutionary relationships within *Martes* // *Martes: Taxonomy, Ecology, Techniques, and Management* / Eds G. Proulx, H.N. Bryant, P.M. Woodard. Edmonton; Alberta: Canada. Provincial Museum of Alberta, 1997. P. 15–28.
- Davis C.S., Strobeck C. Isolation, variability, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite loci in the family Mustelidae // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. P. 1776–1778.
- Fleming M.A., Ostrander E.A., Cook J.A. Microsatellite markers for American mink (*Mustela vison*) and ermine (*Mustela erminea*) // *Mol. Ecol.* 1999. V. 8. P. 1351–1362.
- Hosoda T., Suzuki H., Harada M. *et al.* Evolutionary trends of the mitochondrial lineage differentiation in species of genera *Martes* and *Mustela* // *Genes Genet. Syst.* 2000. V. 75. P. 259–267.
- Kurose N., Masuda R., Siriaroonrat B., Yoshida M.C. Intraspecific variation of mitochondrial cytochrome b gene sequences of the Japanese marten *Martes melampus* and the sable *Martes zibellina* (Mustelidae, Carnivora, Mammalia) in Japan // *Zool. Sci.* 1999. V. 16. P. 693–700.
- Lewis P.O., Zaykin D.Z. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data Version 1.0 (D12). 1999.
- Murakami T. Species identification of mustelids by comparing partial sequences on mitochondrial DNA from fecal samples // *J. Vet. Med. Sci.* 2002. V. 64. P. 321–323.
- Sato J.J., Hosoda T., Wolsan M., Suzuki H. Molecular phylogeny of arctoids (Mammalia: Carnivora) with emphasis on phylogenetic and taxonomic positions of ferret-badgers and skunks // *Zool. Sci.* 2004. V. 21. P. 111–118.

**ANALYSIS OF THE GENETIC STRUCTURE OF A FARM-BRED SABLE
(*MARTES ZIBELLINA* LINNAEUS, 1758)
POPULATION WITH SIMPLE SEQUENCE REPEAT MARKERS**

S.N. Kashtanov¹, G.A. Rubtsova¹, O.E. Lazebny²

¹ N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
e-mail: snkashtanov@mail.ru;

² N.K. Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
e-mail: oelazebny@gmail.com

Summary

The appreciated value of sable fur (*Martes zibellina* L.), and as a consequence, long periods of unsustainable hunting have caused significant fluctuations in the sizes of natural populations of this species. The idea of industrial sable domestication was executed for the sake of stability of Russia's traditional exports. The first farm population was established in 1929. For that purpose, animals from 8 natural populations were captured. After solving the problems associated with breeding in captivity, directional selection began. Practiced over 80 years, it allowed creating sable herds with homogeneous quantitative characters. Prospects of further selection are associated with the existing level of genetic diversity in captive sable populations formed after the domestication. In this study, the genetic variability of this species was for the first time estimated with the help of simple sequence repeat markers. The first study of the variability of six SSR loci in a captive population of sables was carried out, and a number of population parameters were identified: allele pool, heterozygosity, etc. The studied population of the Pushkinskoe sable fur farm, Moscow Region, was the ancestor of all existing captive populations.

Key words: *Martes zibellina*, fur farm population, SSR markers, polymorphism.